



**Casa abierta al tiempo**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA**



**“Acoplamiento molecular de metabolitos secundarios que potencialmente inhiben las conformaciones activas de la proteína Spike del virus SARS-COV-2.”**

**Tesis**

**Para obtener el grado de**

**Maestra en Biotecnología**

**PRESENTA**

**I.B.I. Susana Regina Castro Jiménez**

**Matricula: 2202800479**

**Directores:**

**Dr. Armando Mejía Álvarez**

**Dr. Cesar Millán Pacheco**

**Asesor:**

**Dr. Carlos Cabello Gutiérrez**

**Sinodales**

**Dr. Javier Barrios González**

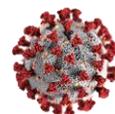
**Dr. Carlos Cabello Gutiérrez**

**Dr. Luis Arias Durán**

**Dr. Ulises Carrasco Navarro**

**Iztapalapa, Ