



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
Y BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Tema: Identificación y modelamiento de mutaciones que otorgan resistencia a inhibidores de la enzima proteasa M^{pro} del virus SARS-CoV2.

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Este Trabajo de Titulación forma parte del Proyecto “Diseño racional de inhibidores con potencial actividad antiviral contra el virus SARS-CoV-2 (COVID-19)”, auspiciado por la UODIDE mediante la Convocatoria 2020 y coordinado por Mario Daniel García Solís, Ph.D.

Autora: Carolina Belén Vizueta Rubio

Tutor: Ph.D. Mario Daniel García Solís

Ambato - Ecuador

Enero – 2021

APROBACIÓN DEL TUTOR

Ph.D. Mario Daniel García Solís

CERTIFICA

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería de Alimentos y Biotecnología, de la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, 07 de diciembre del 2020.

Ph.D. Mario Daniel García Solís

C.I. 1103605471

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Carolina Belén Vizueta Rubio, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Carolina Belén Vizueta Rubio

C.I. 185030209-0

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman

Dr. Orestes Darío López Hernández

C.I. 1754784864

Dr. David Andrés Terán Mera

C.I. 1716569726

PhD. William Ricardo Calero Cáceres

C.I. 171434885-9

Ambato, 11 de Enero del 2020

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



.....
Carolina Belén Vizueta Rubio

C.I. 185030209-0

AUTORA

DEDICATORIA

A mi madre Teresita.

A mis hermanos, Luis y José.

A mis pequeños Gaby, Santino y Joaquín.

La vida es hermosa por ustedes

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi profundo y sincero agradecimiento a todas las personas que me acompañaron a lo largo de este camino.

A mi tutor, PhD. Mario García, quien me dio la oportunidad de trabajar junto a él. Durante todo este tiempo ha demostrado ser un profesional y una persona impecable, convirtiéndose en un ejemplo a seguir. De igual manera a la Doctora Liliana Cerda, por su tiempo y apoyo en la realización de este trabajo.

A mi familia, especialmente a mi madre, mis hermanos y sobrinos. A mi abuelita Teresita Mera, tíos, tías, primos y primas, por ser luz en los momentos de oscuridad, por tomar mi mano durante este camino, por su amor incondicional y ser el pilar fundamental en mi vida.

A Damián y Néstor, por compartir su amistad verdadera conmigo, por no soltarme cuando más lo necesité. De igual manera a Pato y Jhoni por demostrarme que no existe envidia en nuestra amistad y que todos podemos triunfar juntos.

De igual forma, a todos los docentes de la FCIAB quienes jamás me dejaron rendirme, al contrario, me motivaron a continuar. Por sus enseñanzas impartidas tanto en el ámbito académico como personal.

De manera especial quiero agradecer a Darwin Barroso y al Doctor Carlitos Rodríguez, quienes partieron en este caótico año. Agradezco el tiempo compartido y las enseñanzas que me dejaron. Su legado se va a mantener siempre, su amor por la ciencia y su don de personas se quedarán con nosotros. Nos volveremos a ver.

En fin, no lo hubiera logrado sin ustedes.

Gracias totales.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

CAPITULO I	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	1
1.1.1 4.1 Estructura genética y molecular del SARS-CoV-2	3
1.1.2 4.1 Ciclo de replicación del SARS-CoV-2	5
1.1.3 4.3 Estructura y Función de la Proteasa M ^{PRO} del SARS-CoV-2	7
1.1.4 Inhibidores de la proteasa principal M ^{PRO} del SARS-CoV-2	9
1.2. OBJETIVOS	14
1.2.1. Objetivo General	14
1.2.2. Objetivos específicos	14
CAPITULO II	15
MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1 Materiales, equipos y reactivos	15
2.1.1 Materiales.....	15
2.2 Métodos.....	16
1.1. Análisis de homología de M ^{PRO} de SARS-CoV-2	16
1.2. Alineamiento de secuencias homólogas.....	18
1.3. Identificación de aminoácidos claves que forman interacciones no covalentes con el inhibidor	18
1.4. Construcción de modelos tridimensionales de variantes mutantes de la proteasa M ^{PRO} de SARS-CoV-2.....	20
1.5. Determinación de la resistencia de las variantes mutantes de la proteasa M ^{PRO} de SARS-CoV-2	21
1.6. Identificación de las interacciones de la M ^{PRO} del SARS-CoV-2 mutada.....	23
CAPITULO III.....	25

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
3.1 Análisis y discusión de resultados	25
3.3.1. Secuencias homólogas de M ^{pro} de SARS-CoV-2	25
3.3.2. Identificación y alineamiento de aminoácidos claves que forman interacciones con los inhibidores	26
3.3.3. Docking covalente.....	32
3.2. Verificación de la hipótesis.....	48
CAPITULO V	49
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	49
4.1 Conclusiones	49
4.2 Recomendaciones	50
ANEXOS	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama del genoma del SARS-CoV-2. En el extremo 5 ' se encuentra el gen de la replicasa viral codificado por ORF 1a y ORF 1b. Hacia el extremo 3 ' se ubican los genes que codifican 4 proteínas estructurales principales (verde) y proteínas auxiliares (azul).	4
Figura 2 Estructura del SARS-CoV-2. Partícula compuesta por ARN asociado a la proteína (N), cubierto por una envoltura externa de proteínas estructurales principales (S), (M) y (E) y proteínas accesorias como (HE).	5
Figura 3. Mecanismo de replicación de SARS-CoV-2	6
Figura 4: Representación cartoon del homodímero M ^{pro} del SARS-CoV-2. La cadena A está representada en amarillo, verde y celeste, mientras que la cadena B es azul oscuro. Los residuos catalíticos Cys145 e His41 se encuentran resaltados.	8
Figura 5. Estructura del SARS-CoV-2 en complejo con el inhibidor Carmofur. a. Estructura química del carmofur. b. Combinación de Carmofur y Cys145 del SARS-CoV-2 M ^{pro} . c. Estructura de un solo protómero. d. Panorama del centro catalítico. e. Vista del sitio de unión con una rotación de 45° con respecto al panel d.	10
Figura 6. Estructura de la proteasa M ^{pro} de SARS-CoV-2 en complejo con el inhibidor N3. a. Representación cartoon del complejo dímero M ^{pro} -inhibidor. b. Representación de superficie del homodímero de M ^{pro} . El protómero A es azul, el protómero B es salmón y N3 se representa en sticks de color verde.....	12
Figura 7. Comparación del complejo de unión del inhibidor entre las estructuras SARS-CoV-2 M ^{pro} -N3 y SARS-CoV M ^{pro} -N1. El polipéptido de SARS-CoV-2 M ^{pro} se muestra en azul, mientras que SARS-CoV M ^{pro} en gris. Los inhibidores N3 y N1 se muestran en color verde y rosa, respectivamente.....	13
Figura 8 Servidor UniProt. 1. Insertar la secuencia a analizar. 2. Escoger el número de Hits. 3. Correr el BLAST.....	17

Figura 9 Software Wincoot. 1. Opción Measure para la medición de interacciones. 2. Establecer las distancias	19
Figura 10. Software Wincoot. 1. Seleccionar el botón Mutación. 2. Escoger el aminoácido mutante	20
Figura 11. Servidor YASARA. 1. Insertar el email. 2. Seleccionar el archivo en formato PDB. 21	
Figura 12. Ventana del Software Gold. 1. Opción para activar docking covalente 2. Espacio para colocar el número del átomo para la unión covalente 3. Botón Run Gold	23
Figura 13 Servidor Arpeggio. 1. Seleccionar el archivo PDB. 2. Elegir la cadena para calcular los contactos. 3. Descargar el PYMOL con los resultados.....	24
Figura 14. Estructura en sticks de los aminoácidos que interaccionan con los inhibidores N3 (rosa) y Carmofur (amarillo). La díada catalítica se encuentra etiquetada.....	27
Figura 15. Alineamiento múltiple de secuencias de M ^{pro} de diferentes virus. Los residuos en rojo representan los aminoácidos que interactúan con los inhibidores Carmofur y N3. El asterisco indica aquellos residuos clave para la unión de inhibidores y que tienen un menor grado de conservación, por lo cual son susceptibles a mutaciones.....	29
Figura 16 a. Estructura en stick que muestra los aminoácidos susceptibles a mutación (magenta). B. Estructura en superficie que muestra los aminoácidos susceptibles a mutación (naranja).....	32
Figura 17. Representación en Sticks de las estructuras de M ^{pro} SARS-CoV-2 en complejo con Carmofur a) M ^{pro} Silvestre b) His164Gln, c) Met165Leu y d) Met49Leu49	37
Figura 18. Mapa de superficie de M ^{pro} del SARS-CoV-2 en complejo con el inhibidor N3 (verde). a) Ala191Val, b)Pro168Ser, c) Ser46Ala, d) Met165Leu, e) Thr190Ile, f) Ser46Pro, g) Phe185Tyr, h) Met49Leu, i) Pro168Ala, j)Arg188Lys, k) His164Gln	41
Figura 19. Interacciones de M ^{pro} SAR-CoV-2 en complejo con CMF. a. M ^{pro} Silvestre, las interacciones polares (amarillo), las interacciones hidrofóbicas (rojo), los enlace azufre-pi (naranja) y los enlaces carbono-pi (morado). b.His164Gln c. Met165Leu d. Met49Leu.. Para b. c.	

y d. Las líneas rojas señalan las interacciones polares, Las líneas amarillas las interacciones hidrofóbicas. El enlace azufre pi están en color verde y los enlaces carbono pi con celeste..... 43

Figura 20 Interacciones de M^{PRO} del SARS-CoV-2 en complejo con el inhibidor N3. Las líneas rojas representan los enlaces polares, las de color amarillo los hidrofóbicos, los enlaces azufre-pi de color magenta y los carbono-pi se representan en color verde.a) silvestre b) Ala191Val, c)Pro168Ser, d) Ser46Ala, e) Met165Leu, f) Thr190Ile, g) Ser46Pro, h) Phe185Tyr, i) Met49Leu, j) Pro168Ala, k)Arg188Lys, l) His164Gln 48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros Fisicoquímicos del SARS-CoV-2 M ^{PRO}	9
Tabla 2 Secuencia homólogas de M ^{PRO} SARS-CoV-2.....	25
Tabla 3. Aminoácidos de M ^{PRO} SARS-CoV-2 que interactúan con inhibidores	27
Tabla 4. Mutaciones puntuales de aminoácidos.....	30
Tabla 5 Mutaciones en la estructura de SARS-CoV-2.....	31
Tabla 6. Ligandos empleados para el Docking en M ^{PRO}	33
Tabla 7. Resultados del Docking de Carmofur y N3 en M ^{PRO}	34

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Secuencias homólogas de M ^{PRO} SARS-CoV-2.....	58
Anexo 2 Alineamiento completo de secuencias homológicas a M ^{PRO} SARS-CoV-2.	62
Anexo 3Secuencia de cDNA de M ^{PRO} del SARS-CoV-2.....	65
Anexo 4. Tabla de posibles mutaciones en M ^{PRO} SARS-CoV-2.....	66
Anexo 5 Resultados Completos Docking Molecular.....	67

RESUMEN

En enero de 2020, se informó de un brote de un nuevo Coronavirus (CoV-2), el cual provoca el Síndrome agudo respiratorio (SARS) . SARS-CoV-2 al momento no dispone de opciones terapéuticas que prevengan o detengan la infección viral. Uno de los targets para desarrollar fármacos contra este virus es su proteasa principal, M^{pro}. Se ha demostrado que los compuestos Carmofur y N3 exhiben una potente actividad inhibitoria de M^{pro}. Sin embargo, el genoma del SARS-CoV-2 muta rápidamente. En el presente trabajo se propone el modelamiento de estructuras de mutaciones puntuales en la proteasa principal del SARS-COV-2 y el análisis de las implicaciones que estas tendrían sobre la interacción con Carmofur y N3. Un alineamiento múltiple de las proteínas virales homólogas a M^{pro} sugiere que la estructura de la proteasa M^{pro} del SARS-CoV-2 podría sufrir modificaciones en los aminoácidos del sitio activo. Las posibles mutaciones identificadas fueron modeladas en Wincoot y refinadas en YASARA. El análisis de las posibles variaciones en las propiedades de unión de Carmofur y N3 a M^{pro} se realizó mediante acoplamiento molecular. Los resultados muestran que mutaciones puntuales en el sitio activo de M^{pro} son capaces de modificar el modo de unión de estos inhibidores a la enzima, dando lugar al apareamiento de resistencias. Estos resultados son de gran relevancia, ya que permiten anticipar el efecto de diferentes mutaciones en el modo en el que actúan potenciales inhibidores de M^{pro} y así diseñar nuevos inhibidores que puedan sobrellevar el efecto de resistencia a estos fármacos.

Palabras claves: SARS-COV-2, COVID-19, modelado de mutaciones, inhibidores enzimáticos, Carmofur, Proteasa M^{pro}

ABSTRACT

In January 2020, an outbreak of a new Coronavirus (CoV-2) was reported, which causes Acute Respiratory Syndrome (SARS). SARS-CoV-2 at the moment does not have therapeutic options that prevent or stop the viral infection. One of the targets for developing drugs against this virus is its main protease, Mpro. The compounds Carmofur and N3 have been shown to exhibit potent Mpro inhibitory activity. However, the SARS-CoV-2 genome mutates rapidly. The present work proposes the modeling of the structures of point mutations in the main protease of SARS-COV-2 and the analysis of the implications that these would have on the interaction with Carmofur and N3. A multiple alignment of the viral proteins homologous to Mpro suggests that the structure of the Mpro protease of SARS-CoV-2 could undergo modifications in the amino acids of the active site. The possible mutations identified were modeled in Wincoot and refined in YASARA. The analysis of possible variations in the binding properties of Carmofur and N3 to Mpro was carried out by molecular coupling. The results show that point mutations in the active site of Mpro are capable of modifying the mode of binding of these inhibitors to the enzyme, giving rise to the appearance of resistance. These results are of great relevance, since they allow us to anticipate the effect of different mutations in the way in which potential Mpro inhibitors act and thus design new inhibitors that can overcome the effect of resistance to these drugs.

Keywords: SARS-COV-2, COVID-19, Mutation Modeling, Enzyme Inhibitors, Carmofur, Protease Mpro

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

En enero de 2020, se informó de un brote de un nuevo coronavirus (CoV-2) en China, el cual provoca el síndrome respiratorio agudo severo (SARS) o también llamada COVID-19 (**Chen, Yiu, & Wong, 2020; Rabaan et al., 2020**). Los efectos de esta enfermedad llevaron a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a declararla pandemia en marzo de 2020 (**S. Kumar, Zhi, Mukherji, & Gerth, 2020**).

Las rutas de infección del SARS-Cov-2 en humanos incluyen la inhalación de gotitas o líquidos que contienen el virus debido al contacto cercano con personas infectadas o al contacto con superficies contaminadas (**Liu et al., 2020**). (**Guy, DiPaola, Romanelli, & Dutch, 2020**) afirman que a pesar de que la mayoría de los pacientes se recuperan en 3 o 4 semanas; sin embargo, existen factores que pueden hacer que ciertas personas sean más vulnerables y empeorar su situación. Los principales síntomas de esta enfermedad incluyen: fiebre (83-98%), tos (76-82%), disnea (31-55%) y dificultad para respirar (17-29%) (**Yin et al., 2020**).

El 18 de marzo de 2020, días después de la declaración de pandemia por COVID-19, el número de casos registrados a nivel global para esta enfermedad fue de 214 010. China presentó 81 102 casos (37,89%), mientras que el resto de países como Italia, Irán y España contribuyeron al restante de 132 908 casos (**Rodríguez-Morales et al., 2020**). Nada más 21 días después, el 8 de abril de 2020, se reportaron más de 1,5 millones de infecciones (un incremento del 700%) y 87 000 muertes a causa de esta pandemia, cifras que indican la facilidad de diseminación del virus entre la población (**Yin et al., 2020**). En nuestro país, el impacto de este virus en la salud pública provocó hasta finales de agosto del 2020 más de 100 000 infectados y 6 556 fallecidos (**Salud, 2020**). El distanciamiento social

contribuye a ralentizar la progresión del virus, sin embargo no es suficiente para superar la pandemia (**Cheng, Chang, & Chou, 2010**).

El primer caso de reinfección por COVID-19 se dio en Hong Kong en un hombre de 33 años de edad. En este caso se evidenció una diferencia de 24 nucleótidos entre los genomas de los virus causantes del primer y segundo episodio (**Parry, 2020**). A su vez, el instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito confirmó que un hombre de 46 años de edad se convirtió en el primer caso de una persona reinfectada por SARS-CoV-2 en Ecuador y en Sudamérica (**Paez, 2020**). Este hallazgo sugiere que la inmunidad adquirida después de la infección inicial dura corto tiempo (**Parry, 2020**) y que el genoma del SARS-CoV-2 muta rápidamente. **Martínez (2020)** asevera que las mutaciones son procesos naturales que ocurren en de forma acelerada en virus y que el SARS-CoV-2 no es la excepción.

Por otra parte, diversos estudios han demostrado que el SARS-CoV-2 posee una similitud genética con el SARS-CoV-1 de más del 80%. Además, su genoma es similar al del coronavirus que infecta al pangolín y al Bat-SL-Co que ataca a murciélagos. (**Y. Kumar, Singh, & Patel, 2020**). Incluso muestra similitud con fragmentos del genoma del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Es decir, se trata de un virus quimera de evolución natural divergente (**López-Romero, de Jesús Nambo-Lucio, Salcedo-Carrillo, de los Ángeles Hernández-Cueto, & Salcedo-Vargas, 2020**).

El material genético del SARS-CoV-2 está compuesto por una monocadena de ARN positiva (**O'Meara, Guo, Swaney, Tummino, & Hüttenhain**) que codifica cuatro genes estructurales (spike, envoltura, membrana y nucleocápside) y las poliproteína pp1a y pp1ab que dan lugar a 16 proteínas no estructurales (NSPs) (**Oliva, 2020**). La proteasa principal del SARS-Cov-2, M^{pro}, o también conocida como 3CL^{pro}, es una proteína no estructural que cumple un papel fundamental en la replicación, la transcripción viral y en la mutación del virus. (**Chuanjun et al., 2020; Das, Majumder, Mandal, & Basak, 2020**). Estudios en células infectadas con el SARS-CoV-2 sugieren que la inhibición de la actividad de esta proteasa evita la replicación del virus (**Jin, Du, et al., 2020; Jin, Zhao, et al., 2020; Moneriz & Castro-Salguedo, 2020**), lo cual indica que M^{pro} puede ser utilizada como

objetivo para desarrollar inhibidores que sirvan como tratamiento eficaz contra el COVID-19 (Alouane et al., 2020; Jin, Zhao, et al., 2020; Xue et al., 2007; Yin et al., 2020).

Considerando la rápida evolución del SARS-CoV-2 en humanos y la caracterización continua de mutaciones en su material genético (Sheik Amamuddy, Verkhivker, & Tastan Bishop, 2020), es sumamente importante identificar y modelar el efecto de posibles futuras mutaciones de la proteasa M^{pro} del SARS-CoV-2 y su efecto en la afinidad de sus inhibidores. De esta forma, el presente proyecto de investigación tiene como objetivo analizar posibles cambios naturales en la estructura de la proteasa M^{pro} y la inherente aparición de resistencia contra los inhibidores que se están estudiando en la actualidad y que son candidatos para el tratamiento de personas que padecen COVID-19.

1.1.1 4.1 Estructura genética y molecular del SARS-CoV-2

De acuerdo a Bzówka et al. (2020b) los coronavirus CoV se clasifican en cuatro géneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*. El descubrimiento en el 2004 y 2005 de dos nuevas especies de Coronavirus que atacan a humanos, NL-63 y HCoV-HKUI, confirman que existe una alta tasa de recombinación y mutación genética dentro de los virus de la familia *Coronaviridae* (Cheng et al., 2010).

Los coronavirus poseen los genomas más grandes entre los virus de ARN con una extensión que varía entre los 26.4 y 31.7 kb y con un contenido de G+C entre el 32 y 43% (Mousavizadeh & Ghasemi, 2020). El SARS-CoV-2 es un *Betacoronavirus* (Alouane et al., 2020), cuyo gen más grande es el ORF1ab (marcos de lectura abiertos 1a y 1b) (Figura 1) que codifica para la poliproteína p1ab y 16 NSPs (S. Kumar et al., 2020). Estos polipéptidos son procesados extensivamente por la proteasa principal del SARS-CoV-2, M^{pro}, en conjunto con una o dos proteasas adicionales (Mousavizadeh & Ghasemi, 2020).



Figura 1. Diagrama del genoma del SARS-CoV-2. En el extremo 5 ' se encuentra el gen de la replicasa viral codificado por ORF 1a y ORF 1b. Hacia el extremo 3 ' se ubican los genes que codifican 4 proteínas estructurales principales (verde) y proteínas auxiliares (azul).

Fuente: **Pastrian-Soto (2020)**

Oliva (2020) (Gao et al., 2020) menciona que la parte restante del genoma del virus codifica cuatro proteínas estructurales esenciales: la glicoproteína espiga o spike (S) que tiene de 8 a 12 nm de longitud; la proteína de membrana (M), la proteína de envoltura (E) y la proteína que conforma la nucleocápside (N) que se fosforila e inserta en la bicapa lipídica de la envoltura externa. Además, codifica proteínas accesorias como la hemaglutinina esterasa (HE) que se encuentra presente en algunos tipos de betacoronavirus y cuya función es la de facilitar la entrada y propagación del virus (**Pastrian-Soto, 2020**).

El SARS-CoV-2 pertenece al subgénero *Sarbecovirus*, subfamilia *Orthocoronavirinae* (**Mejía Méndez & Pérez-Cortés, 2020**). Es una partícula de forma esférica o pleomórfica de aproximadamente 50 nm de diámetro. Las proteínas que componen la envoltura y la nucleocápside viral protegen la hebra de ARN monocatenario (Figura 2) (**S. Kumar et al., 2020**).

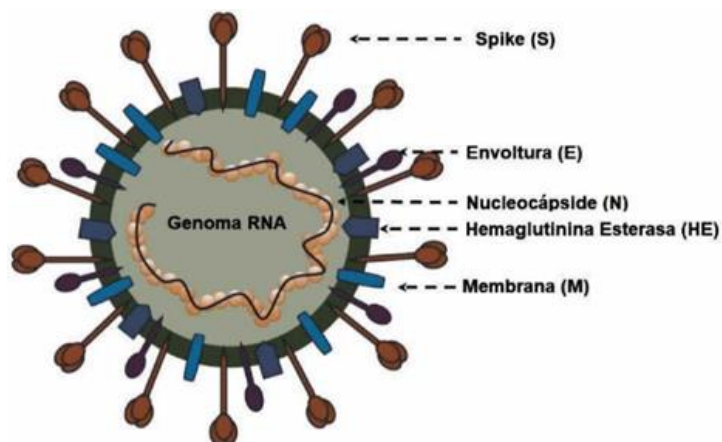


Figura 2 Estructura del SARS-CoV-2. Partícula compuesta por ARN asociado a la proteína (N), cubierto por una envoltura externa de proteínas estructurales principales (S), (M) y (E) y proteínas accesorias como (HE).

Fuente:Pastrian-Soto (2020)

1.1.2 4.1 Ciclo de replicación del SARS-CoV-2

Los coronavirus entran a la célula huésped por medio del contacto con receptores celulares específicos. La proteína (S) del SARS-CoV-2 se une a la superficie de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2, por sus siglas en inglés) (Figura 3) (**Kumar et al., 2020**). La subunidad S1 de la proteína (S) interacciona con receptor del ACE2 por medio del dominio de unión al receptor (RBD), mientras que, la subunidad S2 establece la fusión de la membrana de la célula huésped con la del virus (**Pastrian-Soto, 2020**). Para que el virus SARS-CoV-2 pueda ingresar en la célula huésped, la proteína (S) debe ser separada por una proteasa (**Mousavizadeh & Ghasemi, 2020**).

El virus ingresa al citoplasma de la célula huésped por endocitosis y fusión con vesículas ácidas (Figura 3). Este proceso permite la liberación del genoma viral, el cual es reconocido por la célula huésped como ARNm, y por lo tanto, emplea su maquinaria molecular para facilitar la traducción del ORF1ab que corresponde a la replicasa viral (**Cavallaro et al., 2020**).

Los ribosomas traducen los polipéptidos pp1a y pp1ab y, a partir de ellos, se da un proceso auto proteolítico que permite la generación de las 16 proteínas NSPs que constituyen el complejo replicasa-transcriptasa (RTC) viral (Cavallaro et al., 2020). El complejo RTC, replica y sintetiza un conjunto de ARN subgenómico (ARNsg) que codifican la producción de las principales proteínas estructurales (S), (M), (E) y (N); y proteínas accesorias (Chacón Hernández & Torres Rojas, 2020).

Para evitar el reconocimiento de la respuesta inmune innata, se forman vesículas que se conectan al retículo endoplasmático y permiten el empaquetamiento de las proteínas virales (Cavallaro et al., 2020). Todas estas proteínas se ensamblan junto con la nucleocápside mediante el sistema de Aparato de Golgi (ERGIC) y, finalmente, múltiples copias del virus escapan de las células huésped por exocitosis para infectar nuevas células (S. Kumar et al., 2020).

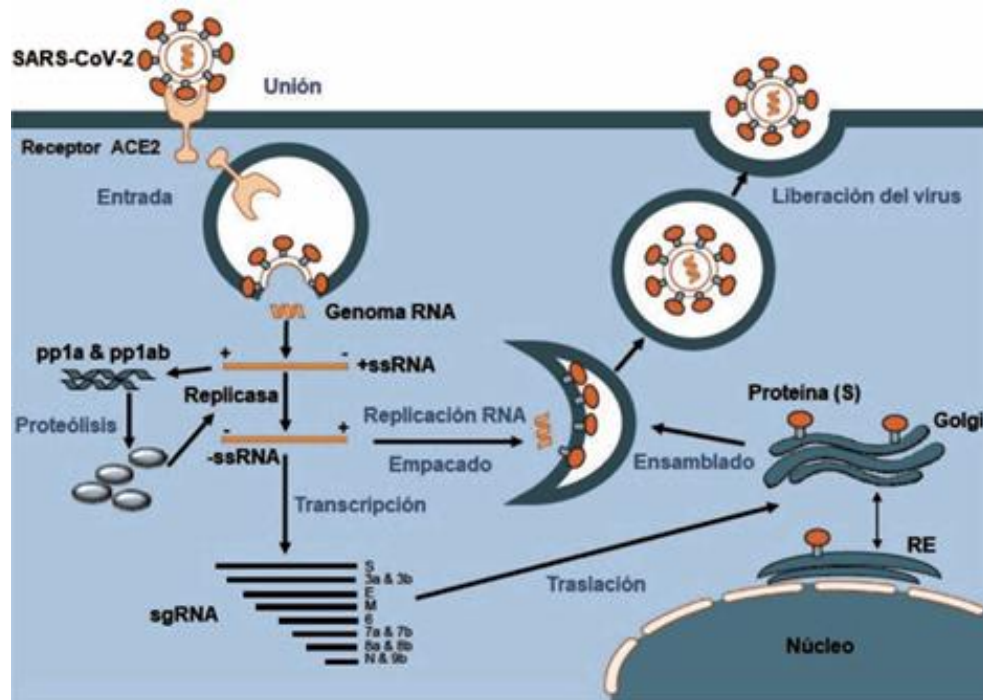


Figura 3. Mecanismo de replicación de SARS-CoV-2

Fuente: Pastrian-Soto (2020)

1.1.3 4.3 Estructura y Función de la Proteasa M^{pro} del SARS-CoV-2

La proteasa M^{pro} es una enzima de aproximadamente 33.8 kDa (Tabla 1) que contiene una díada catalítica de cisteína e histidina en su centro activo (**Jin, Du, et al., 2020; Shan, Li, & Xu, 2004**). La proteasa M^{pro} es un homodímero con ambos protómeros orientados ortogonalmente entre sí (**Masters, 2006**). El dímero es la especie más importante y activa de la enzima, mientras que la especie monomérica casi no presenta actividad (**Tahir ul Qamar, Alqahtani, Alamri, & Chen, 2020**).

La estructura cristalina de M^{pro} muestra la formación del dímeros (**Li & Kang, 2020**). Cada protómero se compone de tres dominios: I, II y III (Figura 4). El dominio I, conformado por los residuos 8-101, y el dominio II, residuos 102-184; tienen una estructura de barril β antiparalela (**Bzówka et al., 2020a**). El dominio III se compone de los residuos 201-303 y contiene cinco hélices α , en su mayoría antiparalelas, que se encuentra conectado al dominio II (**Xue et al., 2007**). El sitio de unión al sustrato y los residuos catalíticos His41 y Cys145 se encuentra en una hendidura entre el dominio I y el dominio II (Figura 4) (**Jin, Du, et al., 2020**)

El dominio II es el más flexible en las posiciones 153-155 (**Cheng et al., 2010**). Su estructura puede ser modificada con el pH, siendo 7,38 su valor óptimo (**Huang, Wei, Fan, Liu, & Lai, 2004**)

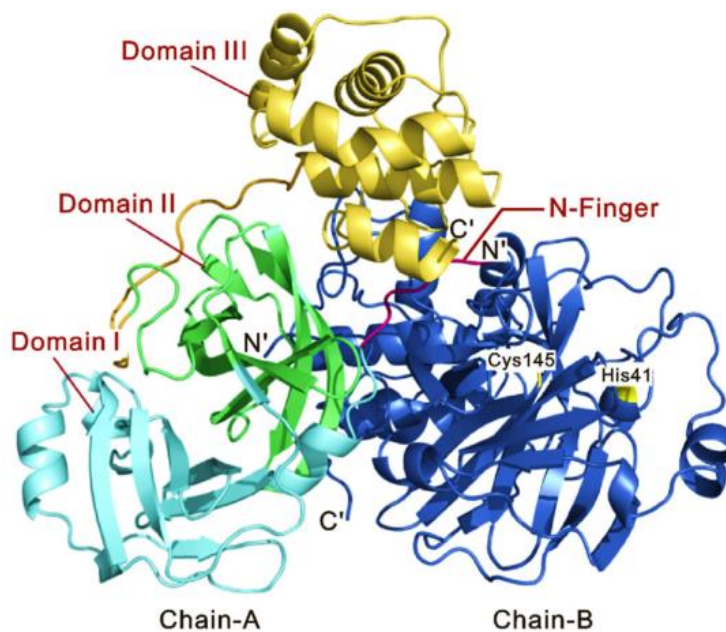


Figura 4: Representación cartoon del homodímero M^{pro} del SARS-CoV-2. La cadena A está representada en amarillo, verde y celeste, mientras que la cadena B es azul oscuro. Los residuos catalíticos Cys145 e His41 se encuentran resaltados.

Fuente: Tahir ul Qamar et al. (2020)

La proteasa M^{pro} del SARS CoV-2 puede tolerar variaciones en su sitio activo, favoreciendo así la aparición de mutaciones resistentes a los inhibidores estudiados (Portelli et al., 2020). Existe una diferencia de doce aminoácidos en sitio activo entre la estructura del SARS-CoV M^{pro} y el SARS-CoV-2 M^{pro} (Mejía Méndez & Pérez-Cortés, 2020). Algunas mutaciones (como Arg4) reducen la actividad enzimática cuatro veces (Xue et al., 2007). Además, Tahir ul Qamar et al. (2020) afirman que las mutaciones Ser284Ala, Thr285Ala e Ile286Ala en el SARS-CoV M^{pro} conducen a un aumento de 3,6 veces en la actividad catalítica, lo que podría explicar la mayor actividad observada para el SARS-CoV-2 M^{pro} en comparación con el SARS-CoV M^{pro}.

Tabla 1. Parámetros Físicoquímicos del SARS-CoV-2 M^{pro}

Parámetros	SARS-CoV-2 M ^{pro}
Peso molecular	33796, 64 Daltons
Número de aminoácidos	306
Índice de inestabilidad (II)	27,5 (estable)
Número de residuos cargados negativamente	26
Número de residuos cargados positivamente	22
Índice alifático	82,12
Composición Atómica	Carbono- 1499; Hidrógeno- 2318; Nitrógeno- 402; Oxígeno- 455; Azufre- 22
Composición de aminoácidos	Ala-17 (5,6%); Arg-11 (3,6%); Asn-21 (6,9%); Asp-17 (5,6%); Cys-12 (3,9%); Gln-14 (4,6%); Glu-9 (2,9%); Gly-26 (8,5%); His-7 (2,3%); Ile-11 (3,6%); Leu-29 (9,5%); Lys-11 (3,6%); Met-10 (3,3%); Phe-17 (5,6%); Pro-13 (4,2%); Ser-16 (5,2%); Thr-24 (7,8%); Trp-3 (1,0%); Tyr-11 (3,6%); Val-27 (8,8%)

Fuente: Tahir ul Qamar et al. (2020)

1.1.4 Inhibidores de la proteasa principal M^{pro} del SARS-CoV-2

Mediante el uso de herramientas bioinformáticas es posible el diseño de inhibidores para la enzima M^{pro} del SARS-CoV-2. El acoplamiento molecular o docking permite generar estructuras y evaluar su interacción con la molécula a estudiar (**Vivas-Reyes, Ruiz, & Caraballo, 2009**). Se han determinado estructuras cristalinas de SARS-CoV-2 M^{pro} en ausencia y presencia de inhibidores (**Shan et al., 2004**). Entre los principales inhibidores de la el SARS-CoV-2 M^{pro} se encuentran polipéptidos, flavonoides y otras estructuras que presentaron actividad antiviral (**Jo, Kim, Shin, & Kim, 2020**). **Arafet et al. (2020)** aseguran que los inhibidores mejores caracterizados forman un enlace covalente con M^{pro}, entre ellos:

Carmofur

Carmofur (1-hexilcarbamoil-5-fluorouracilo) es un derivado de 5-fluorouracilo y fármacos antitumorales aprobados. La estructura cristalina del M^{PRO} en complejo con Carmofur muestra que el compuesto modifica directamente a la enzima mediante la formación de un enlace covalente con el inhibidor (**Jin, Zhao, et al., 2020**). El mapa de densidad electrónica del complejo M^{PRO}-Carmofur, obtenido por **Jin, Zhao, et al. (2020)**, muestra que la fracción de ácido graso (C₇H₁₄NO) de Carmofur está unida covalentemente al átomo S_y del residuo catalítico Cys145 a través de un enlace covalente. Por otro lado, la cola de ácido graso se inserta en el subsitio S2 (Figura 5d, e). Esto indica que el grupo sulfhidrilo de Cys145 ataca al grupo carbonilo electrófilo de carmofur, lo que provoca la modificación covalente de Cys145 y la liberación del resto de la fracción (Figura 5b).

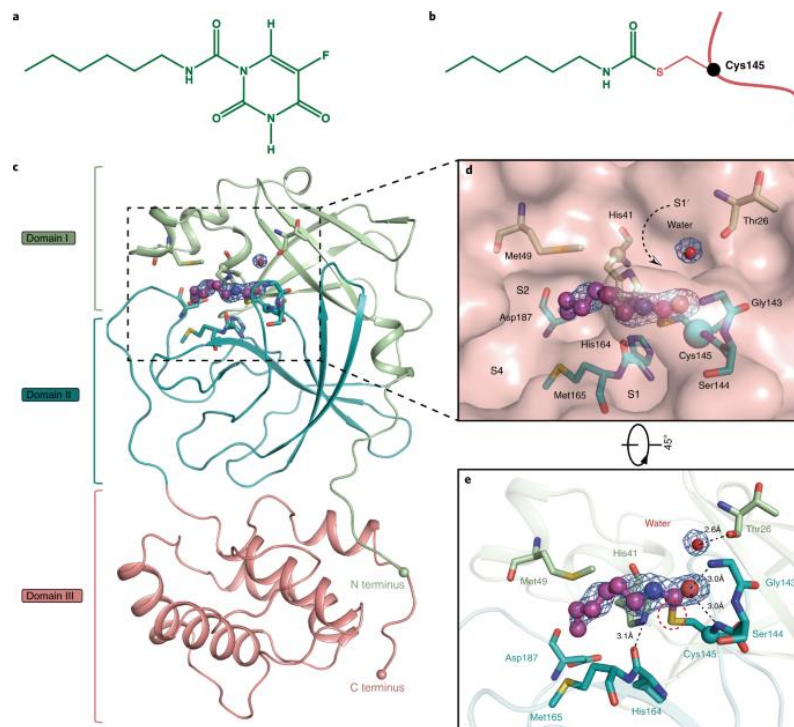


Figura 5. Estructura del SARS-CoV-2 en complejo con el inhibidor Carmofur. a. Estructura química del carmofur. b. Combinación de Carmofur y Cys145 del SARS-CoV-2 M^{PRO}. c. Estructura de un solo protómero. d. Panorama del centro catalítico. e. Vista del sitio de unión con una rotación de 45° con respecto al panel d.

Fuente: Jin, Zhao, et al. (2020).

Jin, Zhao, et al. (2020) resaltan que además del enlace covalente C-S, el inhibidor también se estabiliza en la enzima mediante puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. El oxígeno del carbonilo del carmofur ocupa el agujero del oxianión y forma puentes de hidrógeno con las amidas del esqueleto de Gly143 y Cys145 (**Figura 5e**). La cola de ácido graso se inserta en el espacio compuesto por las cadenas laterales de His41, Met49, Tyr54 y Met165 y la porción alquilo de la cadena lateral de Asp187 (**Figura 5d, e**). Las interacciones hidrofóbicas son principalmente contribuidas por las cadenas laterales de His41, Met49 y Met165, que son todas paralelas a la parte alquilo de la cola de ácido graso del inhibidor (**Figura 5e**).

N3 y N1

El diseño de fármacos asistido por computadora permitió crear un inhibidor del receptor de Michael llamado N3. Este compuesto puede inhibir específicamente M^{pro} y una variedad de diferentes coronavirus, incluidos el SARS-CoV y el MERS-CoV (**Shan et al., 2004**). El mapa de densidad electrónica del complejo M^{pro}-N3, presentado por **Jin, Du, et al. (2020)**, muestra que N3 está unido en el sitio de unión del sustrato en una conformación extendida. La supresión de la actividad de la proteasa M^{pro} del SARS-CoV-2 se realiza en dos pasos, el primero es la unión de N3 al sitio activo de la proteasa mediante numerosas interacciones no covalentes, y el segundo es la formación del enlace covalente con la Cys145 (**Arafet et al., 2020; Shan et al., 2004**).

Las estructuras de M^{pro}-Carmofur y M^{pro}-N3 son muy similares (con una desviación r.m.s. de 0,286 Å cuando se superponen todos los átomos de C α). En comparación con la estructura del complejo M^{pro}-N3, la mayor diferencia conformacional se produce en el sitio de unión del sustrato que rodea el esqueleto del Carmofur, la cual que está ligeramente hacia afuera (Figura. 6a) (**Jin, Du, et al., 2020**). De forma similar a cuando carmofur se une a M^{pro}, el inhibidor N3 modifica Cys145 mediante la formación de un enlace covalente entre el átomo de S γ de C145 y el C β del grupo vinilo de N3 (**Jin, Zhao, et al., 2020**).

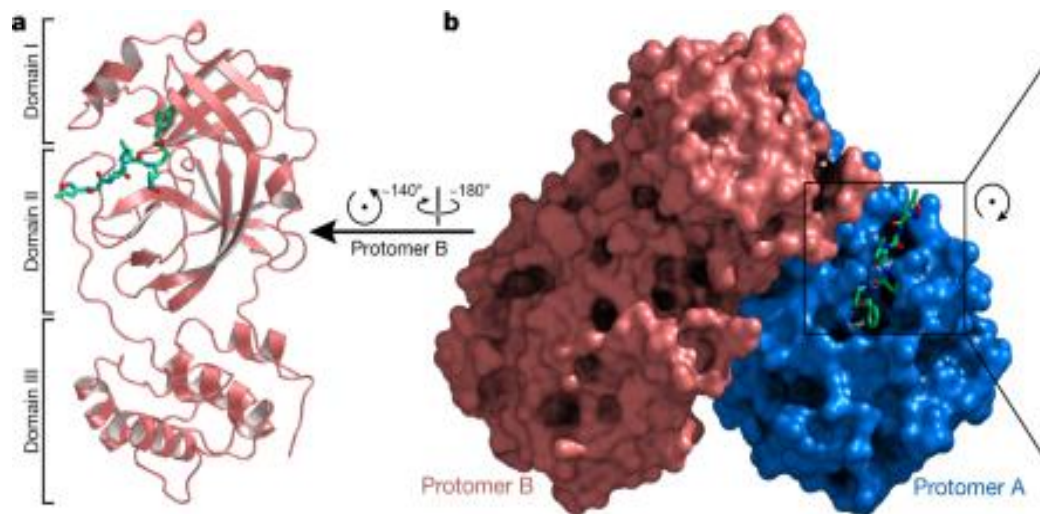


Figura 6. Estructura de la proteasa M^{pro} de SARS-CoV-2 en complejo con el inhibidor N3. a. Representación cartoon del complejo dímico M^{pro} -inhibidor. b. Representación de superficie del homodímico de M^{pro} . El protómero A es azul, el protómero B es salmón y N3 se representa en sticks de color verde.

Fuente: Jin, Du, et al. (2020)

La superposición de las estructuras de M^{pro} del SARS-CoV-2 en complejo con N1 o con N3 y, del M^{pro} SARS-CoV muestran que N3 y N1 se unen a estas dos enzimas de manera similar (Figura. 7a.). Al comparar la posición que adoptan el grupo éster bencílico en N3 y la porción éster etílico en N1 se puede observar que tienen una conformación distinta (**Jin, Du, et al., 2020**). Esto puede atribuirse a un agua ordenada (W1) en la estructura SARS-CoV M^{pro} -N1, que forma un enlace de hidrógeno de larga distancia al carboxilar el oxígeno del éster y dos enlaces de hidrógeno con el grupo NH de la cadena principal de Gly 143 y la cadena lateral de Asn 142

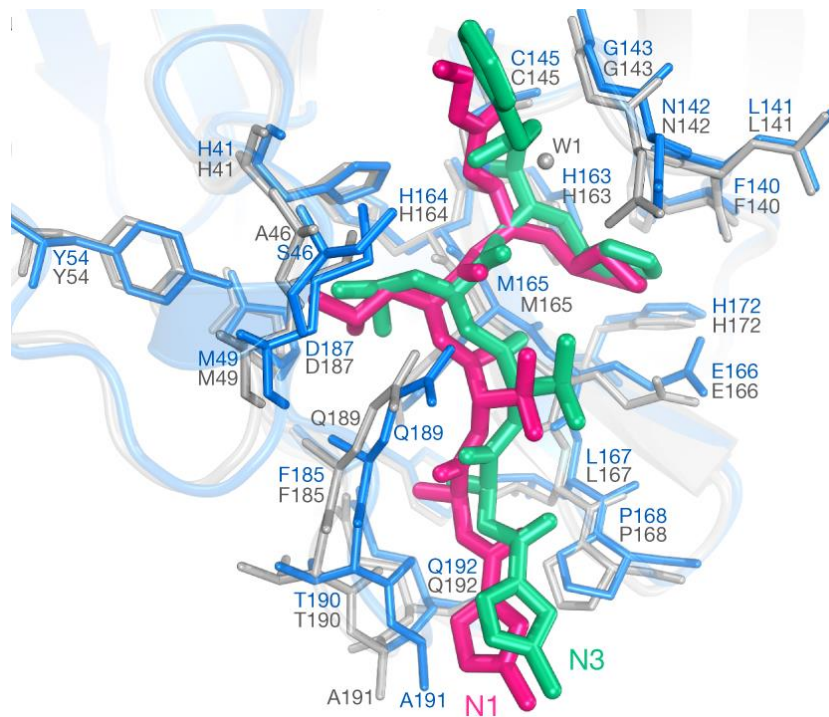


Figura 7. Comparación del complejo de unión del inhibidor entre las estructuras SARS-CoV-2 M^{pro}-N3 y SARS-CoV M^{pro}-N1. El polipéptido de SARS-CoV-2 M^{pro} se muestra en azul, mientras que SARS-CoV M^{pro} en gris. Los inhibidores N3 y N1 se muestran en color verde y rosa, respectivamente.

Fuente:(Jin, Du, et al. (2020))

1.2.OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo General

Identificar y modelar mutaciones que otorgan resistencia a inhibidores de la enzima M^{pro} del virus SARS-CoV-2.

1.2.2. Objetivos específicos

- Identificar variaciones en los restos de aminoácidos del sitio de unión de inhibidores de la enzima M^{pro} del virus SARS-CoV-2
- Construir modelos tridimensionales de la M^{pro} del virus SARS-CoV-2 resistente a inhibidores.
- Predecir el efecto de mutaciones en los restos de aminoácidos del sitio de unión de inhibidores de la enzima M^{pro} del virus SARS-CoV-2 y el grado de resistencia sobre inhibidores de la enzima.

1.3.HIPOTESIS

1.3.1. Hipótesis nula

Mutaciones en la enzima M^{pro} del virus SARS-CoV2 no otorgan resistencia a resistencia a inhibidores de esta enzima proteasa.

1.3.2. Hipótesis Alternativa

Mutaciones en la enzima M^{pro} del virus SARS-CoV2 otorgan resistencia a resistencia a inhibidores de esta enzima proteasa.

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales, equipos y reactivos

2.1.1 Materiales

Páginas web

- Protein Data Bank (PDB)
- Universal Protein (UniProt)
- T-Coffee
- Boxshade
- YASARA
- Arpeggio

Software Bioinformáticos

- WinCoot
- PyMOL
- GOLD - Protein Ligand Docking Software
- Microsoft Office

Archivos PDB

- 6YB7
- 7BUY
- 7BQY

2.1.2. Equipos

- Computadora personal
- Arthur (Computadora del grupo de investigación)

2.2 Métodos.

1.1. Análisis de homología de M^{pro} de SARS-CoV-2

UniProt es una base de datos gratuita que registra una gran cantidad de información sobre proteínas, incluyendo su secuencia de aminoácidos. Esta información proveniente de secuenciaciones genómicas publicadas en revistas científicas y depositada en bases de datos como el GenBank. Para realizar el análisis de identidad de secuencia UniProt utiliza el algoritmo BLAST, herramienta de búsqueda de alineación local básica, que permite localizar regiones similares entre la secuencia objetivo y todos los archivos depositados en UniProt. De esta forma, tanto el programa como el usuario pueden inferir relaciones evolutivas y funcionales de la proteína en estudio, mediante ciertos parámetros cuantificables.

El análisis BLAST se realizó tomando como referencia la secuencia de aminoácidos de la estructura de la proteína M^{pro} (6YB7) disponible en el Protein Data Bank (PDB). De esta forma se obtuvo la secuencia nativa y código de acceso UniProt de la enzima.

En cuanto al alineamiento de secuencias, se realizó ingresando a la página UniProt (<https://www.uniprot.org/>), en donde se seleccionó la opción “BLAST” (**Figura 8**). Con esto se abrió otra pestaña en la cual se visualizó el formulario de la herramienta. En el espacio en blanco del formulario se insertó la secuencia de aminoácidos en formato FASTA de 6YB7 descargada del PDB. Los parámetros de búsqueda se mantuvieron en

los valores preestablecidos por defecto, excepto para la opción “Hits” para la cual se escogió 50. Por último, se seleccionó el botón “Run BLAST” para iniciar el algoritmo de alineamiento. Para concluir, se analizaron los datos desplegados de acuerdo al Score (puntuación de alineamiento) y el porcentaje de identidad de secuencia.

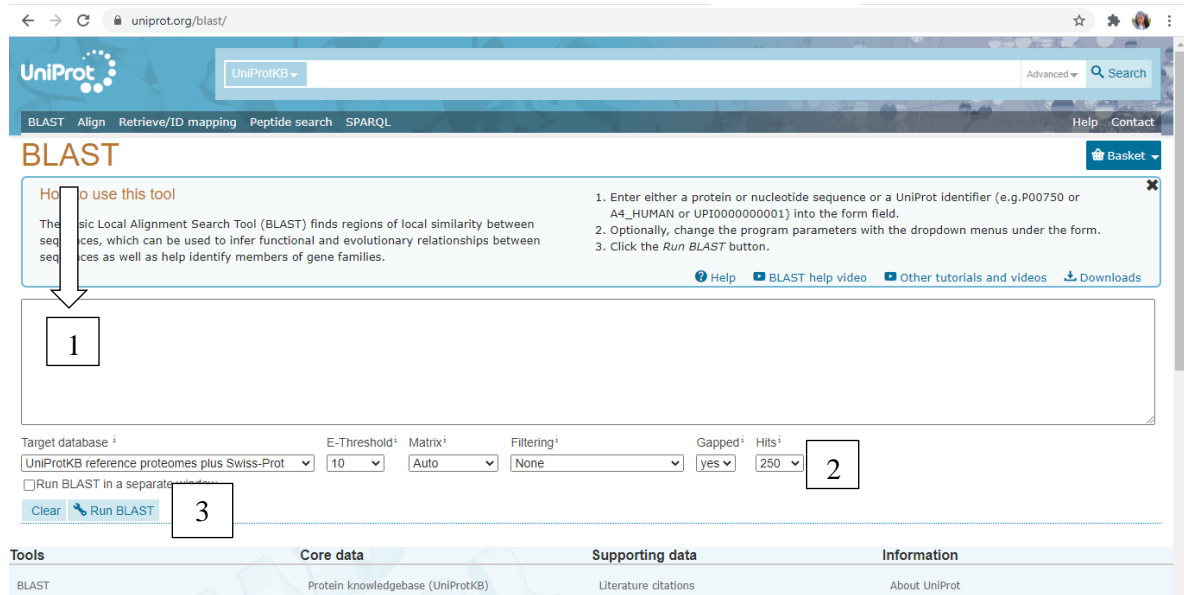


Figura 8 Servidor UniProt. 1. Insertar la secuencia a analizar. 2. Escoger el número de Hits. 3. Correr el BLAST

En un ejercicio preliminar, el primer resultado obtenido fue la secuencia de la replicasa pp1ab con el código P0DTC1, de la cual se tomó los aminoácidos entre 3264-3564 que codifican para la proteasa M^{PRO}. Con esta secuencia se repitió el análisis BLAST con el fin de evitar modificaciones introducidas por los autores en el proceso de clonación, expresión y purificación de M^{PRO} para la obtención de la estructura 6YB7. Se escogieron los primeros resultados de la lista y se procedió a descargar las secuencias de las proteínas homólogas en su formato FASTA, dando clic en el código de cada proteína y copiándolo la secuencia a una hoja de texto, en este caso Word. Nuevamente, se analizaron los datos desplegados de acuerdo al Score y el porcentaje de identidad de secuencia.

1.2. Alineamiento de secuencias homólogas

Se realizó un alineamiento entre todas las secuencias de proteínas seleccionadas a partir del BLAST de UniProt empleando sus secuencias en formato FASTA. En Word se colocaron todas las secuencias junto a la de la proteína M^{pro} de SARS-CoV-2 en el orden descendente de homología y con un código que las diferencia entre ellas. Luego, se realizó el alineamiento múltiple mediante la herramienta T-Coffee (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:regular>), donde se colocó las secuencias FASTA en el espacio disponible. Finalmente se seleccionó “Submit”, y una vez terminado el alineamiento se descargaron los resultados en formato “fasta_aln”.

Para la generación de ilustraciones coloreadas que faciliten el análisis del alineamiento múltiple se empleó la herramienta Boxshade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Aquí se ingresaron los resultados descargados de T-Coffee en la ventana en blanco, y se descargaron los resultados en formato “RTF_new”. El alineamiento se analizó en Word.

Con este procedimiento se visualizaron los aminoácidos de las proteínas alineadas de los diferentes organismos que se encuentran conservados, especialmente aquellos relacionados con el sitio de unión a inhibidores. De acuerdo al alineamiento de secuencias, se identificaron aquellos residuos del sitio activo susceptibles a sufrir mutaciones.

1.3. Identificación de aminoácidos claves que forman interacciones no covalentes con el inhibidor

Para la determinación de aminoácidos claves en la enzima M^{pro}, responsables de la unión de los inhibidores N3 (Código PDB 7BQY) y Carmofur (Código PDB 7BUY), se utilizaron los programas WinCoot y PyMOL, que permiten la construcción, validación y visualización de modelos tridimensionales de macromoléculas. Ambas herramientas permiten además emplear bibliotecas, como Python, para realizar análisis más completos y complejos de estructuras moleculares.

En ambas aplicaciones se analizaron los residuos que se unen a inhibidores mediante la herramienta de medición de distancias atómicas ambientales. En Wincoot se ajustó la

distancia de las posibles interacciones no covalentes a un rango entre 1,8 y 4 Å. Para ello se accedió a la opción “Measure” de la barra de herramientas y se seleccionó “Environment y Distance”. Es así que se identificaron las interacciones que se forman entre los inhibidores y residuos de aminoácidos de M^{pro}.

Posterior a ello, se buscaron dichos los residuos que interactúan con los inhibidores en el alineamiento múltiple de secuencias, con la finalidad de establecer relaciones de homología. Finalmente, se realizó un análisis de los nucleótidos que traducen a la proteasa. La secuencia de ADN complementaria se obtuvo en formato FASTA y se identificaron los codones que traducen los aminoácidos claves.

Se determinaron las mutaciones que podría sufrir M^{pro} tomaron en cuenta únicamente aquellas que se producirían con un cambio en la traducción del aminoácido con una variación puntual.

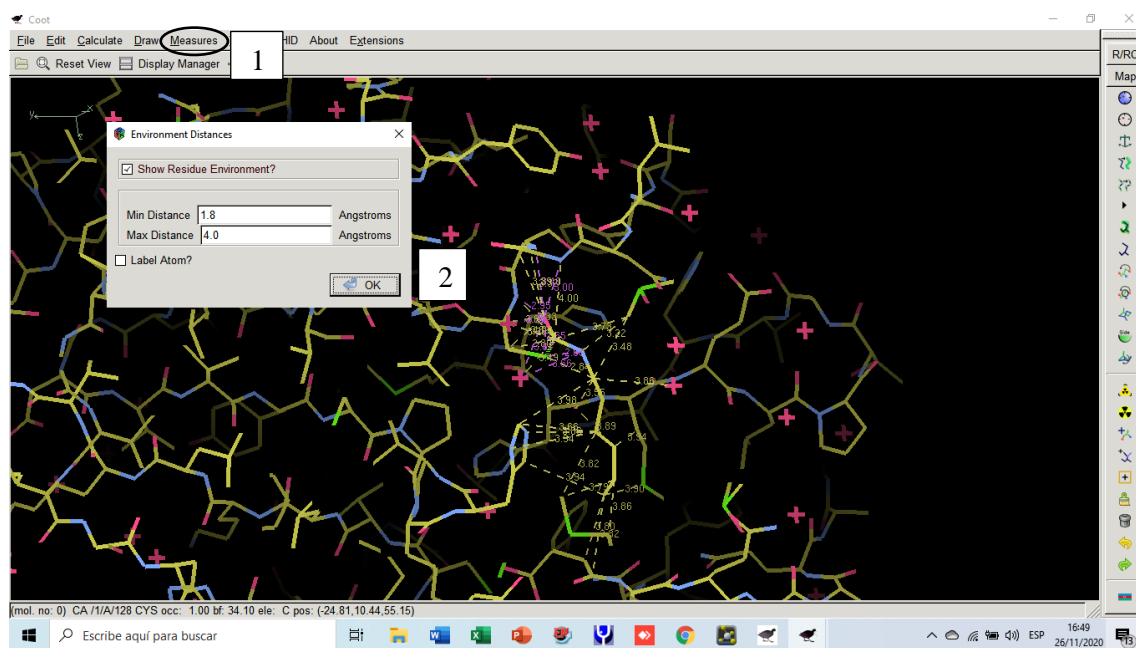


Figura 9 Software Wincoot. 1. Opción Measure para la medición de interacciones. 2. Establecer las distancias

1.4. Construcción de modelos tridimensionales de variantes mutantes de la proteasa M^{pro} de SARS-CoV-2

Una vez identificadas las potenciales mutaciones puntuales que podrían ocurrir de forma natural en la proteasa M^{pro}, se construyeron modelos tridimensionales de la enzima tomando como punto de partida la estructura nativa de M^{pro} (6YB7). Para ello se extrajo el archivo con las coordenadas tridimensionales de 6YB7 (extensión .pdb) de la base de datos Protein Data Bank (PDB; <https://www.rcsb.org>). Los modelos tridimensionales de las variantes mutantes se construyeron con el programa WinCoot.

Para ellos se identificó el aminoácido a mutar en la estructura y en la barra ubicada en la derecha se seleccionó la opción “mutación simple” (Señalada con la flecha en la figura 10). Con ello se desplegó una lista de aminoácidos, de la que se escogió el residuo apropiado para generar la mutación que deseamos construir.

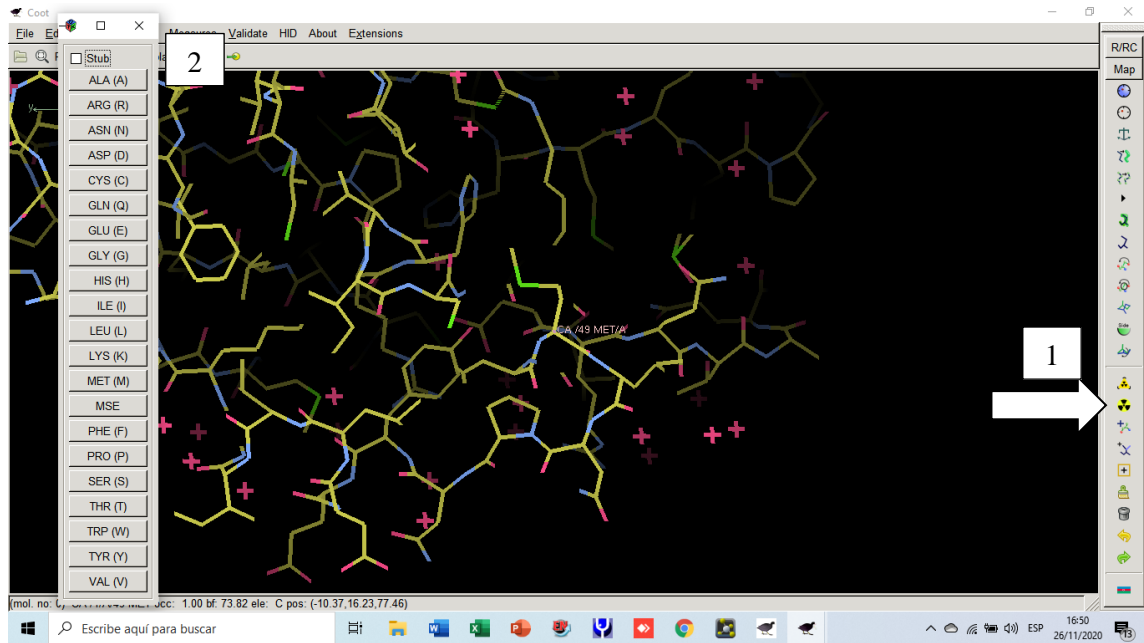


Figura 10. Software Wincoot. 1. Seleccionar el botón Mutación. 2. Escoger el aminoácido mutante

La minimización de energía se realizó para relajar a la estructura luego del cambio artificial producido en su secuencia, para lo cual se empleó YASARA (<http://www.yasara.org/minimizationserver.htm>). En la figura 11 se muestra la página

principal de este servidor y su configuración básica. Los archivos PDB de las variantes mutantes de M^{PRO} fueron cargadas mediante la opción “Seleccionar archivo”.

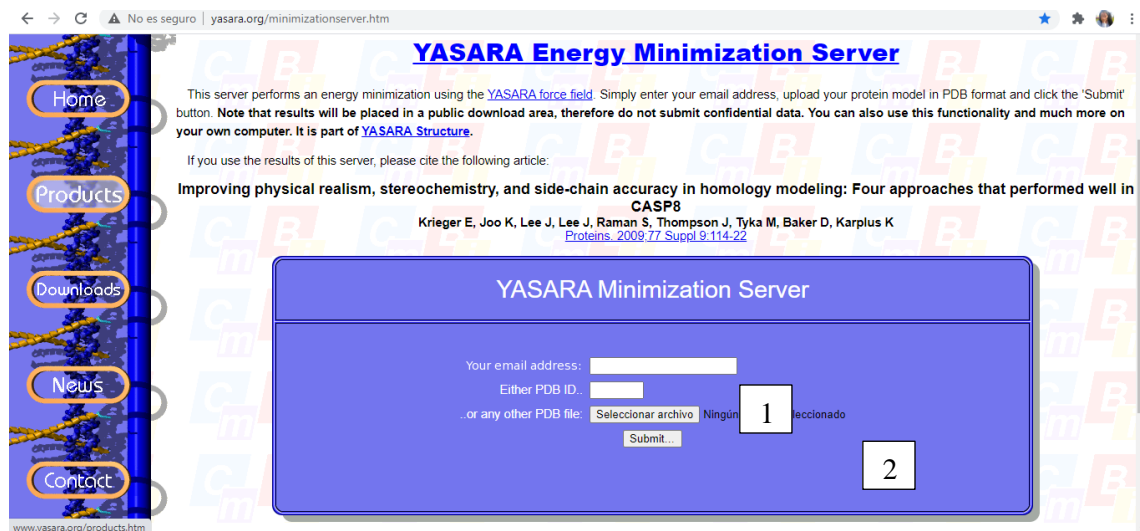


Figura 11. Servidor YASARA. 1. Insertar el email. 2. Seleccionar el archivo en formato PDB

1.5. Determinación de la resistencia de las variantes mutantes de la proteasa M^{PRO} de SARS-CoV-2

Los ensayos de acoplamiento molecular se realizaron mediante el programa de docking GOLD - Protein Ligand Docking Software que se basa en algoritmo genético para caracterizar y puntuar las posibles poses que puede adoptar una molécula (ligando) en un sitio determinado de una proteína y las potenciales interacciones no covalentes que podría formar.

Se empleó la estructura de la proteasa M^{PRO} en ausencia de ligandos (código PDB: 6YB7) y las variantes mutantes de la enzima construidas en el presente proyecto. El docking se realizó en el sitio activo de estas macromoléculas empleando como ligandos los inhibidores Carmofur y N3.

Es esencial preparar el ligando y la macromolécula antes de realizar el docking, tomando en cuenta que en cada una debe aparecer el átomo que se une covalentemente en ambas

estructuras. Para ello se agregó a los inhibidores un átomo de azufre mediante la modificación de su código SMILES.

Para iniciar los experimentos de docking, se cargó el archivo .pdb de M^{pro} y se eliminaron los hidrógenos y las aguas presentes en la estructura. Posterior a esto se extrajeron los ligandos presentes en M^{pro}. Este paso se repitió, tanto para la enzima nativa, como para sus variantes mutantes.

Como siguiente pasó, se seleccionó el sitio donde se realizó el docking, el cual corresponde al sitio activo de la enzima. Para ello se tomó como referencia el inhibidor presente en la enzima y se consideró a los residuos localizados a una distancia máxima de 4 Å, tomando como referencia al inhibidor, para el análisis. A continuación, se cargó el ligando objeto del docking (carmofur o N3) en su formato .mol2 y se agregó como ligando de referencia al inhibidor presente en la enzima nativa. El docking de Carmofur y N3 se realizó considerando la formación del enlace covalente. Para ello se seleccionó la opción “Covalent” en el menú de la proteína. El siguiente paso fue activar la opción “Define covalent docking” y “Ligand link mode: Atom radio”. Para el primer espacio en blanco se seleccionó el átomo S del aminoácido Cys145 y para el segundo, el átomo S del ligando preparado, que en el caso de Carmofur correspondía al número 10 y 99 para N3, según su identificación (**Figura 12.2**).

En la opción “Output Options” se especificó la carpeta en la cual se requería se descarguen los resultados. Finalmente se inició el algoritmo de acoplamiento molecular mediante el botón “Run Gold” (**Figura 12.3**).

Se analizaron los resultados del acoplamiento molecular tomando en cuenta los valores de energía libre calculados de la unión del ligando con la proteína.

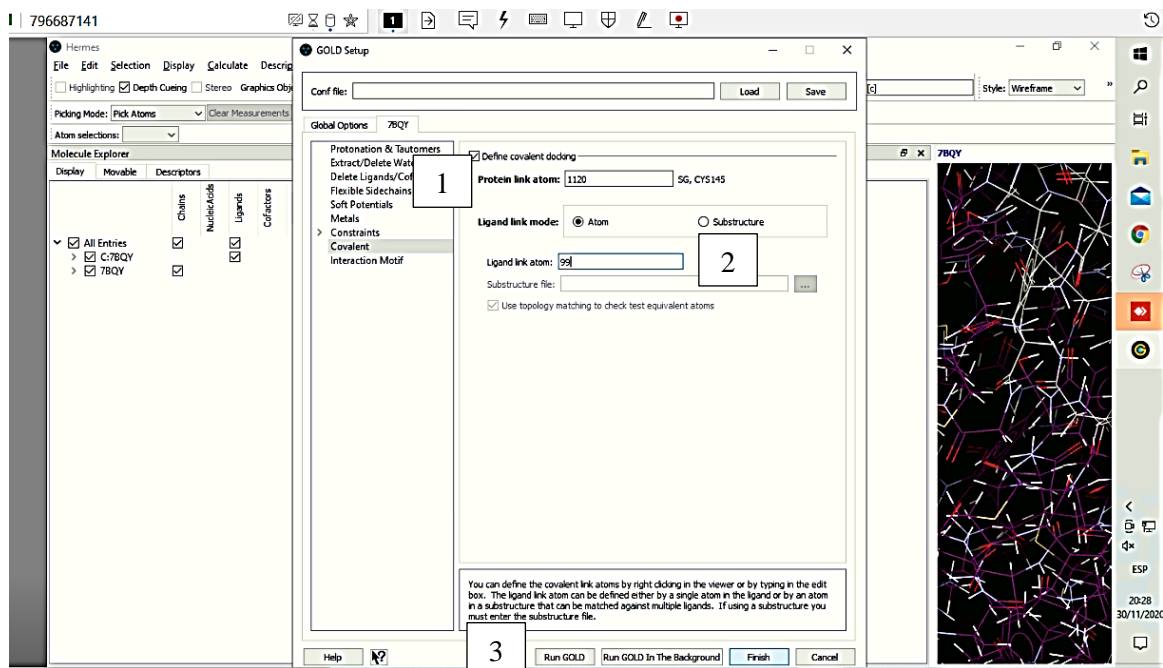


Figura 12. Ventana del Software Gold. 1. Opción para activar docking covalente 2. Espacio para colocar el número del átomo para la unión covalente 3. Botón Run Gold

1.6. Identificación de las interacciones de la M^{PRO} del SARS-CoV-2 mutada

Arpeggio (<http://biosig.unimelb.edu.au/arpeggioweb/>) es un servidor web creado por la Universidad de Cambridge, que permite calcular las interacciones entre proteínas y entre ligandos y proteínas. En esta herramienta web se subieron los archivos PDB que contenían los mejores resultados del docking, junto con su proteína (Paso 1). Se escogió la cadena B que es el inhibidor, para que se calcule las interacciones que forma éste (Paso2). Un ejemplo de los resultados obtenidos se pueden observar en la **Figura13.3**, los cuales muestran los tipos de enlace que se producen entre el inhibidor y la estructura de la proteína. Los archivos generados por Arpeggio se visualizaron y analizaron en en PyMol.

Calculate Interactions

Step 1: Choose a molecule

Warning We can not guarantee the security of molecules in transit or storage. Uploading is at your own risk.

Submit a molecule in **PDB format**. Please upload or select a Protein Data Bank file resolved to atomistic detail. [What happens to my PDB file?](#)

File Upload
[Seleccionar archivo] Ningún archivo **1**

OR

PDB Accession
[]

Step 2 »

Step 2: Select entit(ies) to calculate interactions for

Entities to calculate contacts for

Heteroatom **2** ps
 Chain **B** / Resid

Chain-Everything Interactions
Interfaces between a chain and everything else in the structure.
 Chain **A**
 Chain **B**

Selection
Separate each selection with a new line. [How do I make a custom selection?](#)
Leave the selection blank to calculate all contacts.
/B/1/

Proserunido.pdb
This is a preview of your structure following preprocessing. Please let us know if something doesn't look right at this point, quoting paris-romeo-mango.

Mutually Exclusive Interactions	Feature Contacts
Total number of contacts 486	Hydrogen bonds 6
Of which VdW interactions 0	Water mediated hydrogen bonds 0
Of which VdW clash interactions 20	Weak hydrogen bonds 9
Of which covalent interactions 0	Water mediated weak hydrogen bonds 0
Of which covalent clash interactions 3	Halogen bonds 0
Of which proximal 455	Ionic interactions 0
	Metal complex interactions 0
	Aromatic contacts 3
	Hydrophobic contacts 30
	Carbonyl interactions 1

Download All Results

3 **Download PyMOL Session**

Figura 13 Servidor Arpeggio. 1. Seleccionar el archivo PDB. 2. Elegir la cadena para calcular los contactos. 3. Descargar el PYMOL con los resultados.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de resultados

3.3.1. Secuencias homólogas de M^{pro} de SARS-CoV-2

Las secuencias homólogas con mayor Score y porcentaje de identidad a la de la proteasa M^{pro} del SARS-CoV-2 se presentan en la **Tabla 2**. Junto con dichos parámetros se analizó el valor de E.

Tabla 2 Secuencia homólogas de M^{pro} SARS-CoV-2

N	RESULTADOS	CÓDIGO ALINEAMIENTO
1	Replicase polyprotein 1a Bat coronavirus 279/2005 (BtCoV) E-value: 0.0 Score: 1604 Ident.: 96.1%	BtCoV_279_2
2	2'-O-methyltransferase BtRf-BetaCoV/HeB2013 E-value: 0.0 Score: 1601 Ident.: 95.8%	BtRf-BetaCoV_He
3	Replicase polyprotein 1a Human SARS coronavirus (SARS-CoV) E-value: 0.0 Score: 1600 Ident.: 96.1%	SARS-CoV
4	Q6UZF5_CVHSA - 2'-O-methyltransferase SARS coronavirus PUMC02 E-value: 0.0 Score: 1600 Ident.: 96.1%	SARS-CoV_PUMC02
5	3C-like proteinase Bat SARS-like coronavirus YNLF_31C E-value: 0.0 Score: 1599 Ident.: 95.8%	BtSARS_Cov_YNLF

La secuencia de aminoácidos de M^{PRO} del SARS COV-2 está constituida por 306 residuos. El porcentaje de identidad de las primeras cinco estructuras homólogas se encuentran entre un rango de 96,1 a 95.8% (**Tabla 2**), lo cual sugiere que M^{PRO} del SARS-CoV-2 mantiene un alto grado de conservación con otras proteasas de coronavirus.

El valor de E representa el número de alineamientos que se pueden esperar entre secuencias entre la base de datos del BLAST. Es así que, mientras más cercano sea a cero, más significativo es el alineamiento (**Benavides-Oro, Peña-López, Cutiño-Viñals, Contreras-Quesada, & Morris-Quevedo, 2020**). En todos los resultados el valor de E fue menor a 0,0001, lo cual demuestra que efectivamente existe similitud entre secuencias. Los códigos PDB, junto con el nombre, los parámetros y el Código de la secuencia para el alineamiento de los resultados completos se encuentran en el **Anexo1**.

En primera posición se encuentra la secuencia de la Replicase polyprotein 1a Bat coronavirus, lo cual confirma que ambos virus mantienen un ancestro en común (**Bzówka et al., 2020b**). Como tercera secuencia homóloga se encuentra el SARS-CoV con E-value de 0.0 y Score de 1600, lo cual concuerda con lo mencionado por **Li and Kang (2020)** que aseguran que tienen un alto porcentaje de similaridad. En la **Tabla 2** también se puede observar a otros coronavirus como BtCov, RousBtCov, MERS-CoV, MuHepatitis que comparten homología con M^{PRO} SARS-CoV-2 (**Cheng et al., 2010**).

3.3.2. Identificación y alineamiento de aminoácidos claves que forman interacciones con los inhibidores

Mediante el programa Wincoot se analizaron las interacciones que se producen entre la M^{PRO} del SARS-COV-2 y los inhibidores N3 y Carmofur. En la **Tabla 3** se presentan los aminoácidos que interaccionaron con dichos inhibidores en una distancia de 1,8 a 4 Å. Carmofur al ser una cadena corta, interacciona únicamente con ocho aminoácidos. Mientras que N3 forma interacciones con veinte y cuatro aminoácidos.

Tabla 3. Aminoácidos de M^{PRO} SARS-CoV-2 que interactúan con inhibidores

Carmofur	N3
His41 Met49 Gly143 Ser144 Cys145	Thr26 Leu27 His41 Ser46 Met49 Phe140
His164 Met165 Asp187	Leu141 Asn142 Gly143 Ser144 Cys145
	His163 His164 Met165 Pro168 His172
	Arg188 Gln189 Thr190 Gln192 Ala 191
	Leu 167 Phe185 Asp187

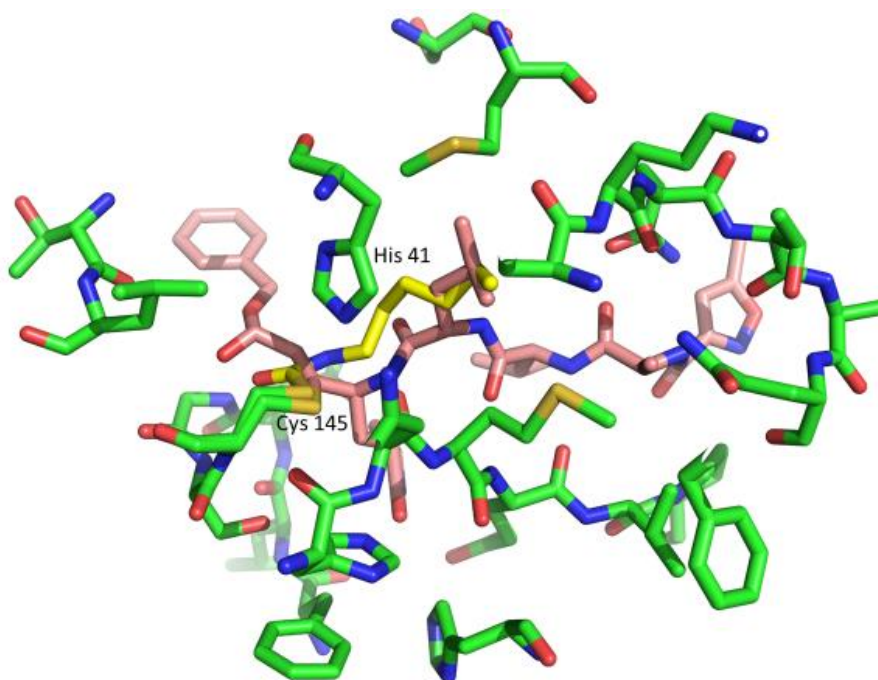


Figura 14. Estructura en sticks de los aminoácidos que interaccionan con los inhibidores N3 (rosa) y Carmofur (amarillo). La díada catalítica se encuentra etiquetada.

En la **Figura 14** se representan los residuos que participaron en las diferentes interacciones. Cabe recalcar que como menciona **Zhou et al. (2019)** el azufre de la cisteína forma un enlace covalente tanto con Carmofur y con N3.

* *

SARS_CoV2 1 SGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTT**TLNGLWLD**DDVYCP**RHVICT**SED**MLNPNY**EDLLIR
BtCoV_279_2 1 SGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTT**TLNGLWLD**DDTVYCP**RHVICT**AED**MLNPNY**EDLLIR
BtRf-BetaCoV_He 1 SGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTT**TLNGLWLD**DDTVYCP**RHVICT**AED**MLNPNY**EDLLIR
SARS-CoV 1 SGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTT**TLNGLWLD**DDTVYCP**RHVICT**AED**MLNPNY**EDLLIR
SARS-CoV_PUMC02 1 SGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTT**TLNGLWLD**DDTVYCP**RHVICT**AED**MLNPNY**EDLLIR
BtSARS_Cov_YNLF 1 SGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTT**TLNGLWLD**DDTVYCP**RHVICT**AED**MLNPNY**EDLLIR
BtCoV_HKU3 1 SGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTT**TLNGLWLD**DDTVYCP**RHVICT**AED**MLNPNY**EDLLIR
BtCoV_Rp3_2 1 SGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTT**TLNGLWLD**DDTVYCP**RHVICT**AED**MLNPNY**EDLLIR
BtRf-BetaCoV_JL 1 SGFKKVAFPSGKVEGCMVQVTCGTT**TLNGLWLD**DDTVYCP**RHVICT**VED**MLNPNY**EDLLIR
Bat_Hp-betaCoV_ 1 SGIRKMSCPTGKVERCMVRVTCGTM**TLNGLWLD**DNTVYCP**RHVICT**PEEL**LAPDY**DSILLR
RousBtCoV 1 AGLAKMAHPSGLVEPCIVKVSYGTM**TLNGLWLD**NVYVLC**PRHV**LCT**RDDLV**NP**DY**Q**RLSMR**
BtCoV_HKU9-5-2 1 AGLTRMAHPSGLVEPCVVKVSYS**GMTLNGLWLD**NFV**MCPRHV**MCS**RDELQ**NP**DY**ARLSMR
BtCoV_HKU9-5-1 1 AGLTRMAHPSGLVEPCVVKVSYS**GMTLNGLWLD**NFV**MCPRHV**MCS**RDELQ**NP**DY**ARLSMR
BtVs-BetaCoV_SC 1 SGLVKMSPSGDVEACMVQVTCGSM**TLNGLWLD**NYV**WCPRHV**MCP**ADQL**ND**PNY**DGLLIS
MERS1_BetaC 1 SGLVKMSPSGDVEACMVQVTCGSM**TLNGLWLD**NTV**WCPRHV**MCP**ADQL**SD**PNY**DALLIS
MERS-CoV 1 SGLVKMSPSGDVEACMVQVTCGSM**TLNGLWLD**NTV**WCPRHV**MCP**ADQL**SD**PNY**DALLIS
BetaCoV_Erinace 1 SGLVKMAHPSGAVEQCIVQVTCGSM**TLNGLWLD**NIVYCP**RHVICT**QD**QLV**DP**NY**DALLNS
MuHepatitis 1 SGIVKMFVPTSKVEPCVVS**VTYGNM**TLNGLWLD**DKVYCP**RHV**IC**SS**ADMT**DP**DY**SNLLCR
BtCoV_HKU5-2 1 SGLVKMAAPSGVVENCMVQVTCGSM**TLNGLWLD**NYV**WCPRHV**MCP**ADQL**SD**PNY**DALLVS
BtCoV_HKU5_ 1 SGLVKMAAPSGVVENCMVQVTCGSM**TLNGLWLD**NYV**WCPRHV**MCP**ADQL**SD**PNY**DALLVS
MuCoV_JHM 1 SGIVKMSVPTSKVEPCVVS**VTYGNM**TLNGLWLD**DKVYCP**RHV**IC**SS**ADMT**DP**DY**PNLLCR
RaCoV_HKU14 1 SGIVKMSVPTSKVEPCVVS**VTYGNM**TLNGLWLD**DKVYCP**RHV**IC**SS**ADMT**DP**DY**PNLLCR
MuCoV_hepat 1 SGIVKMSVPTSKVEPCVVS**VTYGNM**TLNGLWLD**DKVYCP**RHV**IC**SS**ADMT**DP**DY**PNLLCR
BtCoV_HKU4_ 1 SGLVKMSAPSGAVENCIVQVTCGSM**TLNGLWLD**NTV**WCPRH**IMCP**ADQL**TDP**NY**DALLIS

*

** *

SARS_CoV2 118 YNGSPSGVYQCAMRPNFTIKGS**FLNGSC**GSVGFNIDYDCVS**FCYMH**HE**MLPT**GVHAGTDL
BtCoV_279_2 118 YNGSPSGVYQCAMRPNFTIKGS**FLNGSC**GSVGFNIDYDCVS**FCYMH**HE**MLPT**GVHAGTDL
BtRf-BetaCoV_He 118 YNGSPSGVYQCAMRPNFTIKGS**FLNGSC**GSVGFNIDYDCVS**FCYMH**HE**MLPT**GVHAGTDL
SARS-CoV 118 YNGSPSGVYQCAMRPNHTIKGS**FLNGSC**GSVGFNIDYDCVS**FCYMH**HE**MLPT**GVHAGTDL
SARS-CoV_PUMC02 118 YNGSPSGVYQCAMRPNHTIKGS**FLNGSC**GSVGFNIDYDCVS**FCYMH**HE**MLPT**GVHAGTDL
BtSARS_Cov_YNLF 118 YNGSPSGVYQCAMRPNHTIKGS**FLNGSC**GSVGFNIDYDCVS**FCYMH**HE**MLPT**GVHAGTDL
BtCoV_HKU3 118 YNGSPSGVYQCAMRPNHTIKGS**FLNGSC**GSVGFNIDYDCVS**FCYMH**HE**MLPT**GVHAGTDL
BtCoV_Rp3_2 118 YNGSPSGVYQCAMRPNHTIKGS**FLNGSC**GSVGFNIDYDCVS**FCYMH**HE**MLPT**EVHAGTDL
BtRf-BetaCoV_JL 118 YNGSPSGVYQCAMRPNFTIKGS**FLNGSC**GSVGFNIDYDCVS**FCYMH**HE**MLPT**GVHAGTDL
Bat_Hp-betaCoV_ 118 YNGMPAGVYQVAMRPNHTIKGS**FLNGSC**GSVGYTLGYDRVE**FCYMH**HE**MLPT**GVHTGTDL
RousBtCoV 118 YDGIPAGVYCTLRANGLRAA**FLCGSC**SGSPGFV**MNGKEVQFCY**L**HQLELP**NG**HT**GTDM
BtCoV_HKU9-5-2 118 YDGVPTGVYCTLRNSGTLKAS**FLCGSC**SGSPGFV**MNGKEVQFCY**Q**HQLELP**NG**HT**GTDM
BtCoV_HKU9-5-1 118 YDGVPTGVYCTLRNSGTLKAS**FLCGSC**SGSPGFV**MNGKEVQFCY**Q**HQLELP**NG**HT**GTDM
BtVs-BetaCoV_SC 121 YNGRPTGTFTVVMRPNHTIKGS**FLCGSC**GSVGYTKEGNV**INFCYMH**Q**ME**LANG**HT**GSFF
MERS1_BetaC 121 YNGRPTGTFTVVMRPNFTIKGS**FLCGSC**GSVGYTKEGSV**INFCYMH**Q**ME**LANG**HT**GSFF
MERS-CoV 121 YNGRPTGTFTVVMRPNFTIKGS**FLCGSC**GSVGYTKEGSV**INFCYMH**Q**ME**LANG**HT**GSFF
BetaCoV_Erinace 121 YNGRPSGTYTVMRPNSTIKGS**FLCGSC**GSVGYVKEGNV**INFCYMH**Q**ME**LSNG**HT**GSFF
MuHepatitis 118 YNGKSGAFHV**TMRS**SYT**IKGSFLCGSC**GSVGYVLTGDSV**RFVYMH**Q**LE**LS**TGCH**TGTDf
BtCoV_HKU5-2 121 YNGRPTGVFMVNM**RQNSTIKGSFLCGSC**GSVGYTQEGNV**INFCYMH**Q**ME**LSNG**HT**GCsf
BtCoV_HKU5_ 121 YNGRPTGVFMVNM**RQNSTIKGSFLCGSC**GSVGYTQEGNV**INFCYMH**Q**ME**LSNG**HT**GCaf
MuCoV_JHM 118 YNGRPQGA**FHV**MRSS**HTIKGSFLCGSC**GSVGYVLTGDSV**RFVYMH**Q**LE**LS**TGCH**TGTDf
RaCoV_HKU14 118 YNGRPQGA**FHV**MRSS**F**T**IKGSFLCGSC**GSVGYVLMGDCV**KFVYMH**Q**LE**LS**TGCH**TGTDf
MuCoV_hepat 118 YNGRPQGA**FHV**MRSS**HTIKGSFLCGSC**GSVGYVLTGDSV**RFVYMH**Q**LE**LS**TGCH**TGTDf
BtCoV_HKU4_ 121 YNGKPTGVFTV**NLRH**NST**IKGSFLCGSC**GSVGYTENGGV**INFCYMH**Q**ME**LSNG**HT**GSFF

```

* * **
SARS_CoV2      178 EGNFYGPFVDRQTAQAAGTDTTITVNVLAWLYAAVINGDRWFLNRFTTTLNDFNLVAMKY
BtCoV_279_2    178 EGKFGYGFVDRQTAQAAGTDTTITLNVLAWLYAAVINGDRWFLNRFTTTLNDFNLVAMKY
BtRf-BetaCoV_He 178 EGKFGYGFVDRQTAQAAGTDTTITLNVLAWLYAAVINGDRWFLNRFTTTLNDFNLVAMKY
SARS-CoV       178 EGKFGYGFVDRQTAQAAGTDTTITLNVLAWLYAAVINGDRWFLNRFTTTLNDFNLVAMKY
SARS-CoV_PUMC02 178 EGKFGYGFVDRQTAQAAGTDTTITLNVLAWLYAAVINGDRWFLNRFTTTLNDFNLVAMKY
BtSARS_Cov_YNLF 178 EGKFGYGFVDRQTAQAAGTDTTITLNVLAWLYAAVINGDRWFLNRFTTTLNDFNLVAMKY
BtCov_HKU3     178 EGKFGYGFVDRQTAQAAGTDTTITLNVLAWLYAAVINGDRWFLNRFTTTLNDFNLVAMKY
BtCoV_Rp3_2    178 EGKFGYGFVDRQTAQAAGTDTTITLNVLAWLYAAVINGDRWFLNRFTTTLNDFNLVAMKY
BtRf-BetaCoV_JL 178 EGKFGYGFVDRQTAQAAGTDTTITLNVLAWLYAAVINGDRWFLNRFTTTLNDFNLVAMKY
Bat_Hp-betaCoV_ 178 EGTFYGDVDRQTSQSAGSDNTLTLNVLAWLYAAVINGDRWFIVPQTCALTDFTAVLKY
RousBtCoV      178 HGAIFYGPFEDKQVPQLASPDTVITVNVLAWLYAAVLSGESWVTKLGITAAEFNTSAVKY
BtCoV_HKU9-5-2 178 SGVFGYGFEDKQVPQLAAPDCTITVNVLAWLYAAVLSGENWFLTKSSITPAEFNCAVKY
BtCoV_HKU9-5-1 178 SGVFGYGFEDKQVPQLAAPDCTITVNVLAWLYAAVLSGENWFLTKSSITPAEFNCAVKY
BtVs-BetaCoV_SC 181 DGNMYGAFQDRQVHQALQTDKYCTVNI VAWLYAAILNGCTWVFKPRTSVVVFNEWAMAN
MERS1_BetaC    181 DGTMYGAFMDKQVHQVQLTDKYCSVNVVAVLYAAILNGCAWFKPNRTSVVVFNEWALAN
MERS-CoV       181 DGTMYGAFMDKQVHQVQLTDKYCSVNVVAVLYAAILNGCAWFKPNRTSVVVFNEWALAN
BetaCoV_Erinace 181 DGNMYGNFQDRQIYQAQLSDKHCTINVVAVLYAAVLSGENWVFKPNKTGVAAFNEWALSN
MuHepatitis    178 SGNFYGPFYRDAQVVQLPVQDYTQTVNVVAVLYAAILNRCNWFVQSDSCSLEEFNVWAMTN
BtCoV_HKU5-2   181 DGVMYGA FEDRQVHQVQLSDKYCTINIVAWLYAAILNGCNWVFKPNKTGIATFNEWAMSN
BtCoV_HKU5_    181 DGVMYGA FEDRQVHQVQLSDKYCTINIVAWLYAAILNGCNWVFKPNKTGIATFNEWAMSN
MuCoV_JHM      178 SGNFYGPFYRDAQVVQLPVQDYTQTVNVVAVLYAAILNRCNWFVQSDSCSLEEFNVWAMTN
RaCoV_HKU14    178 NGDFYGFYKDAQVVQLPVQDYVQSVNFVAVLYAAILNRCNWFVQSDRCSLEDYNVWAMSN
MuCoV_hepat    178 SGNFYGPFYRDAQVVQLPVQDYTQTVNVVAVLYAAILNRCNWFVQSDSCSLEEFNVWAMTN
BtCoV_HKU4_    181 DGVMYGA FEDKQTHQLQTDKYCTINVVAVLYAAVLSGENWVFKPRTVGVIVTYNEWALSN

```

Figura 15. Alineamiento múltiple de secuencias de M^{pro} de diferentes virus. Los residuos en rojo representan los aminoácidos que interactúan con los inhibidores Carmofur y N3. El asterisco indica aquellos residuos clave para la unión de inhibidores y que tienen un menor grado de conservación, por lo cual son susceptibles a mutaciones.

Con base a los resultados presentados en la Tabla 3, en la **Figura 15** se detallan los aminoácidos que forman interacciones con los inhibidores, N3 y Carmofur y aquellos aminoácidos susceptibles de sufrir una mutación. Con estos resultados se puede comprobar la hipótesis de **Chuanjun et al. (2020)** quien afirma que la estructura M^{pro} del SARS-CoV-2 es muy cercana a la del SARS-CoV y varían únicamente en 12 aminoácidos. Los resultados del alineamiento exponen que los residuos catalíticos Cys145 e His 41 presentan un alto grado de conservación (**Lim, Shi, Mu, & Song, 2014; Zhou et al., 2019**), mientras que otros residuos que asisten en la unión del sustrato a la enzima son menos conservados, y por ende, pueden sufrir mutaciones durante la evolución del virus. Para elegir los aminoácidos a mutar se analizaron todas las secuencias y se identificaron los que difirieron entre ellas. Al realizar el análisis de los nucleótidos que traducen los

aminoácidos que interaccionan con los inhibidores (**Anexo 2 y 3**) se identificaron los cuales podrían presentar mutaciones puntuales, mismo que se presentan en la **Tabla 4**

Tabla 4. Mutaciones puntuales de aminoácidos

Aminoácido en la proteína Silvestre	Codón en la enzima silvestre	Aminoácido mutado	Codón que traduce aminoácido mutado
Ser	UCU	Ala	GCU
		Pro	CCU
Met	AUG	Leu	CUG
His	CAT	Gln	CAA - CAG
Pro	CCA	Ala	GCA
		Ser	UCA
Phe	UUU	Tyr	UAU
Arg	AGG	Lys	AAG
Thr	ACA	Ile	AUA
Ala	GCA	Ser	UCA
		Pro	CCA

Es así que, como muestra la **Tabla 5**, se predijeron veintiún mutaciones puntuales posibles. Estas mutaciones son producto de la sustitución de un solo nucleótido, el cual puede provocar un cambio en la traducción del aminoácido con respecto al presente en la estructura silvestre de M^{PRO} (**Bzówka et al., 2020a**).

Tabla 5 Mutaciones en la estructura de SARS-CoV-2

Carmofur		N3
Met49Leu	Ser46Ala	Ser46Val
His164	Ser46Pro	Ser46Arg
Met165	Ser46Gln	Met49Leu
	Asn142Cys	His164Gln
	Met165Leu	Pro168Ala
	Pro168Ser	Phe185Tyr
	Arg188Lys	Arg188Ala
	Thr190Val	Thr190Ile
	Ala191Pro	Ala191Ser
	Ala191His	Ala191Val
	Ala191Tyr	

En la figura 16 se representa los aminoácidos mutables y su posición. La mayor parte de mutaciones se produjeron en sitios accesibles a los disolventes como lo mencionó (**Sheik Amamuddy et al., 2020**). En la **Figura 14b**. se muestra en superficie el espacio que ocupan los inhibidores en M^{pro} SARS-CoV-2.

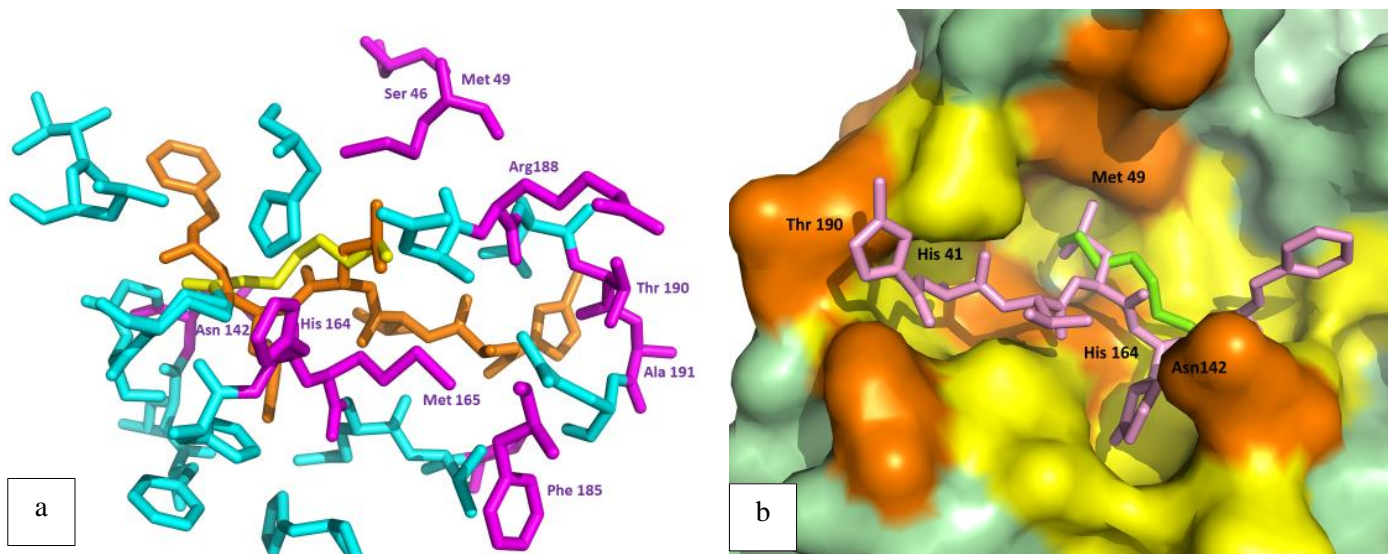
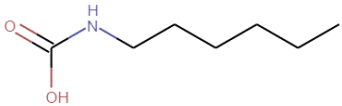
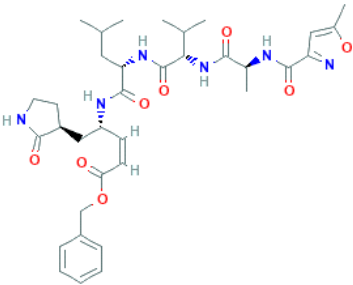


Figura 16 a. Estructura en stick que muestra los aminoácidos susceptibles a mutación (magenta). B. Estructura en superficie que muestra los aminoácidos susceptibles a mutación (naranja)

3.3.3. Docking covalente

Con la finalidad de prever el cambio conformacional y las interacciones con el inhibidor Carmofur y N3, se realizó el Docking molecular con las diez estructuras mutadas correspondientes a las mutaciones señaladas en la Tabla 5. Los detalles de los ligandos utilizados se encuentran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Ligandos empleados para el Docking en M^{PRO}.

Nombre del ligando	Estructura 2D	Código SMILES	Código
Carmofur		<chem>CCCCCNC(O)=O</chem>	CMF
N3		<chem>CC1=CC(=NO1)C(=O)NC(C)C(=O)NC(C(C)C)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CC2CCNC2=O)C=CC(=O)OCC3=CC=CC=C3</chem>	N3

Los resultados de los experimentos de docking se analizaron mediante la función CHEMPLP de GOLD. Los mejores resultados de veinte experimentos individuales se encuentran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Resultados del Docking de Carmofur y N3 en M^{pro}

PROTEASA	SCORE	S (PLP)
M ^{pro} -Carmofur		
Silvestre	67,91	-63,86
Met49Leu	69.09	-80.46
His164Gln	83.73	-85.86
Met165Leu	78.17	-83.46
M ^{pro} -N3		
Silvestre	120.07	-120.60
His164Gln	115.15	-115.29
Met165Leu	115.69	-122.64
Phe185Tyr	123.12	-123.90
Pro168Ser	100.80	-101.72
Ser46Ala	67.88	-74.94
Ser46Pro	122.65	-134.58
Thr190Ile	132.49	-134.10
Arg188Lys	124.70	-122.70
Met49Leu	124.09	-119.01
Pro168Ala	137.50	-131.78
Ala191Val	67.57	-82.69

Efecto de las variantes mutantes sobre el modo de unión de Carmofur a M^{pro}

ChemPLP es una función optimizada para la predicción de poses, que viene establecida por defecto en GOLD. La función CHEMPLP es utilizada para el acoplamiento covalente, considerando las cadenas laterales flexibles. Además tiene una penalización por los choques estéricos que pueden darse (Sheik Amamuddy et al., 2020). El Score de aptitud se toma como el negativo de la suma de todos los términos de la energía del componente ligando- proteína, de tal manera que las puntuaciones más altas, con las mejores (Cambridge Crystallographic, 2019). Al comparar el SCORE de la M^{pro} Silvestre, La

estructura de la mutación Met49Leu en complejo con Carmofur no se encuentra con gran variación en la energía de unión, ya que mantienen similares interacciones. En contraste, la mutación His164Gln arrojó el mayor Score. Se debe considerar que únicamente “backbone” de His participa de las interacciones que estabilizan a carmofur en el sitio activo, por lo que un cambio en la estructura de la cadena lateral, como ocurre en este caso, no implica serias modificaciones al modo de unión del inhibidor. De hecho, el cambio de His por Gln parece aumentar la afinidad del inhibidor por la enzima. Este aumento en comparación con la M^{pro} Silvestre se puede atribuir a que en el Score se penaliza los contactos entre proteína-ligando con impedimento estérico (**Verdonk, Cole, Hartshorn, Murray, & Taylor, 2003**), y Gln al ser un residuo con una cadena lateral menos voluminosa presenta una menor probabilidad de choques.

El Potencial Lineal por Partes (PLP) considera la direccionalidad, cargas del puente de hidrógeno e interacciones electrostáticas (**González-Paz, Paz, Vera-Villalobos, & Alvarado, 2020**). Al evaluar los resultados arrojados por GOLD, la diferencia de energía no represento un cambio significativo entre M^{pro} silvestre y las variantes mutantes estudiadas en complejo con Carmofur, ya que el número y los diferentes tipos de enlace se encuentran no varían en alto grado entre estructuras. Las mutaciones generadas aparentemente incrementan la capacidad de la enzima a unirse a Carmofur. Estos resultados indican que las mutaciones ensayadas sobre los residuos His164, Met49 y Met165 mejorarían el potencial uso de Carmofur como diana terapéutica.

Efecto de las variantes mutantes sobre el modo de unión de N3 a M^{pro}

El docking de N3 en las variantes mutantes de M^{pro} sugiere que cambios puntuales en la estructura del sitio activo de la enzima tienen una influencia en las propiedades de unión de este inhibidor a la enzima. Las diferencias en los valores de SCORE y PLP determinados para la unión de N3 se atribuyen a las diferentes interacciones que se forman o desaparecen al sustituir los aminoácidos de la proteína silvestre. Los resultados completos del docking se muestran en el **Anexo5**. Las mutaciones modeladas en M^{pro} Phe185Tyr, Ser46Pro, Thr190Ile, Arg188Lys, Pro168Ala en complejo con N3 presentaron mayor Score que la M^{pro} silvestre. Es decir, con la mutación de estos residuos

mejoro el acoplamiento de N3 en M^{pro}, ya que se formaron más interacciones. Por otro lado, la mutación de His165Gln, Met165Leu, Pro168Ser, Ser46Ala y Ala191Val disminuyeron su Score y energía PLP en comparación con la proteasa Silvestre.

Cabe recalcar que Phe185Tyr, Pro168Ser, Thr190Ile, Ala191Val, y Ser46Ala presentaron un valor de Clash Score diferente a cero. De acuerdo a **Ramachandran, Kota, Ding, and Dokholyan (2011)** este valor describe los choques presentes entre el ligando y la estructura de la proteína, por lo cual estas mutaciones alterarían significativamente la unión de N3 en el sitio activo de M^{pro} y podrían dar lugar al apareamiento de resistencias.

En el dominio catalítico se encuentran los residuos entre las posiciones 8 al 184 (**Barrila, Gabelli, Bacha, Amzel, & Freire, 2010**). Las mutaciones modeladas en entre mencionada región no provocan cambios estructurales relevantes, sin embargo, crean mayor número de enlaces por lo que el Score Aumenta.

En la **Figura 17 y 18** se representan los mejores resultados del Docking en las estructuras de M^{pro} SARS-CoV-2 silvestre y sus variantes mutantes. Al utilizar Docking rígido, el ligando es quien se orienta a la posición que les resulta mejor en cuanto a la energía, mediante movimientos de rotación y traslación.

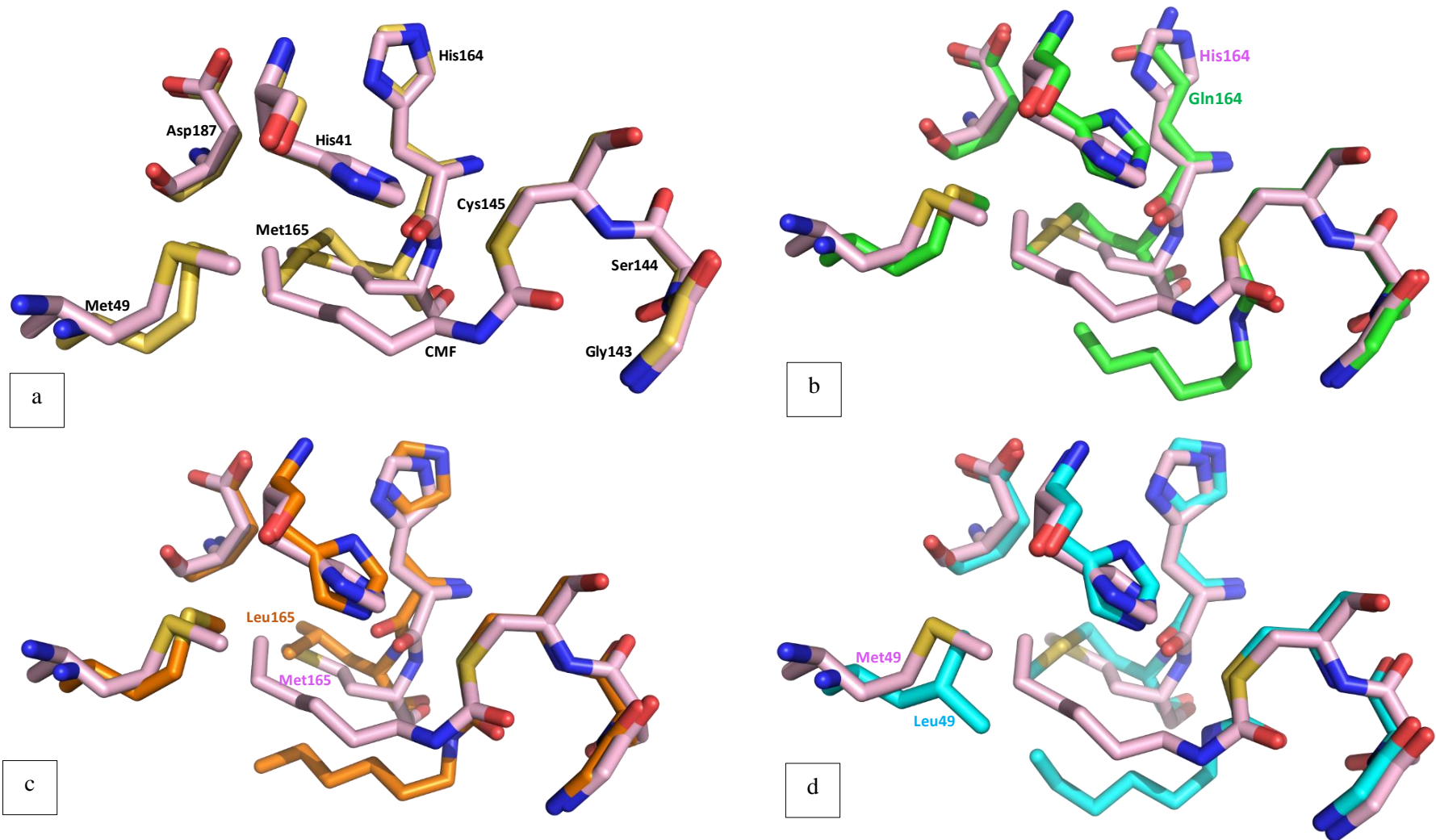
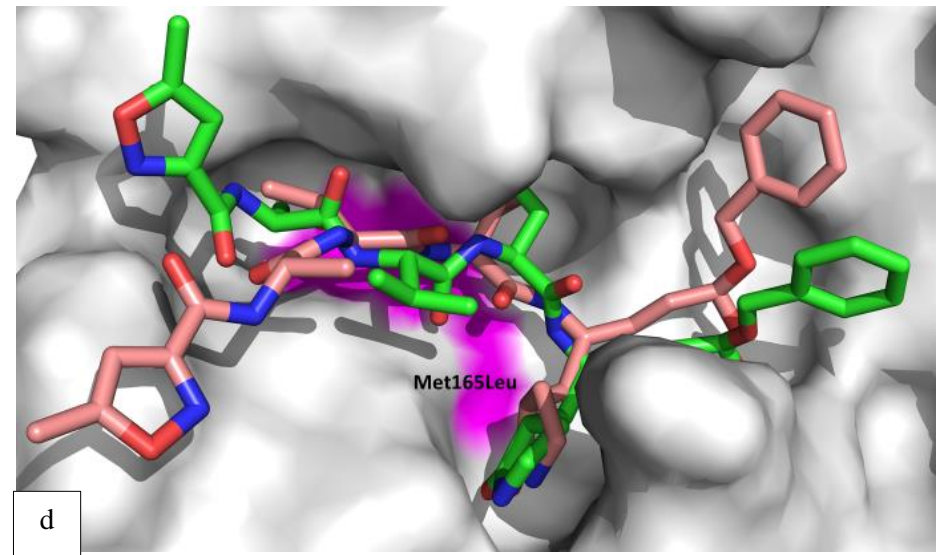
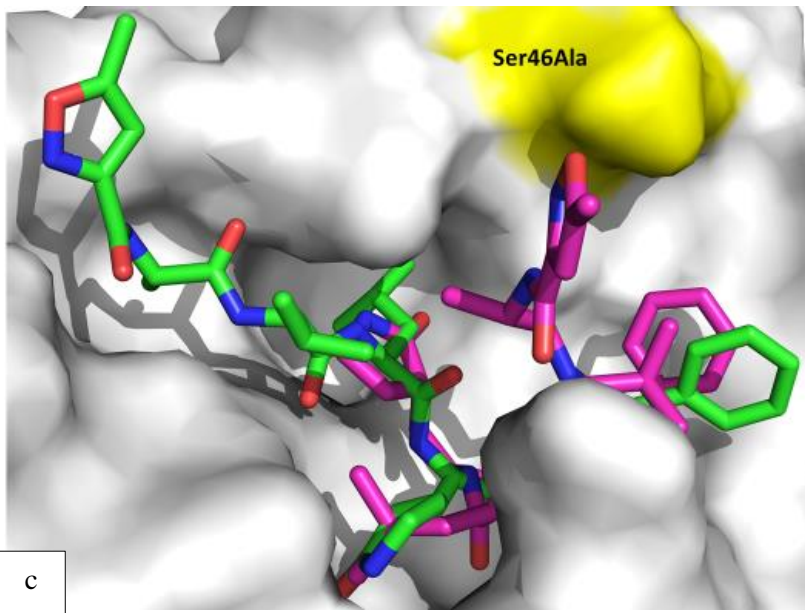
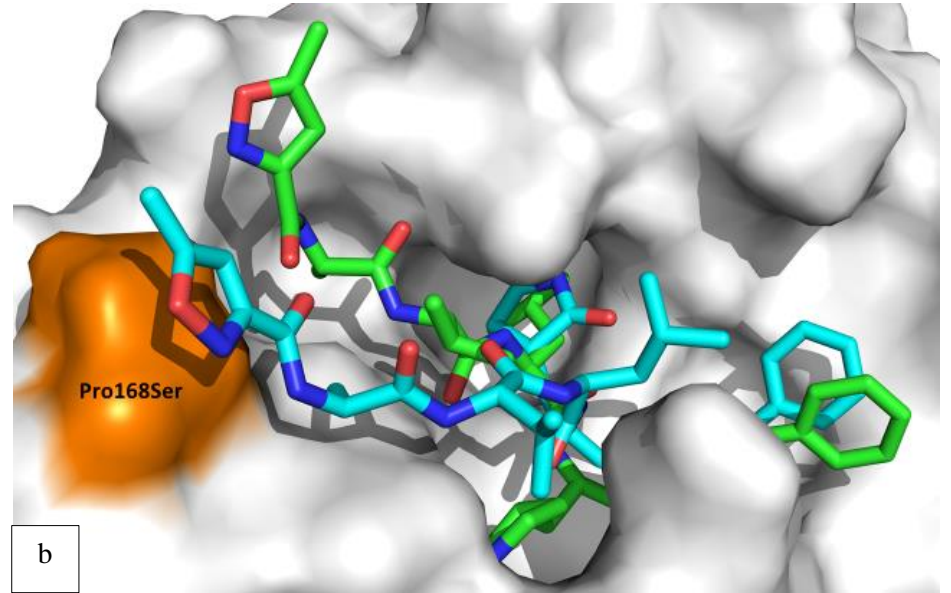
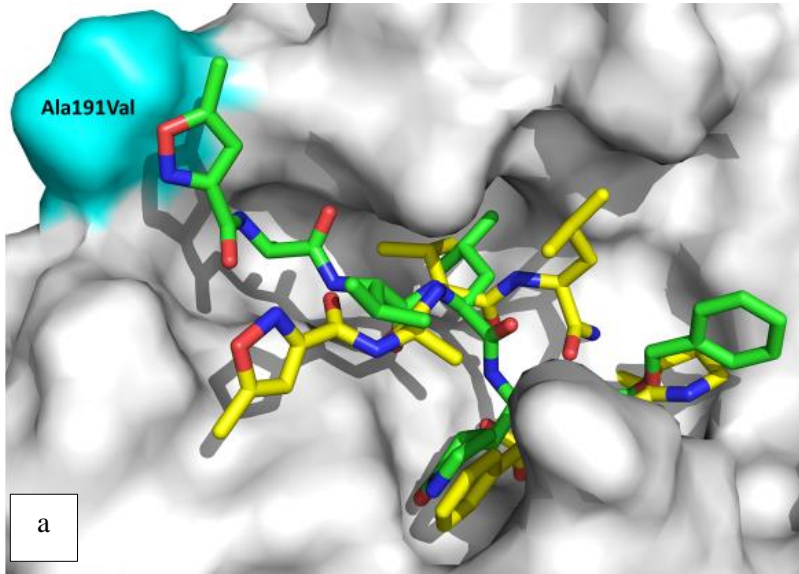
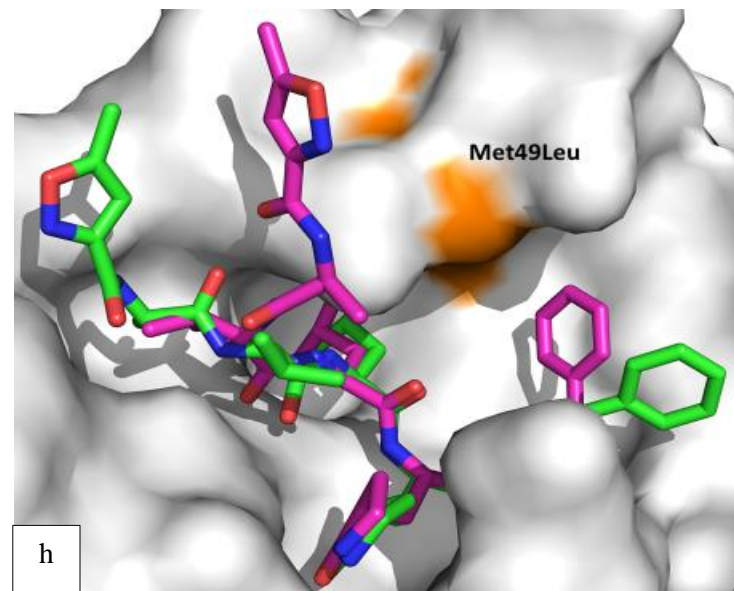
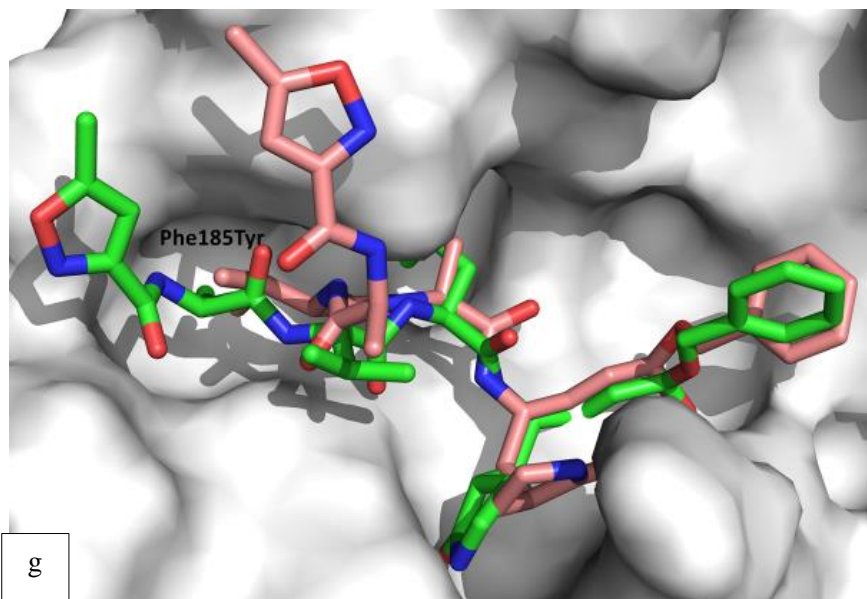
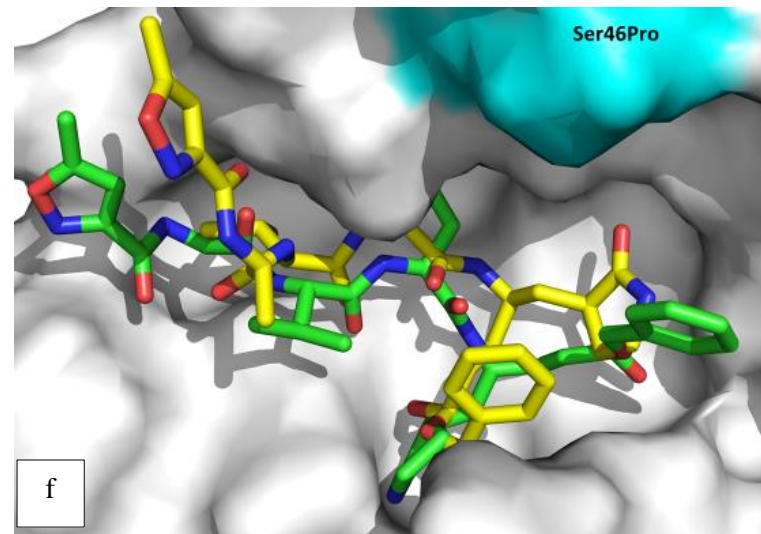
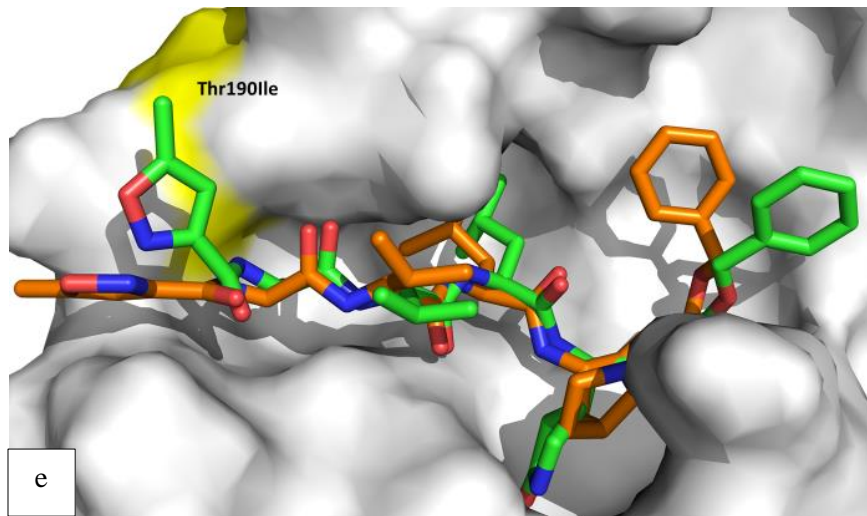


Figura 17. Representación en Sticks de las estructuras de M^{pro} SARS-CoV-2 en complejo con Carmofur a) M^{pro} Silvestre b) His164Gln, c) Met165Leu y d) Met49Leu49

En la **Figura 17a** se observa a M^{pro} sin inhibidor y en complejo con CMF. Carmofur al ser de tamaño pequeño no requiere que los residuos del sitio activo ajusten su posición de forma significativa. Únicamente los residuos Met49 y Met165 cambian ligeramente de posición para permitir la unión del inhibidor. Lo mismo ocurre en la posición His164 de la enzima silvestre y en la estructura del mutante His164Gln (**Figura17b**), debido a que no hay un cambio en la forma de unión ente CMF y la proteasa. Sin embargo, el cambio en la cola de CMF se lo atribuye a que el docking se lo realiza en presencia de un solvente, lo que cambia la flexibilidad del ligando. La mutación Met49Leu provoca un cambio en la estructura de His41 (**Figura 17c**) y un pequeño desplazamiento de la His164. De igual manera el cambio Met165Leu modifica la disposición del anillo de H41. Los residuos Ser144 y Cys145 se mantienen en su disposición silvestre, ya que ningún aminoácido mutado interacciona directamente con ellos.

En la **Figura 18** se muestra en superficie la disposición que toma N3 en presencia de las diferentes mutaciones. El cambio de Ala191Val provoca un cambio en el anillo de la cola de N3 de N3, desplazándolo(**Figura18a**). Al contrario de la mutación Pro168Ser, Arg188Lys y Ser46Ala que atrae dicho al anillo (**Figura18b,c,j**). En cuanto a la unión de N3 con Thr190 la variación más notable es el cambio en la disposición del anillo (**Figura18d**). His164Gln repele la unión de N3 elimina la estructura extendida de N3 (**Figura18k**). Las mutaciones Ser46Ala dieron como resultado una estructura en disposición diferente a la original, lo que destaca las funciones de este residuo para mantener la conformación activa de M^{pro} SARS-CoV-2 (**Hu et al., 2009**)





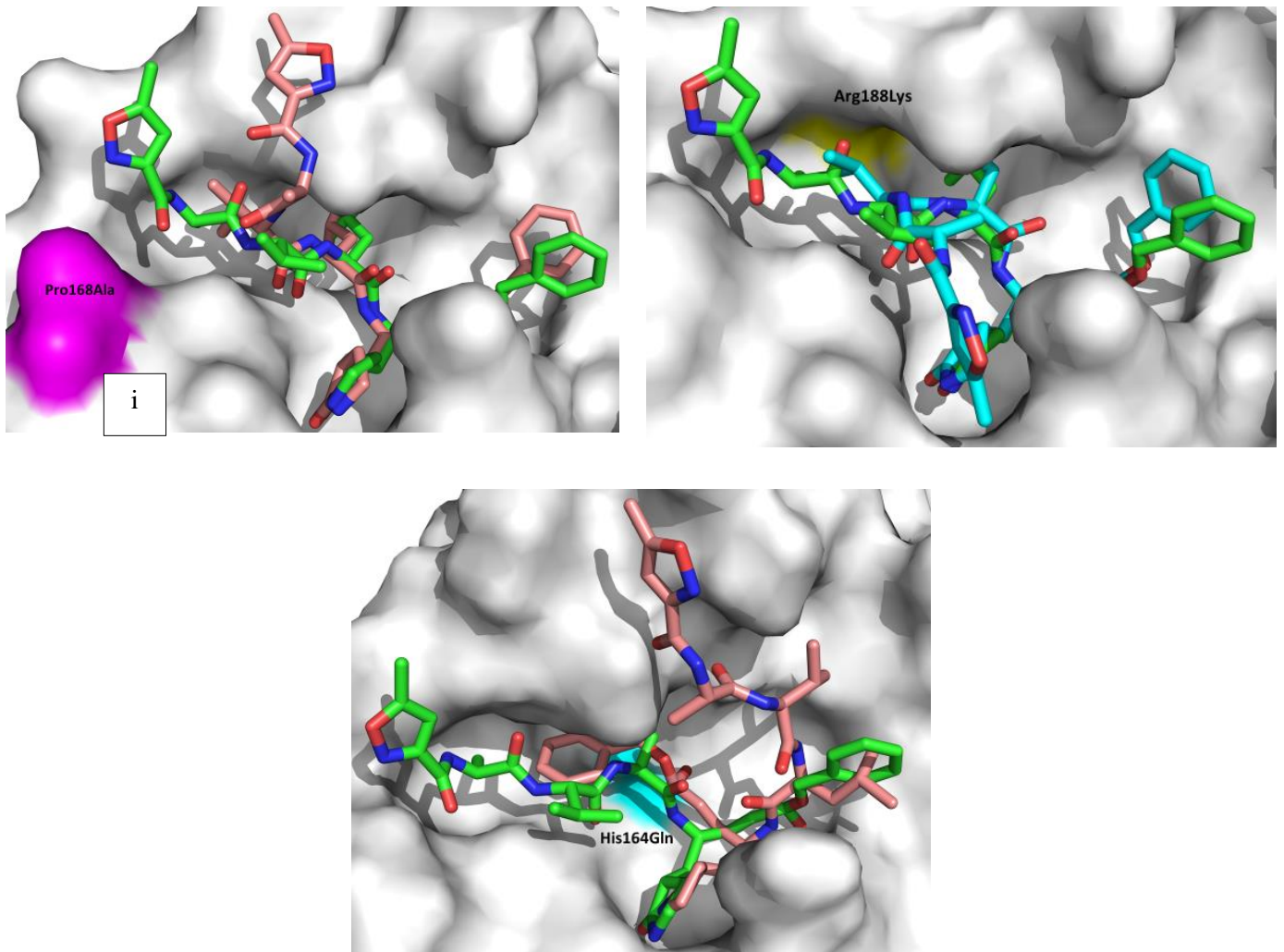


Figura 18. Mapa de superficie de M^{pro} del SARS-CoV-2 en complejo con el inhibidor N3 (verde). a) Ala191Val, b)Pro168Ser, c) Ser46Ala, d) Met165Leu, e) Thr190Ile, f) Ser46Pro, g) Phe185Tyr, h) Met49Leu, i) Pro168Ala, j)Arg188Lys, k) His164Gln

Los residuos His41, Met49, Gly143, Ser144, Cys145, His164, Met165 y Asp187 de la M^{pro} silvestre de SARS-CoV-2 forman interacciones con el inhibidor Carmofur (CMF) (**Figura19**). Las principales interacciones hidrofóbicas se dan entre la cola de CMF y los residuos Met49, Met165 y Asp187. Las interacciones polares a su vez se dan entre en N y O de la estructura de CMF junto con Gly143, Ser144, Cys145. Al analizar los enlaces azufre-pi y carbono-pi, los resultados arrojan que el primer tipo de enlace se produce entre el S de Met49 y el anillo de His141; mientras que el segundo tipo de enlace se forma entre los C de la cola de CMF y el anillo de His141.

Mojab and Marcey (2020) mencionan que las interacciones hidrofóbicas se producen entre aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas. Este tipo de fuerzas intervienen en el correcto plegamiento de la proteína. Es así que, mientras más enlaces hidrofóbicos se presenten en la estructura proteína-ligando mejor acoplamiento tiene.

El enlace pi es un tipo de enlace covalente que se forma por el solapamiento entre orbitales p. Dado que el solapamiento lateral es menos eficaz que el frontal, los enlaces pi son más débiles que los sigma (**Petrucci et al., 1977**). Sin embargo, proporcionan una puntuación a la afinidad con el inhibidor, es por ello que mientras más enlaces azufre-pi o carbono-pi se forman, mayor Score tienen en el docking.

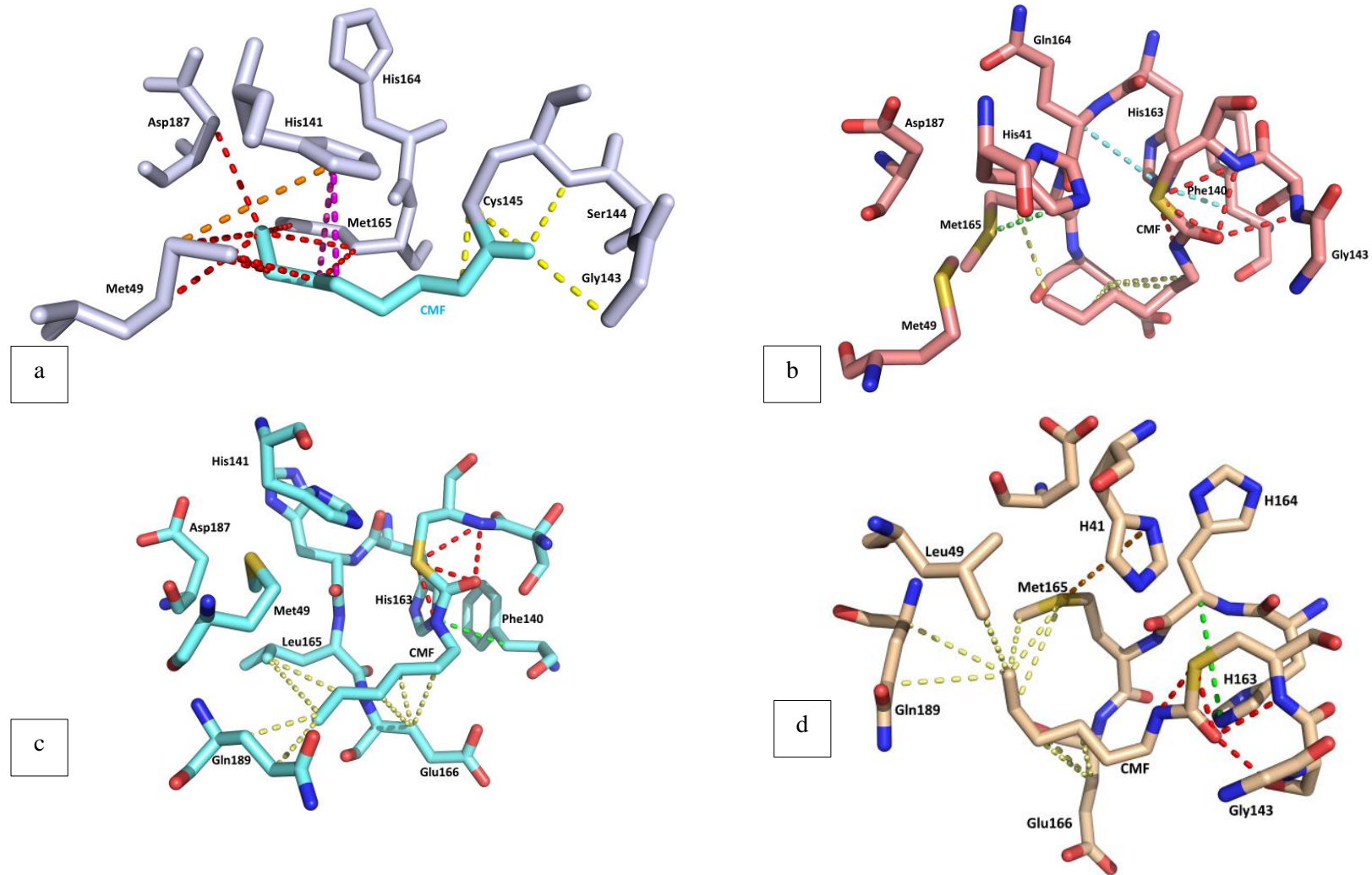


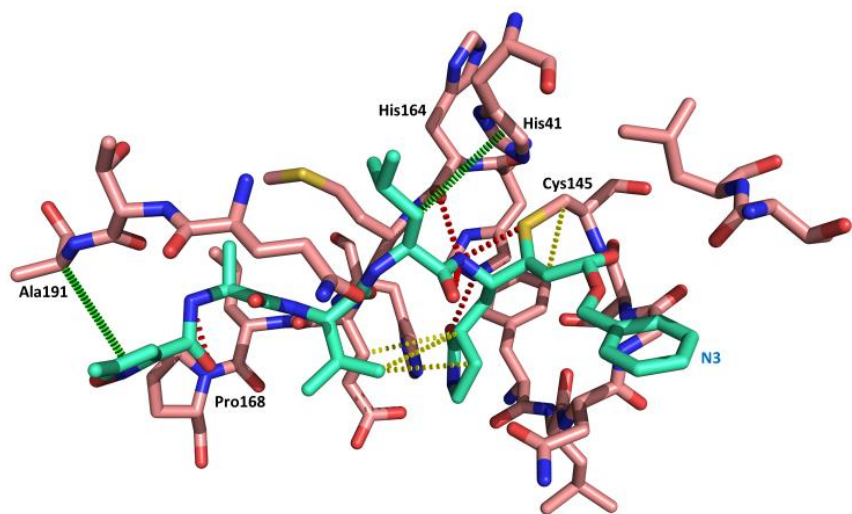
Figura 19. Interacciones de M^{pro} SAR-CoV-2 en complejo con CMF. a. M^{pro} Silvestre, las interacciones polares (amarillo), las interacciones hidrofóbicas (rojo), los enlace azufre-pi (naranja) y los enlaces carbono-pi (morado). b. His164Gln c. Met165Leu d. Met49Leu.. Para b. c. y d. Las líneas rojas señalan las interacciones polares, Las líneas amarillas las interacciones hidrofóbicas. El enlace azufre pi están en color verde y los enlaces carbono pi con celeste.

En la **Figura 20** se observan las interacciones que presenta el inhibidor N3 con las diferentes proteínas mutadas. La proteína silvestre en complejo con N3 (**figura 20a**) forma enlaces polares con Cys145, Pro 39 e His164. Interacciones hidrofóbicas entre su estructura y enlaces carbono-pi con Ala 191 e His41.

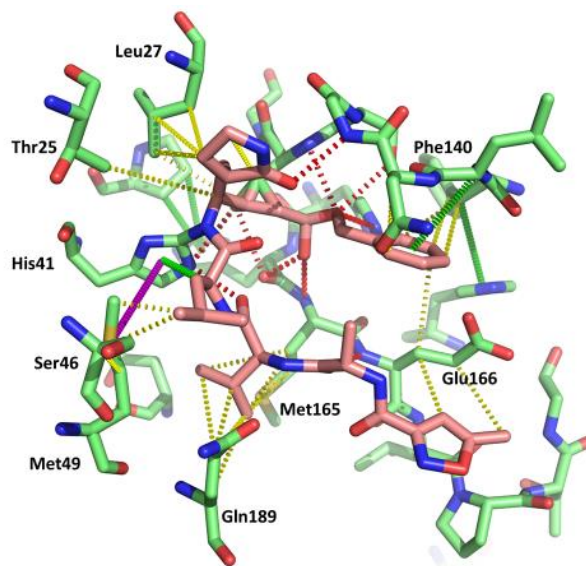
De acuerdo **Amamuddy, Verkhivker, and Bishop (2020)** la Met165 es un aminoácido esencial en la estructura de SARS-CoV-2. En la **Figura 19c y 20e** se observa el cambio en las interacciones producidas por la modificación de Met165 a Leu165 en complejo con CMF y N3, respectivamente.

Glu166 juega un papel fundamental en la conexión del sitio de unión del sustrato con la interfaz del dímero (**Cheng et al., 2010**). Al mutar los residuos Ala191Val, Pro168Ser, Met165Leu,Thr190, Met49Leu,Pro168Ala y Arg188Lys aparecen nuevas interacciones con Glu166, como se observa en la **Figura 20b,c,e,f,i,j,k**.

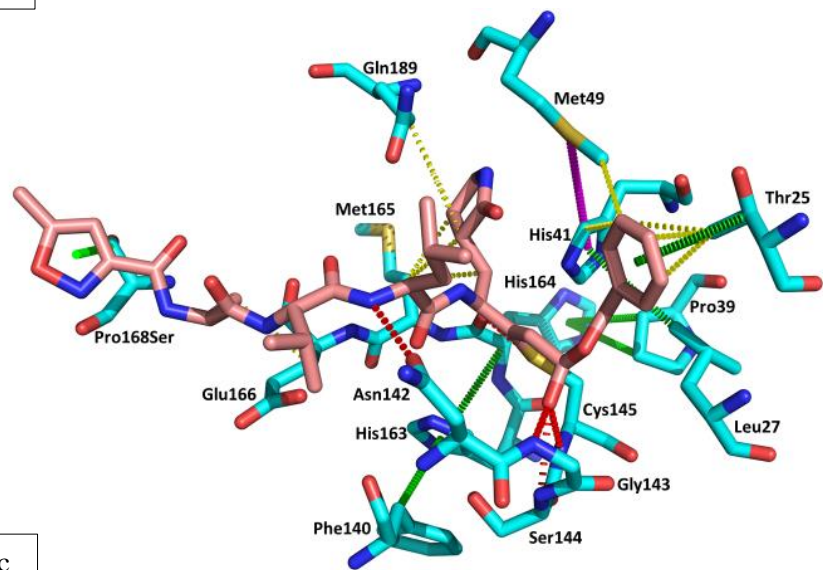
Por la nueva disposición de N3 se encuentran tres enlaces carbono-pi entre Phe140 y el anillo de His163; Thr25 y el anillo de N3, La mutación ProSer168 forma un nuevo enlace carbono-pi. Los enlaces polares esta vez se forman con Asn142, Ser144, Cys145, y Gly143 (**Figura20c**).



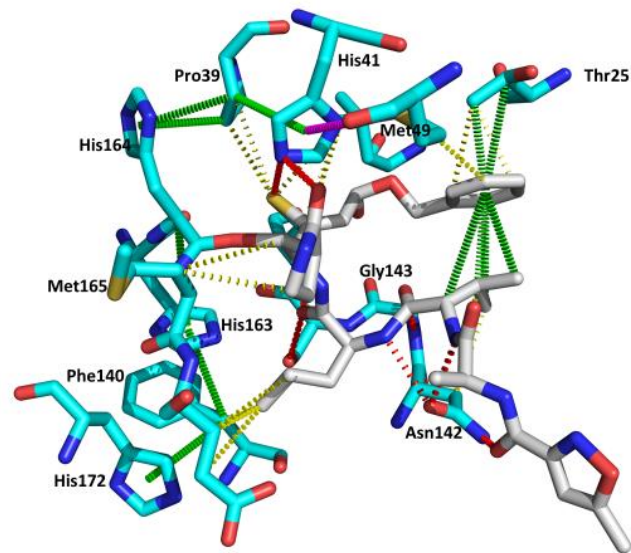
a



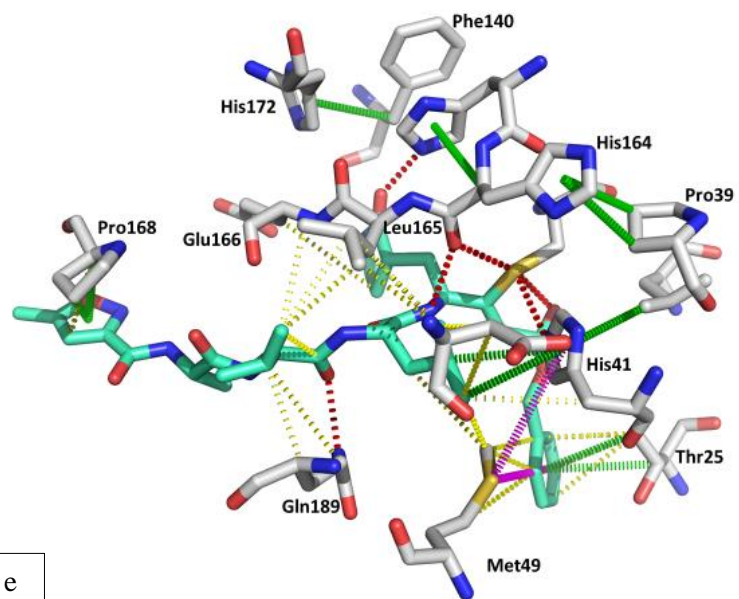
b



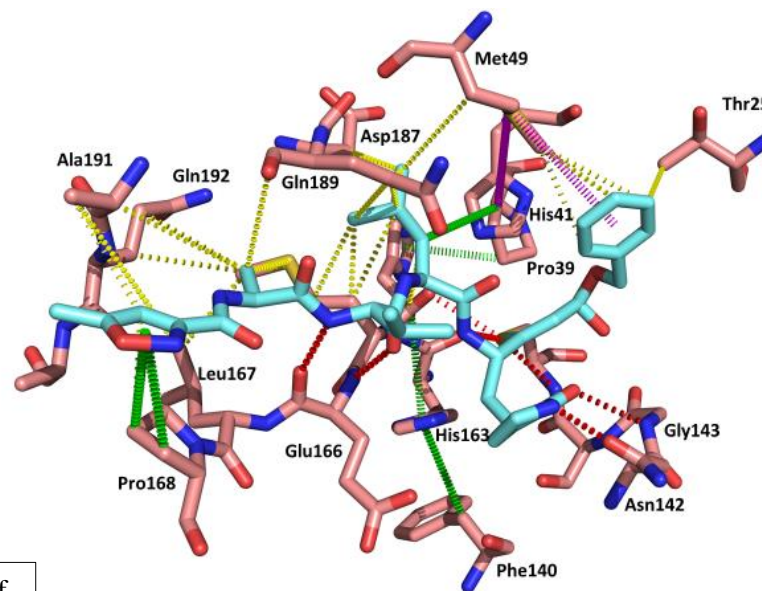
c



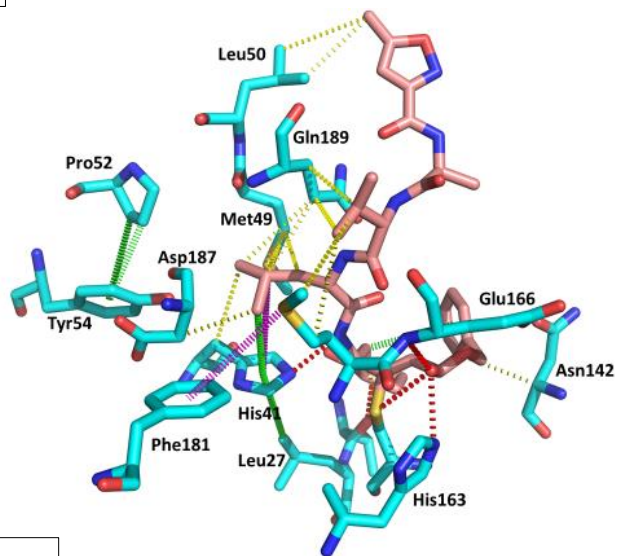
d



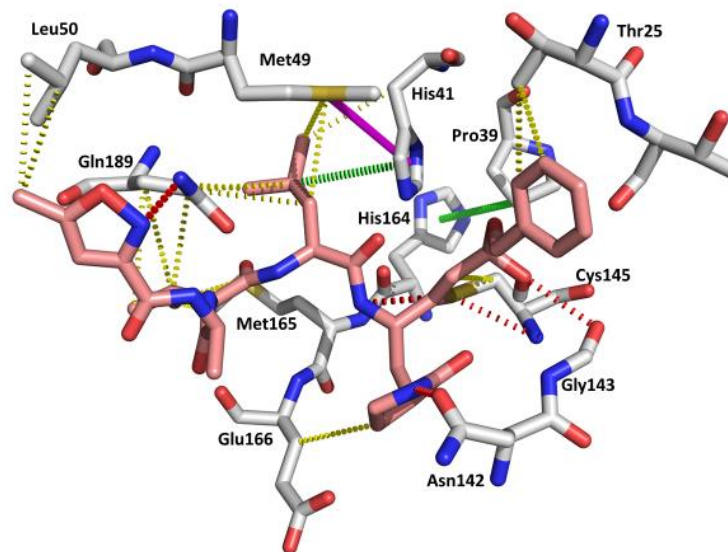
e



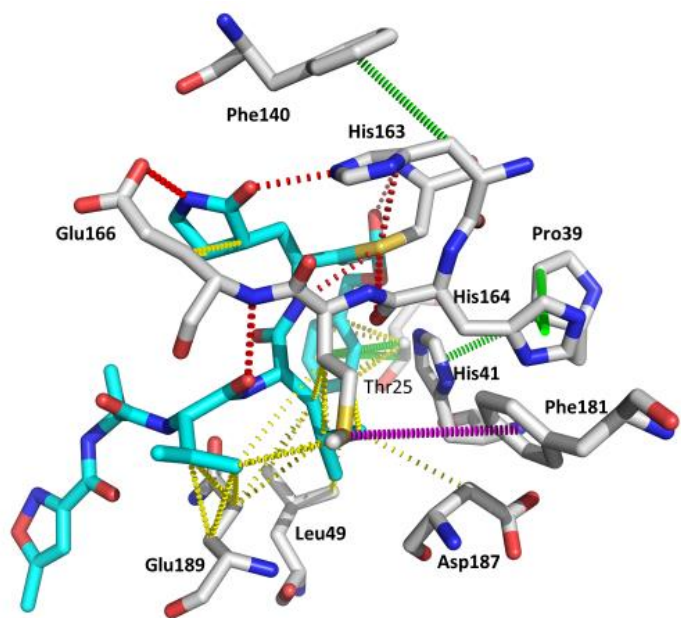
f



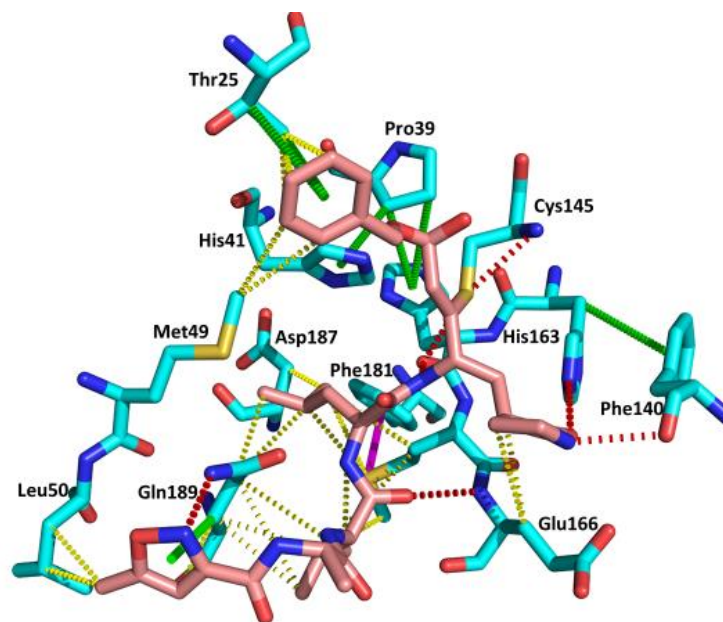
g



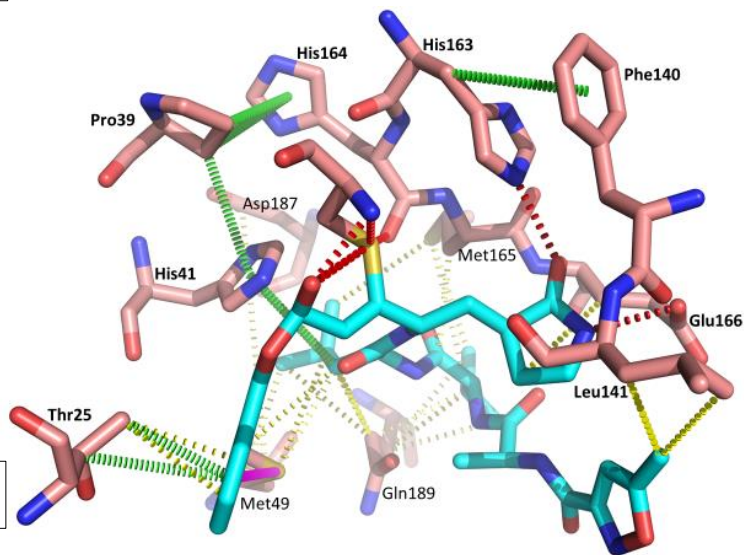
h



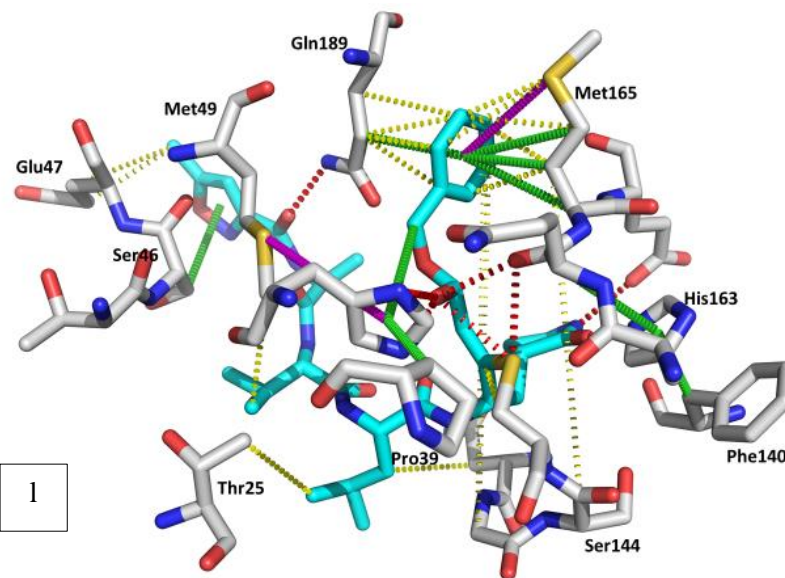
i



j



k



l

Figura 20 Interacciones de M^{pro} del SARS-CoV-2 en complejo con el inhibidor N3. Las líneas rojas representan los enlaces polares, las de color amarillo los hidrofóbicos, los enlaces azufre-pi de color magenta y los carbono-pi se representan en color verde. a) silvestre b) Ala191Val, c) Pro168Ser, d) Ser46Ala, e) Met165Leu, f) Thr190Ile, g) Ser46Pro, h) Phe185Tyr, i) Met49Leu, j) Pro168Ala, k) Arg188Lys, l) His164Gln

3.2. Verificación de la hipótesis

Se identificaron y modelaron correctamente las mutaciones de la enzima M^{pro} del virus SARS-CoV-2, con lo cual:

Para los ensayos realizados con Carmofur, se acepta la hipótesis nula “Mutaciones en la enzima M^{pro} del virus SARS-CoV2 no otorgan resistencia a resistencia a inhibidores de esta enzima proteasa.” y se rechaza la hipótesis alternativa.

Mientras que, para los estudios con N3, se acepta la hipótesis alternativa “Mutaciones en la enzima M^{pro} del virus SARS-CoV2 otorgan resistencia a resistencia a inhibidores de esta enzima proteasa.” y se rechaza la hipótesis nula.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

El estudio bioinformático la proteasa M^{pro} del SARS-CoV- 2 es de gran importancia para combatir la replicación del virus. Las mutaciones en la estructura de la proteína implican cambios conformacionales en su estructura y su interacción con los inhibidores carmofur y N3.

Se identificaron las mutaciones puntuales que podría presentar M^{pro} a futuro, con base al alineamiento de secuencias homologas y las interacciones establecidas con los inhibidores Carmofur y N3. La diada catalítica se mantuvo conservada, mientras que los residuos Ser46, Met49, Asn142, His164, Met165, Pro168, Phe185 Y Thr190 presentaron variaciones entre secuencias.

Se modelaron exitosamente las mutaciones de M^{pro} His164Gln, Met165Leu, Phe185Tyr, Pro168Ser, Ser46Ala, Ser46Pro, Thr190Ile, Arg188Lys, Met49Leu, Pro168Ala y Ala191Val.

El Docking molecular se realizó en conjunto con los ligandos Carmofur y N3. Las mutaciones en M^{pro} His164Gln, Met49Leu Y Met165Leu presentaron mejoras en su Score y por ende disminuyeron la resistencia en su acoplamiento con carmofur. Por otro lado, las mutaciones His164Gln, Met165Leu, Pro168Ser, Ser46Ala Y Ala191Val aumentan el grado de resistencia a N3.

4.2 Recomendaciones

- Realizar el docking flexible para obtener mejores resultados, ya que la proteína tiene residuos flexibles en su estructura.
- Ampliar el estudio bioinformático del efecto de posibles mutaciones en la enzima M^{pro} para un mayor número de inhibidores con la finalidad de poder determinar aquellas moléculas que podrían ser empleadas de forma eficiente para las diferentes variables mutantes.

BIBLIOGRAFÍA

- Alouane, T., Laamarti, M., Essabbar, A., Hakmi, M., Bouricha, E. M., Chemaou-Elfihri, M. W., . . . Ibrahimi, A. (2020). Genomic Diversity and Hotspot Mutations in 30,983 SARS-CoV-2 Genomes: Moving Toward a Universal Vaccine for the “Confined Virus”? *Pathogens*, 9(10), 829.
- Amamuddy, O. S., Verkhivker, G. M., & Bishop, Ö. T. (2020). Impact of emerging mutations on the dynamic properties the SARS-CoV-2 main protease: an *in silico* investigation. *bioRxiv*, 2020.2005.2029.123190. doi: 10.1101/2020.05.29.123190
- Arafet, K., Serrano-Aparicio, N., Lodola, A., Mulholland, A., González, F. V., Swiderek, K., & Moliner, V. (2020). Mechanism of Inhibition of SARS-CoV-2 Mpro by N3 Peptidyl Michael Acceptor Explained by QM/MM Simulations and Design of New Derivatives with Tunable Chemical Reactivity. *ChemRxiv*.
- Barrila, J., Gabelli, S. B., Bacha, U., Amzel, L. M., & Freire, E. (2010). Mutation of Asn28 Disrupts the Dimerization and Enzymatic Activity of SARS 3CLpro. *Biochemistry*, 49(20), 4308-4317. doi: 10.1021/bi1002585
- Benavides-Oro, I. Y., Peña-López, J., Cutiño-Viñals, L. M., Contreras-Quesada, A., & Morris-Quevedo, H. J. (2020). Modelación por homología de la tirosinasa hipotética en pleurotus ostreatus PC15. *Revista Cubana de Química*, 32(2), 172-194.
- Bzówka, M., Mitusińska, K., Raczyńska, A., Samol, A., Tuszyński, J., & Góra, A. (2020a). Molecular Dynamics Simulations Indicate the COVID-19 Mpro Is Not a Viable Target for Small-Molecule Inhibitors Design. *bioRxiv*, 2020.2002.2027.968008. doi: 10.1101/2020.02.27.968008
- Bzówka, M., Mitusińska, K., Raczyńska, A., Samol, A., Tuszyński, J. A., & Góra, A. (2020b). Structural and Evolutionary Analysis Indicate That the SARS-CoV-2 Mpro Is a Challenging Target for Small-Molecule Inhibitor Design. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3099.

- Cambridge Crystallographic, D. C. (2019). GOLD User Guide *A Component of CSD-Discovery Suite* (pp. 210).
- Cavallaro, L., Romanowski, V., Zapiola, I., Mangano, A., Mariano, N. L., Filgueira, P., . . . Capozzo, A. V. (2020). INFORME SARS-COV-2 *Ciclo de Replicación de los coronavirus* (pp. 1-10). Argentina: Sociedad Argentina de Virología. División de la Asociación Argentina de Microbiología.
- Chacón Hernández, E., & Torres Rojas, F. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS-CoV2): Biología de los coronavirus.
- Chen, Y. W., Yiu, C.-P. B., & Wong, K.-Y. (2020). Prediction of the SARS-CoV-2 (2019-nCoV) 3C-like protease (3CL (pro)) structure: virtual screening reveals velpatasvir, ledipasvir, and other drug repurposing candidates. *F1000Research*, 9, 129-129. doi: 10.12688/f1000research.22457.2
- Cheng, S.-C., Chang, G.-G., & Chou, C.-Y. (2010). Mutation of Glu-166 Blocks the Substrate-Induced Dimerization of SARS Coronavirus Main Protease. *Biophysical Journal*, 98(7), 1327-1336. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.12.4272>
- Chuanjun, S., Xuan, H., Ting, H., Li, C., Bing, Y., Jianwei, Z., & Cheng, D. (2020). Potential inhibitors for targeting Mpro and Spike of SARS-CoV-2 based on sequence and structural pharmacology analysis. *STEMedicine*, 1(2). doi: 10.37175/stemedicine.v1i2.41
- Das, P., Majumder, R., Mandal, M., & Basak, P. (2020). In-Silico approach for identification of effective and stable inhibitors for COVID-19 main protease (Mpro) from flavonoid based phytochemical constituents of *Calendula officinalis*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-16. doi: 10.1080/07391102.2020.1796799
- Gao, Q., Bao, L., Mao, H., Wang, L., Xu, K., Yang, M., . . . Lv, Z. (2020). Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science*.
- González-Paz, L., Paz, J. L., Vera-Villalobos, J., & Alvarado, Y. J. (2020). Compuestos Fitoquímicos Dirigidos al Bloqueo de la Polimerasa Viral del SARS-CoV-2 causante del COVID-19: un Análisis Comparativo de Funciones de Puntuación para Acoplamiento con Interés Biomédico. *Revista Politécnica*, 46, 7-20.

- Guy, R. K., DiPaola, R. S., Romanelli, F., & Dutch, R. E. (2020). Rapid repurposing of drugs for COVID-19. *Science*, 368(6493), 829-830. doi: 10.1126/science.abb9332
- Hu, T., Zhang, Y., Li, L., Wang, K., Chen, S., Chen, J., . . . Shen, X. (2009). Two adjacent mutations on the dimer interface of SARS coronavirus 3C-like protease cause different conformational changes in crystal structure. *Virology*, 388(2), 324-334. doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.03.034>
- Huang, C., Wei, P., Fan, K., Liu, Y., & Lai, L. (2004). 3C-like Proteinase from SARS Coronavirus Catalyzes Substrate Hydrolysis by a General Base Mechanism. *Biochemistry*, 43(15), 4568-4574. doi: 10.1021/bi036022q
- Jin, Z., Du, X., Xu, Y., Deng, Y., Liu, M., Zhao, Y., . . . Peng, C. (2020). Structure of M pro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature*, 1-5.
- Jin, Z., Zhao, Y., Sun, Y., Zhang, B., Wang, H., Wu, Y., . . . Du, X. (2020). Structural basis for the inhibition of SARS-CoV-2 main protease by antineoplastic drug carmofur. *Nature structural & molecular biology*, 27(6), 529-532.
- Jo, S., Kim, S., Shin, D. H., & Kim, M.-S. (2020). Inhibition of SARS-CoV 3CL protease by flavonoids. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35(1), 145-151. doi: 10.1080/14756366.2019.1690480
- Kumar, S., Zhi, K., Mukherji, A., & Gerth, K. (2020). Repurposing antiviral protease inhibitors using extracellular vesicles for potential therapy of COVID-19. *Viruses*, 12(5), 486.
- Kumar, Y., Singh, H., & Patel, C. N. (2020). In silico prediction of potential inhibitors for the main protease of SARS-CoV-2 using molecular docking and dynamics simulation based drug-repurposing. *Journal of Infection and Public Health*, 13(9), 1210-1223. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.016>
- Li, Q., & Kang, C. (2020). Progress in Developing Inhibitors of SARS-CoV-2 3C-Like Protease. *Microorganisms*, 8(8), 1250.
- Lim, L., Shi, J., Mu, Y., & Song, J. (2014). Dynamically-Driven Enhancement of the Catalytic Machinery of the SARS 3C-Like Protease by the S284-T285-I286/A Mutations on the Extra Domain. *PLOS ONE*, 9(7), e101941. doi: 10.1371/journal.pone.0101941

- Liu, Y., Ning, Z., Chen, Y., Guo, M., Liu, Y., Gali, N. K., . . . Westerdahl, D. (2020). Aerodynamic characteristics and RNA concentration of SARS-CoV-2 aerosol in Wuhan hospitals during COVID-19 outbreak. *BioRxiv*.
- López-Romero, R., de Jesús Nambo-Lucio, M., Salcedo-Carrillo, E., de los Ángeles Hernández-Cueto, M., & Salcedo-Vargas, M. (2020). El gran desafío de la latencia de SARS-CoV-2: el testículo como reservorio. *Gaceta Médica*, *156*, 328-333.
- Martínez, A. M. C. (2020). ¿ Cómo surgen los virus que infectan al humano? Origen y evolución del SARS-CoV-2. *virus*.
- Masters, P. S. (2006). The Molecular Biology of Coronaviruses *Advances in Virus Research* (Vol. 66, pp. 193-292): Academic Press.
- Mejía Méndez, J., & Pérez-Cortés, E. (2020). Relación entre los inhibidores de la proteasa 3CLpro de SARS-CoV y SARS-CoV-2 y su posible utilidad en el tratamiento de las infecciones COVID-19. 6-17.
- Mojab, Y., & Marcey, D. (2020). An Introduction to Chemical Bonds and Protein Structure. *California Lutheran University*. from http://earth.callutheran.edu/Academic_Programs/Departments/BioDev/omm/jsmolnew/bonding/chymo.html
- Moneriz, C., & Castro-Salguedo, C. (2020). Fármacos prometedores y potenciales para el tratamiento de COVID-19. *Revista chilena de infectología*, *37*, 205-215.
- Mousavizadeh, L., & Ghasemi, S. (2020). Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.03.022>
- O'Meara, M. J., Guo, J. Z., Swaney, D. L., Tummino, T. A., & Hüttenhain, R. A SARS-CoV-2-Human Protein-Protein Interaction Map Reveals Drug Targets and Potential Drug-Repurposing.
- Oliva, J. (2020). SARS-CoV-2: origen, estructura, replicación y patogénesis. *ALERTA. Revista Científica del Instituto Nacional de Salud*, *3*, 79-86. doi: <https://doi.org/10.5377/alerta.v3i2.9619>
- Paez, Á. (2020). Hombre de 46 años de Quito es el primer caso de reinfección de SARS-CoV-2 en Ecuador, *El Universo*. Retrieved from

<https://www.eluniverso.com/noticias/2020/08/29/nota/7959514/reinfeccion-ecuador-coronavirus-sars-salud-primer>

- Parry, J. (2020). Covid-19: Hong Kong scientists report first confirmed case of reinfection. *BMJ*, 370, m3340. doi: 10.1136/bmj.m3340
- Pastrian-Soto, G. (2020). Bases Genéticas y Moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). Mecanismos de Patogénesis y de Respuesta Inmune. *International journal of odontostomatology*, 14, 331-337.
- Petrucci, R. H., Harwood, W. S., Herring, F. G., Perry, S. S., García-Pumarino, C. P., Cabo, N. I., & Renuncio, J. A. R. (1977). *Química general*: Fondo Educativo Interamericano.
- Portelli, S., Olshansky, M., Rodrigues, C. H. M., D'Souza, E. N., Myung, Y., Silk, M., . . . Ascher, D. B. (2020). Exploring the structural distribution of genetic variation in SARS-CoV-2 with the COVID-3D online resource. *Nature Genetics*, 52(10), 999-1001. doi: 10.1038/s41588-020-0693-3
- Rabaan, A. A., Al-Ahmed, S. H., Haque, S., Sah, R., Tiwari, R., Malik, Y. S., . . . Rodriguez-Morales, A. J. (2020). SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview. *Infez Med*, 28(2), 174-184.
- Ramachandran, S., Kota, P., Ding, F., & Dokholyan, N. V. (2011). Automated minimization of steric clashes in protein structures. *Proteins*, 79(1), 261-270. doi: 10.1002/prot.22879
- Rodríguez-Morales, A. J., Sánchez-Duque, J. A., Hernández Botero, S., Pérez-Díaz, C. E., Villamil-Gómez, W. E., Méndez, C. A., . . . Paniz-Mondolfi, A. (2020). Preparación y control de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) en América Latina. *Acta Médica Peruana*, 37, 3-7.
- Salud, M. d. (2020). *Situación Coronavirus Covid-19*. Ecuador: Retrieved from <https://www.salud.gob.ec/el-ministerio-de-salud-publica-del-ecuador-msp-informa-situacion-coronavirus/>.
- Shan, Y.-F., Li, S.-F., & Xu, G.-J. (2004). A novel auto-cleavage assay for studying mutational effects on the active site of severe acute respiratory syndrome coronavirus 3C-like protease. *Biochemical and Biophysical Research*

- Communications*, 324(2), 579-583. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.088>
- Sheik Amamuddy, O., Verkhivker, G. M., & Tastan Bishop, Ö. (2020). Impact of Early Pandemic Stage Mutations on Molecular Dynamics of SARS-CoV-2 Mpro. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(10), 5080-5102. doi: 10.1021/acs.jcim.0c00634
- Tahir ul Qamar, M., Alqahtani, S. M., Alamri, M. A., & Chen, L.-L. (2020). Structural basis of SARS-CoV-2 3CLpro and anti-COVID-19 drug discovery from medicinal plants. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 10(4), 313-319. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.03.009>
- Verdonk, M. L., Cole, J. C., Hartshorn, M. J., Murray, C. W., & Taylor, R. D. (2003). Improved protein–ligand docking using GOLD. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 52(4), 609-623.
- Vivas-Reyes, R., Ruiz, J. L., & Caraballo, R. (2009). Estudio teórico del virus del síndrome respiratorio agudo severo (sars) a través del uso de métodos de acoplamiento molecular. *Revista Colombiana de Química*, 38(3), 327-339.
- Xue, X., Yang, H., Shen, W., Zhao, Q., Li, J., Yang, K., . . . Rao, Z. (2007). Production of Authentic SARS-CoV Mpro with Enhanced Activity: Application as a Novel Tag-cleavage Endopeptidase for Protein Overproduction. *Journal of Molecular Biology*, 366(3), 965-975. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.11.073>
- Yin, W., Mao, C., Luan, X., Shen, D.-D., Shen, Q., Su, H., . . . Gao, M. (2020). Structural basis for inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 by remdesivir. *Science*.
- Zhou, J., Fang, L., Yang, Z., Xu, S., Lv, M., Sun, Z., . . . Xiao, S. (2019). Identification of novel proteolytically inactive mutations in coronavirus 3C-like protease using a combined approach. *The FASEB Journal*, 33(12), 14575-14587.

ANEXOS

Anexo 1. Secuencias homólogas de M^{PRO} SARS-CoV-2

N	Código PDB	Datos	Código alineamiento
1	P0C6F5	R1A_BC279 - Replicase polyprotein 1a Bat coronavirus 279/2005 (BtCoV) (BtCoV/279/2005) E-value: 0.0 Score: 1604 Ident.: 96.1% Positives : 99.0% Query Length: 306 Match Length: 4388	BtCoV_279_2
2	A0A0U1WHG8	A0A0U1WHG8_CVHSA - 2'-O-methyltransferase BtRf-BetaCoV/HeB2013 E-value: 0.0 Score: 1601 Ident.: 95.8% Positives : 99.0% Query Length: 306 Match Length: 7068	BtRf-BetaCoV_He
3	P0C6U8	R1A_CVHSA - Replicase polyprotein 1a Human SARS coronavirus (SARS-CoV) (Severe acute respiratory syndrome coronavirus) E-value: 0.0 Score: 1600 Ident.: 96.1% Positives : 98.7% Query Length: 306 Match Length: 4382	SARS-CoV
4	Q6UZF5	Q6UZF5_CVHSA - 2'-O-methyltransferase SARS coronavirus PUMC02 E-value: 0.0 Score: 1600 Ident.: 96.1% Positives : 98.7% Query Length: 306 Match Length: 7073	SARS-CoV_PUMC02
5	A0A0K1Z0N1	A0A0K1Z0N1_CVHSA - 3C-like proteinase Bat SARS-like coronavirus YNLF_31C E-value: 0.0 Score: 1599 Ident.: 95.8% Positives : 98.7% Query Length: 306 Match Length: 4382	BtSARS_Cov_YNLF

6	P0C6F8	R1A_BCHK3 - Replicase polyprotein 1a Bat coronavirus HKU3 (BtCoV) (SARS-like coronavirus HKU3) E-value: 0.0 Score: 1596 Ident.: 95.4% Positives : 98.7% Query Length: 306 Match Length: 4376	BtCov_HKU3
7	P0C6T7	R1A_BCRP3 - Replicase polyprotein 1a Bat coronavirus Rp3/2004 (BtCoV/Rp3/2004) (SARS-like coronavirus Rp3) E-value: 0.0 Score: 1592 Ident.: 95.8% Positives : 98.4% Query Length: 306 Match Length: 4380	BtCoV_Rp3_2
8	A0A0U1WHG0	A0A0U1WHG0_CVHSA - 2'-O-methyltransferase BtRf-BetaCoV/JL2012 E-value: 0.0 Score: 1589 Ident.: 94.8% Positives : 98.4% Query Length: 306 Match Length: 7068	BtRf-BetaCoV_JL
9	A0A088DIE1	A0A088DIE1_9BETC - 2'-O-methyltransferase Bat Hp-beta coronavirus/Zhejiang2013 E-value: 1e-140 Score: 1151 Ident.: 68.6% Positives : 80.4% Query Length: 306 Match Length: 7247	Bat_Hp-betaCoV
10	A0A1B3Q5W8	A0A1B3Q5W8_9BETC - 2'-O-methyltransferase Rousettus bat coronavirus E-value: 2.9e-105 Score: 887 Ident.: 52.3% Positives : 71.2% Query Length: 306 Match Length: 6973	RousBtCoV
11	E0ZN43	E0ZN43_BCHK9 - 2'-O-methyltransferase Bat coronavirus HKU9-5-2 E-value: 2.2e-101 Score: 858 Ident.: 52.3% Positives : 69.6% Query Length: 306 Match Length: 6903	BtCoV_HKU9-5-2

12	E0ZN35	E0ZN35_BCHK9 - 2'-O-methyltransferase Bat coronavirus HKU9-5-1 E-value: 5.6e-101 Score: 855 Ident.: 51.0% Positives : 69.9% Query Length: 306 Match Length: 6923	BtCoV_HKu9-5-1
13	A0A023YA54	A0A023YA54_MERS - 3C-like proteinase BtVs-BetaCoV/SC2013 E-value: 2.7e-98 Score: 835 Ident.: 52.1% Positives : 67.6% Query Length: 306	BtVs-BetaCoV_SC
14	K9N638	R1A_MERS1 - Replicase polyprotein 1a Middle East respiratory syndrome-related coronavirus (isolate United Kingdom/H123990006/2012) (Betacoronavirus England 1) (Human coronavirus EMC) E-value: 8.2e-95 Score: 809 Ident.: 50.6% Positives : 66.8% Query Length: 306 Match Length: 4391	MERS1_BetaC
15	T2B9I2	T2B9I2_MERS - 3C-like proteinase Middle East respiratory syndrome-related coronavirus (MERS-CoV) E-value: 8.2e-95 Score: 809 Ident.: 50.6% Positives : 66.8% Query Length: 306 Match Length: 4391	MERS-CoV
16	U5LR11	U5LR11_9BETC - 3C-like proteinase Betacoronavirus Erinaceus/VMC/DEU/2012 E-value: 2.1e-94 Score: 806 Ident.: 51.1% Positives : 65.4% Query Length: 306 Match Length: 4454	BetaCoV_Erinace
17	P0C6U9	R1A_CVM2 - Replicase polyprotein 1a Murine coronavirus (strain 2) (MHV-2) (Murine hepatitis virus) E-value: 5.4e-92 Score: 788 Ident.: 50.7% Positives : 65.4% Query Length: 306 Match Length: 4416	MuHepatitis

18	A3EXD8	A3EXD8_BCHK5 - 2'-O-methyltransferase Bat coronavirus HKU5-2 E-value: 5.5e-92 Score: 788 Ident.: 50.0% Positives : 67.1% Query Length: 306 Match Length: 7179	BtCoV_HKU5-2
19	P0C6T5	R1A_BCHK5 - Replicase polyprotein 1a Bat coronavirus HKU5 (BtCoV) (BtCoV/HKU5/2004) E-value: 1e-91 Score: 786 Ident.: 50.0% Positives : 67.1% Query Length: 306 Match Length: 4481	R1A_BtCoV_HKU5_
20		C0KYY5 C0KYY5_9BETC - 3C-like proteinase Murine coronavirus MHV-JHM.IA E-value: 2.5e-91 Score: 783 Ident.: 50.7% Positives : 65.0% Query Length: 306 Match Length: 4473	MuCoV_JHM
21	H9AA60	H9AA60_9BETC - 3C-like proteinase Rabbit coronavirus HKU14 E-value: 4.8e-91 Score: 781 Ident.: 48.0% Positives : 65.0% Query Length: 306 Match Length: 7112	RaCoV_HKU14
22	P0C6V1	R1A_CVMJH - Replicase polyprotein 1a Murine coronavirus (strain JHM) (MHV-JHM) (Murine hepatitis virus) E-value: 8.7e-91 Score: 779 Ident.: 50.3% Positives : 65.0% Query Length: 306 Match Length: 4474	MuCoV_hepatitis
23	P0C6T4	R1A_BCHK4 - Replicase polyprotein 1a Bat coronavirus HKU4 (BtCoV) (BtCoV/HKU4/2004) E-value: 1.2e-90 Score: 778 Ident.: 49.7% Positives : 66.1% Query Length: 306 Match Length: 4434	BtCoV_HKU4_2004

Anexo 2 Alineamiento completo de secuencias homólogas a M^{pro} SARS-CoV-2.

* *

SARS_CoV2	1	SGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTTTLNGLWLDDEVVYCPRHVICTSEDMLNPNYEDLLIR
BtCoV_279_2	1	SGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTTTLNGLWLDDEVVYCPRHVICTAEDMLNPNYEDLLIR
BtRf-BetaCoV_He	1	SGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTTTLNGLWLDDEVVYCPRHVICTAEDMLNPNYEDLLIR
SARS-CoV	1	SGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTTTLNGLWLDDEVVYCPRHVICTAEDMLNPNYEDLLIR
SARS-CoV_PUMC02	1	SGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTTTLNGLWLDDEVVYCPRHVICTAEDMLNPNYEDLLIR
BtSARS_Cov_YNLF	1	SGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTTTLNGLWLDDEVVYCPRHVICTAEDMLNPNYEDLLIR
BtCov_HKU3	1	SGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTTTLNGLWLDDEVVYCPRHVVCTAEDMLNPNYEDLLIR
BtCoV_Rp3_2	1	SGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTTTLNGLWLDDEVVYCPRHVICTAEDMLNPNYEDLLIR
BtRf-BetaCoV_JL	1	SGFKKVAFPSGKVEGCMVQVTCGTTTLNGLWLDDEVVYCPRHVVCTVEDMLNPNYEDLLIR
Bat_Hp-betaCoV_	1	SGIRKMSCPTGKVERCMVRVTCGTMTLNGLWLDNTVYCPRHVMCTPEELLPADPYDSILLR
RousBtCoV	1	AGLAKMAHPSGLVEPCIVKVSYGTMTLNGLWLDNNTVYCPRHVLCRDDLVPDPYQRLSMR
BtCoV_HKU9-5-2	1	AGLTRMAHPSGLVEPCVVKVSYGSMTLNGLWLDNNTVYCPRHVMCSRDELQNPDPYARLSMR
BtCoV_HKU9-5-1	1	AGLTRMAHPSGLVEPCVVKVSYGSMTLNGLWLDNNTVYCPRHVMCSRDELQNPDPYARLSMR
BtVs-BetaCoV_SC	1	SGLVKMSPSGAVEACMVQVTCGSMTLNGLWLDNNTVYCPRHVMCPADQLNDPNYDGLLIS
MERS1_BetaC	1	SGLVKMSPSGDVEACMVQVTCGSMTLNGLWLDNNTVYCPRHVMCPADQLSDPNYDALLIS
MERS-CoV	1	SGLVKMSPSGDVEACMVQVTCGSMTLNGLWLDNNTVYCPRHVMCPADQLSDPNYDALLIS
BetaCoV_Erinace	1	SGLVKMAHPSGAVEQCVQVTCGSMTLNGLWLDNNTVYCPRHVMCPADQLSDPNYDALLIS
MuHepatitis	1	SGIVKMVFPSTKVEPCVVSVTYGNMTLNGLWLDNNTVYCPRHVICSSADMTDPDPYSNLLCR
BtCoV_HKU5-2	1	SGLVKMAAPSGVVENCMVQVTCGSMTLNGLWLDNNTVYCPRHVMCPADQLSDPNYDALLIS
BtCoV_HKU5_	1	SGLVKMAAPSGVVENCMVQVTCGSMTLNGLWLDNNTVYCPRHVMCPADQLSDPNYDALLIS
MuCoV_JHM	1	SGIVKMVSPSTKVEPCVVSVTYGNMTLNGLWLDNNTVYCPRHVICSSADMTDPDPYSNLLCR
RaCoV_HKU14	1	SGIVKMVSPSTKVEPCVVSVTYGNMTLNGLWLDNNTVYCPRHVICSSADMTDPDPYSNLLCR
MuCoV_hepat	1	SGIVKMVSPSTKVEPCVVSVTYGNMTLNGLWLDNNTVYCPRHVICSSADMTDPDPYSNLLCR
BtCoV_HKU4_	1	SGLVKMSAPSGAVENCIVQVTCGSMTLNGLWLDNNTVYCPRHVMCPADQLSDPNYDALLIS
SARS_CoV2	61	KSNHNFLVQAG---NVQLRVIGHSMQNCVLLKLVDTANPKTPKYKQFVRIQPGQTFSVLAC
BtCoV_279_2	61	KSNHSFVLQAG---NVQLRVIGHSMQNCVLLKLVDTANPKTPKYKQFVRIQPGQTFSVLAC
BtRf-BetaCoV_He	61	KSNHSFVLQAG---NVQLRVIGHSMQNCVLLKLVDTANPKTPKYKQFVRIQPGQTFSVLAC
SARS-CoV	61	KSNHSFVLQAG---NVQLRVIGHSMQNCVLLKLVDTANPKTPKYKQFVRIQPGQTFSVLAC
SARS-CoV_PUMC02	61	KSNHSFVLQAG---NVQLRVIGHSMQNCVLLKLVDTANPKTPKYKQFVRIQPGQTFSVLAC
BtSARS_Cov_YNLF	61	KSNHSFVLQAG---NVQLRVIGHSMQNCVLLKLVDTANPKTPKYKQFVRIQPGQTFSVLAC
BtCov_HKU3	61	KSNHSFVLQAG---NVQLRVIGHSMQNCVLLKLVDTANPKTPKYKQFVRIQPGQTFSVLAC
BtCoV_Rp3_2	61	KSNHSFVLQAG---NVQLRVIGHSMQNCVLLKLVDTANPKTPKYKQFVRIQPGQTFSVLAC
BtRf-BetaCoV_JL	61	KSNHSFVLQAG---NVQLRVIGHSMQNCVLLKLVDTANPKTPKYKQFVRIQPGQTFSVLAC
Bat_Hp-betaCoV_	61	KATHSFTVQYG---TAYLKVVSYKMTGSLVQLGVDQINPETPKYKQFVRAKPGATFSVLAC
RousBtCoV	61	AANYDFHVSQN---GLNLRVTGHVMEGALLRLTVDATNPKTPAHSFVRVSTGQAISILAC
BtCoV_HKU9-5-2	61	AANYDFHVSQN---GHNIRVIGHVMVGSLLKLTVDVNNPRTPAYSFIRVSTGQAMSLAC
BtCoV_HKU9-5-1	61	AANYDFHVSQN---GHNIRVIGHVMVGSLLKLTVDVNNPRTPAYSFIRVSTGQAMSLAC
BtVs-BetaCoV_SC	61	MTNHSFTVQKHVQKHI GAPANLRVIGHAMQGTLLKLTVDSPNPNTPAYTFTTVKPGASFSVLAC
MERS1_BetaC	61	MTNHSFVSQKHIGAPANLRVIGHAMQGTLLKLTVDVANPSTPAYTFTTVKPGAAFSVLAC
MERS-CoV	61	MTNHSFVSQKHIGAPANLRVIGHAMQGTLLKLTVDVANPSTPAYTFTTVKPGAAFSVLAC
BetaCoV_Erinace	61	MTNHSFTIQRHGRSTANLRCTGHAMHGTLLKLTVDVANPSTPAYTFTTVKPGAAFSVLAC
MuHepatitis	61	VISSDFCVMSG---RMSLTVMSYQMQGSLVLTTLQNPNTPKYSFGVVKPGETFTVLAA
BtCoV_HKU5-2	61	KTNLSFIVQKNVQKHI GAPANLRVGHVMTVGTLLKLTVESANPQTPAYTFTTVKPGASFSVLAC
BtCoV_HKU5_	61	KTNLSFIVQKNVQKHI GAPANLRVGHVMTVGTLLKLTVESANPQTPAYTFTTVKPGASFSVLAC
MuCoV_JHM	61	VTSSDFCVMSD---RMSLTVMSYQMQGSLVLTTLQNPNTPKYSFGVVKPGETFTVLAA
RaCoV_HKU14	61	VTSSDFCVMSD---RMSLTVMSYQMQGSLVLTTLQNPNTPKYSFGVVKPGETFTVLAA
MuCoV_hepat	61	VTSSDFCVMSD---RMSLTVMSYQMQGSLVLTTLQNPNTPKYSFGVVKPGETFTVLAA
BtCoV_HKU4_	61	KTNHSFIVQKHIGAPANLRVVAHSMVGVLLKLTVDVANPSTPAYTFTTVKPGASFSVLAC

```

*
* * *
SARS_CoV2 118 YNGSPSGVYQCAMRPNFTIKGSFLNGSCGSGVGFNIDYDCVSFCYMHMMELPTGVHAGTDL
BtCoV_279_2 118 YNGSPSGVYQCAMRPNYTIKGSFLNGSCGSGVGFNIDYDCVSFCYMHMMELPTGVHAGTDL
BtRf-BetaCoV_He 118 YNGSPSGVYQCAMRPNYTIKGSFLNGSCGSGVGFNIDYDCVSFCYMHMMELPTGVHAGTDL
SARS-CoV 118 YNGSPSGVYQCAMRPNHTIKGSFLNGSCGSGVGFNIDYDCVSFCYMHMMELPTGVHAGTDL
SARS-CoV_PUMC02 118 YNGSPSGVYQCAMRPNHTIKGSFLNGSCGSGVGFNIDYDCVSFCYMHMMELPTGVHAGTDL
BtSARS_Cov_YNLF 118 YNGSPSGVYQCAMRPNHTIKGSFLNGSCGSGVGFNIDYDCVSFCYMHMMELPTGVHAGTDL
BtCov_HKU3_ 118 YNGSPSGVYQCAMRPNHTIKGSFLNGSCGSGVGFNIDYDCVSFCYMHMMELPTGVHAGTDL
BtCoV_Rp3_2 118 YNGSPSGVYQCAMRPNHTIKGSFLNGSCGSGVGFNIDYDCVSFCYMHMMELPTGVHAGTDL
BtRf-BetaCoV_JL 118 YNGSPSGVYQCAMRPNYTIKGSFLNGSCGSGVGFNIDYDCVSFCYMHMMELPTGVHAGTDL
Bat_Hp-betaCoV_ 118 YNGMPAGVYQVAMRPNHTIKGSFLNGSCGSGVGYTLGYDRVEFCYMHMMELPTGVHTGTDL
RousBtCoV 118 YDGIIPAGVYTCCLRANGTLRAAFLCGSCGSPGFVVMNGKEVQFCYHQLELPNGHTGTDM
BtCoV_HKU9-5-2 118 YDGVPTGVYTCCLRANGTLKASFLCGSCGSPGFVVMNGKEVQFCYHQLELPNGHTGTDM
BtCoV_HKU9-5-1 118 YDGVPTGVYTCCLRANGTLKASFLCGSCGSPGFVVMNGKEVQFCYHQLELPNGHTGTDM
BtVs-BetaCoV_SC 121 YNGRPTGTFVVMRPNHTIKGSFLCGSCGSGVGYTKEGNVINFICYMHQMELANGHTGSSSF
MERS1_BetaC 121 YNGRPTGTFVVMRPNYTIKGSFLCGSCGSGVGYTKEGVSINFICYMHQMELANGHTGSAF
MERS-CoV 121 YNGRPTGTFVVMRPNYTIKGSFLCGSCGSGVGYTKEGVSINFICYMHQMELANGHTGSAF
BetaCoV_Erinace 121 YNGRPSGTYTVVMRPNSTIKGSFLCGSCGSGVGYVKEGNVINFICYMHQMELANGHTGSSSF
MuHepatitis 118 YNGKSQGAHVMTMRSSYTIKGSFLCGSCGSGVGYVLTGDSVRFVYMHQLELSTGCHTGTDF
BtCoV_HKU5-2 121 YNGRPTGVFMVNMQRNSTIKGSFLCGSCGSGVGYTQEGNVINFICYMHQMELANGHTGCSF
BtCoV_HKU5_ 121 YNGRPTGVFMVNMQRNSTIKGSFLCGSCGSGVGYTQEGNVINFICYMHQMELANGHTGCAF
MuCoV_JHM 118 YNGRPQGAHVVMRSSHSTIKGSFLCGSCGSGVGYVLTGDSVRFVYMHQLELSTGCHTGTDF
RaCoV_HKU14 118 YNGRPQGAHVMTMRSSFTIKGSFLCGSCGSGVGYVLMGDCVKFVYMHQLELSTGCHTGTDF
MuCoV_hepat 118 YNGRPQGAHVVMRSSHSTIKGSFLCGSCGSGVGYVLTGDSVRFVYMHQLELSTGCHTGTDF
BtCoV_HKU4_ 121 YNGKPTGVFTVNLRHNSSTIKGSFLCGSCGSGVGYTENGGVINVFVYMHQMELANGHTGSSSF

```

```

* * *
SARS_CoV2 178 EGNFYGPFVDRQTAQAAGTDTTITVNVLAWLYAAVINGDRWFLNRFTTTLNDFNLVAMKY
BtCoV_279_2 178 EGKFYGPFVDRQTAQAAGTDTTITLNVLAWLYAAVINGDRWFLNRFTTTLNDFNLVAMKY
BtRf-BetaCoV_He 178 EGKFYGPFVDRQTAQAAGTDTTITLNVLAWLYAAVINGDRWFLNRFTTTLNDFNLVAMKY
SARS-CoV 178 EGKFYGPFVDRQTAQAAGTDTTITLNVLAWLYAAVINGDRWFLNRFTTTLNDFNLVAMKY
SARS-CoV_PUMC02 178 EGKFYGPFVDRQTAQAAGTDTTITLNVLAWLYAAVINGDRWFLNRFTTTLNDFNLVAMKY
BtSARS_Cov_YNLF 178 EGKFYGPFVDRQTAQAAGTDTTITLNVLAWLYAAVINGDRWFLNRFTTTLNDFNLVAMKY
BtCov_HKU3 178 EGKFYGPFVDRQTAQAAGTDTTITLNVLAWLYAAVINGDRWFLNRFTTTLNDFNLVAMKY
BtCoV_Rp3_2 178 EGKFYGPFVDRQTAQAAGTDTTITLNVLAWLYAAVINGDRWFLNRFTTTLNDFNLVAMKY
BtRf-BetaCoV_JL 178 EGKFYGPFVDRQTAQAAGTDTTITLNVLAWLYAAVINGDRWFLNRFTTTLNDFNLVAMKY
Bat_Hp-betaCoV_ 178 EGTIFYGDFVDRQTSQSAGSDNTLTLNVLAWLYAAVINGRWFIVPQTCALTDNFNTAVLKY
RousBtCoV 178 HGAFYGPFEDKQVPQLASPDVTITVNVLAWLYAAVLSGESWVFTKLGITAAEFNTSAVKY
BtCoV_HKU9-5-2 178 SGVFYGPFEDKQVPQLAAPDCTITVNVLAWLYAAVLSGENWFLTKSSITPAEFNNCVAVKY
BtCoV_HKU9-5-1 178 SGVFYGPFEDKQVPQLAAPDCTITVNVLAWLYAAVLSGENWFLTKSSITPAEFNNCVAVKY
BtVs-BetaCoV_SC 181 DGNMYGAFQDRQVHQQLTDKYCTVNI VAWLYAAI LNCCTWFVKPSRSTSVVSFNEWAMAN
MERS1_BetaC 181 DGTMYGAFMDKQVHQVQLTDKYCSVNVVAVLYAAI LNCWVFKPNRTSVVSFNEWALAN
MERS-CoV 181 DGTMYGAFMDKQVHQVQLTDKYCSVNVVAVLYAAI LNCWVFKPNRTSVVSFNEWALAN
BetaCoV_Erinace 181 DGNMYGNFQDRQIYQAQLSDKHCTIN VAWLYAAV LNCNWFVFKPNKTGVAAAFNEWALSN
MuHepatitis 178 SGNFYGPFYRDAQVVQLPVQDYTQTVNVVAVLYAAI LNCNWFVQSDSCSLEEFNVWAMTN
BtCoV_HKU5-2 181 DGVMYGAFEDRQVHQVQLSDKYCTIN VAWLYAAI LNCNWFVFKPNKTGIATFNEWAMSN
BtCoV_HKU5_ 181 DGVMYGAFEDRQVHQVQLSDKYCTIN VAWLYAAI LNCNWFVFKPNKTGIATFNEWAMSN
MuCoV_JHM 178 SGNFYGPFYRDAQVVQLPVQDYTQTVNVVAVLYAAI LNCNWFVQSDSCSLEEFNVWAMTN
RaCoV_HKU14 178 NGDFYGPFYKDAQVVQLPVQDYVQSVNFVAVLYAAI LNCNWFVQSDRCSIEDYNVWAMSN
MuCoV_hepat 178 SGNFYGPFYRDAQVVQLPVQDYTQTVNVVAVLYAAI LNCNWFVQSDSCSLEEFNVWAMTN
BtCoV_HKU4_ 181 DGVMYGAFEDKQTHQLQLTDKYCTIN VAWLYAAV LNCCKWVFKPTRVGI VTYNEWALSN

```

SARS_CoV2	238	NYEPLTQDHVDILGPLSAQTGIAVLDMCASLKELLQNGMNGRTILGSALLEDEFTPFDDV
BtCoV_279_2	238	NYEPLTQDHVDILGPLSAQTGIAVLDMCAALKELLQNGMNGRTILGSTILEDEFTPFDDV
BtRf-BetaCoV_He	238	NYEPLTQDHVDILGPLSAQTGIAVLDMCAALKELLQNGMNGRTILGSTILEDEFTPFDDV
SARS-CoV	238	NYEPLTQDHVDILGPLSAQTGIAVLDMCAALKELLQNGMNGRTILGSTILEDEFTPFDDV
SARS-CoV_PUMC02	238	NYEPLTQDHVDILGPLSAQTGIAVLDMCAALKELLQNGMNGRTILGSTILEDEFTPFDDV
BtSARS_Cov_YNLF	238	NYEPLTQDHVDVLGPLSAQTGIAVLDMCAALKELLQNGMNGRTILGSTILEDEFTPFDDV
BtCov_HKU3	238	NYEPLTQDHVDILGPLSAQTGIAVLDMCAALKELLQNGMNGRTILGSTILEDEFTPFDDV
BtCoV_Rp3_2	238	NYEPLTQDHVDILGPLSAQTGIAVLDMCAALKELLQNGMNGRTILGSTILEDEFTPFDDV
BtRf-BetaCoV_JL	238	NYEPLTQDHVDILGPLSAQTGIAVLDMCAALKELLQNGMNGRTILGSTILEDEFTPFDDV
Bat_Hp-betaCoV_	238	GYQSLTEDGVAALDPLVAQTGISVQTMCASLKDLLVHGMRGRCLISPTLEDEFTPFDDV
RousBtCoV	238	MCQSVTEESLQVLQPLAAKTGVSQVQRMSSLVLLSTGFCGKTMGSCSLEDEHTPYDVG
BtCoV_HKU9-5-2	238	MCQSVSSDSLQVLQPLAAKTGISVERMLSALKVLLSTGFCGRTIMGSCSLEDEHTPYDVG
BtCoV_HKU9-5-1	238	MCQSVSSDSLQVLQPLAAKTGISVGRMLSALKVLLSTGFCGRTIMGSCSLEDEHTPYDVG
BtVs-BetaCoV_SC	241	QFTEFIGT--HALDMLAVKTGVSVEQLLSAIQQL-NQGFQKGKQILGSSMLEDEFTPEDVN
MERS1_BetaC	241	QFTEFVGT--QSVDMMLAVKTGVAIEQLLYAIQQL-YTGFQKGKQILGSTMLEDEFTPEDVN
MERS-CoV	241	QFTEFVGT--QSVDMMLAVKTGVAIEQLLYAIQQL-YTGFQKGKQILGSTMLEDEFTPEDVN
BetaCoV_Erinace	241	QFTEFVST--QALELLAVKTGVQIEQLLYSIQQL-NNGFQGNVILGSAMLEDEFTPEDVN
MuHepatitis	238	GFSSIKAD--LVLDALASMTGVTVEQILAAIKRL-YSGFQKGKQILGSCVLEDELTPSDVY
BtCoV_HKU5-2	241	QFTEFIGT--QSVDMMLAVKTGVSVEQLLYAIQTL-HKGFQKGKQILGNSMLEDEFTPDDVN
BtCoV_HKU5_	241	QFTEFIGT--QSVDMMLAVKTGVSVEQLLYAIQTL-HKGFQKGKQILGNSMLEDEFTPDDVN
MuCoV_JHM	238	GFSSIKAD--LVLDALASMTGVTVEQMLAAIKRL-HSGFQKGKQILGSCVLEDELTPSDVY
RaCoV_HKU14	238	GFSSIKAD--LVLDALASMTGVSLENLLAAIKRL-HKGFQGRQIMGSCAFEDDELTPSDVY
MuCoV_hepat	238	GFSSIKAD--LVLDALASMTGVTVEQVLAIAIKRL-HSGFQKGKQILGSCVLEDELTPSDVY
BtCoV_HKU4_	241	QFTEFVGT--QSIDMLAHRGTGVSVEQMLAAIQSL-HAGFQKGKQILGQSTLEDEFTPDDVN

SARS_CoV2	298	RQCSGVTFQ
BtCoV_279_2	298	RQCSGVTFQ
BtRf-BetaCoV_He	298	RQCSGVTFQ
SARS-CoV	298	RQCSGVTFQ
SARS-CoV_PUMC02	298	RQCSGVTFQ
BtSARS_Cov_YNLF	298	RQCSGVTFQ
BtCov_HKU3	298	RQCSGVTFQ
BtCoV_Rp3_2	298	RQCSGVTFQ
BtRf-BetaCoV_JL	298	RQCSGVTFQ
Bat_Hp-betaCoV_	298	RQCSGVTLQ
RousBtCoV	298	RQMLGVTLQ
BtCoV_HKU9-5-2	298	RQMLGVKQLQ
BtCoV_HKU9-5-1	298	RQMLGVKQLQ
BtVs-BetaCoV_SC	298	MQIMGVVMQ
MERS1_BetaC	298	MQIMGVVMQ
MERS-CoV	298	MQIMGVVMQ
BetaCoV_Erinace	298	MQMMGVVMQ
MuHepatitis	295	QQLAGVKLQ
BtCoV_HKU5-2	298	MQVMGVVMQ
BtCoV_HKU5_	298	MQVMGVVMQ
MuCoV_JHM	295	QQLAGVKLQ
RaCoV_HKU14	295	QQLAGVKLQ
MuCoV_hepat	295	QQLAGVKLQ
BtCoV_HKU4_	298	MQVMGVVMQ

Anexo 3 Secuencia de cDNA de M^{pro} del SARS-CoV-2

9781	GTT	TTG	CAG	//	AGT	GGT	TTT	AGA	AAA	ATG	GCA	TTC	CCA	TCT	GGT	AAA	GTT	GAG	GGT	TGT	ATG	9840
3261	V	L	Q	//	S	G	F	R	K	M	A	F	P	S	G	K	V	E	G	C	M	3280
9841	GTA	CAA	GTA	ACT	TGT	GGT	ACA	ACT	ACA	CTT	AAC	GGT	CTT	TGG	CTT	GAT	GAC	GTA	GTT	TAC	9900	
3281	V	Q	V	T	C	G	T	T	T	L	N	G	L	W	L	D	D	V	V	Y	3300	
9901	TGT	CCA	AGA	CAT	GTG	ATC	TGC	ACC	TCT	GAA	GAC	ATG	CTT	AAC	CCT	AAT	TAT	GAA	GAT	TTA	9960	
3301	C	P	R	H	V	I	C	T	S	E	D	M	L	N	P	N	Y	E	D	L	3320	
9961	CTC	ATT	CGT	AAG	TCT	AAT	CAT	AAT	TTC	TTG	GTA	CAG	GCT	GGT	AAT	GTT	CAA	CTC	AGG	GTT	10020	
3321	L	I	R	K	S	N	H	N	F	L	V	Q	A	G	N	V	Q	L	R	V	3340	
10021	ATT	GGA	CAT	TCT	ATG	CAA	AAT	TGT	GTA	CTT	AAG	CTT	AAG	GTT	GAT	ACA	GCC	AAT	CCT	AAG	10080	
3341	I	G	H	S	M	Q	N	C	V	L	K	L	K	V	D	T	A	N	P	K	3360	
10081	ACA	CCT	AAG	TAT	AAG	TTT	GTT	CGC	ATT	CAA	CCA	GGA	CAG	ACT	TTT	TCA	GTG	TTA	GCT	TGT	10140	
3361	T	P	K	Y	K	F	V	R	I	Q	P	G	Q	T	F	S	V	L	A	C	3380	
10141	TAC	AAT	GGT	TCA	CCA	TCT	GGT	GTT	TAC	CAA	TGT	GCT	ATG	AGG	CCC	AAT	TTC	ACT	ATT	AAG	10200	
3381	Y	N	G	S	P	S	G	V	Y	Q	C	A	M	R	P	N	F	T	I	K	3400	
10201	GGT	TCA	TTC	CTT	AAT	GGT	TCA	TGT	GGT	AGT	GTT	GGT	TTT	AAC	ATA	GAT	TAT	GAC	TGT	GTC	10260	
3401	G	S	F	L	N	G	S	C	G	S	V	G	F	N	I	D	Y	D	C	V	3420	
10261	TCT	TTT	TGT	TAC	ATG	CAC	CAT	ATG	GAA	TTA	CCA	ACT	GGA	GTT	CAT	GCT	GGC	ACA	GAC	TTA	10320	
3421	S	F	C	Y	M	H	H	M	E	L	P	T	G	V	H	A	G	T	D	L	3440	
10321	GAA	GGT	AAC	TTT	TAT	GGA	CCT	TTT	GTT	GAC	AGG	CAA	ACA	GCA	CAA	GCA	GCT	GGT	ACG	GAC	10380	
3441	E	G	N	F	Y	G	P	F	V	D	R	Q	T	A	Q	A	A	G	T	D	3460	
10381	ACA	ACT	ATT	ACA	GTT	AAT	GTT	TTA	GCT	TGG	TTG	TAC	GCT	GCT	GTT	ATA	AAT	GGA	GAC	AGG	10440	
3461	T	T	I	T	V	N	V	L	A	W	L	Y	A	A	V	I	N	G	D	R	3480	
10441	TGG	TTT	CTC	AAT	CGA	TTT	ACC	ACA	ACT	CTT	AAT	GAC	TTT	AAC	CTT	GTG	GCT	ATG	AAG	TAC	10500	
3481	W	F	L	N	R	F	T	T	T	L	N	D	F	N	L	V	A	M	K	Y	3500	
10501	AAT	TAT	GAA	CCT	CTA	ACA	CAA	GAC	CAT	GTT	GAC	ATA	CTA	GGA	CCT	CTT	TCT	GCT	CAA	ACT	10560	
3501	N	Y	E	P	L	T	Q	D	H	V	D	I	L	G	P	L	S	A	Q	T	3520	
10561	GGA	ATT	GCC	GTT	TTA	GAT	ATG	TGT	GCT	TCA	TTA	AAA	GAA	TTA	CTG	CAA	AAT	GGT	ATG	AAT	10620	
3521	G	I	A	V	L	D	M	C	A	S	L	K	E	L	L	Q	N	G	M	N	3540	
10621	GGA	CGT	ACC	ATA	TTG	GGT	AGT	GCT	TTA	TTA	GAA	GAT	GAA	TTT	ACA	CCT	TTT	GAT	GTT	GTT	10680	
3541	G	R	T	I	L	G	S	A	L	L	E	D	E	F	T	P	F	D	V	V	3560	
10681	AGA	CAA	TGC	TCA	GGT	GTT	ACT	TTC	CAA	//	AGT	GCA	GTG	AAA	AGA	ACA	ATC	AAG	GGT	ACA	CAC	10740
3561	R	Q	C	S	G	V	T	F	Q	//	S	A	V	K	R	T	I	K	G	T	H	3580

Anexo 4. Tabla de posibles mutaciones en M^{PRO} SARS-CoV-2

Aminoácido	Codón	Posible mutación	Codones que traducen el aminoácido de la posible mutación
Ser46	UCU	Ala	GCU/GCC/GCA/GCG
		Val	GUU/ GUC/GUA/GUG
		Pro	CCU/ CCC/ CCA/CCG
		Arg	CGU/ CGC/ CGA/ CGG
		Gln	CAA/ CAG
Met 49	AUG	Leu	CUU/ CUC/ CUA/ CUG
Asn 142	AAU	Cys	UGU/ UGC
His 164	CAT	Gln	CAA*/ CAG*
Met 165	AUG	Leu	CUU/ CUC/ CUA/ CUG*
Pro 168	CCA	Ala	GCU/ GCC/ GCA*/GCG
		Ser	UCU/UCC/ UCA*/UCG
Phe 185	UUU	Tyr	UAU*/ UAC
Arg 188	AGG	Lys	AAA/ AAG*
		Ala	GCU/ GCC/ GCA/ GCG
Thr 190	ACA	Val	GUU/ GUC/ GUA/ GUG
		Ile	AUU/ AUC/ AUA*
Ala 191	GCA	Ser	UCU/UCC/ UCA*/UCG
		Pro	CCU/ CCC/ CCA*/CCG
		His	CAU/ CAC
		Tyr	UAU/ UAC
		Val	GUU/ GUC/ GUA*/GUG

*Codones que representan una mutación puntual de la proteasa M^{PRO} en los nucleótidos de los aa

Anexo 5 Resultados Completos Docking Molecular

Proteasa	Score	S (PLP)	S(hbond)	S(cho)	S(metal)	DE(clash)	DE(tors)	DE(cov)	intcor	RMS(heavy)
En Complejo con Carmofur										
SILVESTRE	67,91	-63,86	1.72	0.00	0.00	0.00	0.10	0.93	0.01	6.751
MET49LEU	69.09	-80.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.19	11.00	0.02	3.540
HIS164GLN	83.73	-85.86	0.56	0.00	0.00	0.00	0.23	3.38	0.01	4.099
MET165LEU	78.17	-83.46	0.28	0.00	0.00	0.00	0.18	5.76	0.01	3.333
En Complejo Con N3										
SILVESTRE	120.07	-120.60	4.15	0.00	0.00	0.15	4.26	8.26	3.95	-
HIS164GLN	115.15	-115.29	1.71	0.00	0.00	0.00	3.31	1.49	2.84	12.130
MET165LEU	115.69	-122.64	2.70	0.00	0.00	0.00	4.28	11.49	4.99	18.469
PHE185	123.12	-123.90	3.21	0.00	0.00	1.10	3.90	7.99	4.80	11.358
PROSER	100.80	-101.72	2.06	0.00	0.00	0.42	3.49	5.01	5.10	12.932

SERALA	67.88	-74.94	4.14	0.00	0.00	0.00	5.22	13.82	4.03	10.615
SERPRO	122.65	-134.58	1.31	0.00	0.00	0.00	3.32	11.99	2.78	13.107
THR	132.49	-134.10	2.92	0.00	0.00	0.11	4.50	5.36	3.49	14.875
ARG188	124.70	-122.70	1.94	0.00	0.00	0.00	2.08	3.13	3.45	
MET49	124.09	-119.01	3.49	0.00	0.00	0.00	3.32	2.64	3.88	
ROALA	137.50	-131.78	4.62	0.00	0.00	0.00	3.43	5.67	4.40	
ALA191VAL	67.57	-82.69	3.58	0.00	0.00	1.17	6.31	19.04	3.88	9.271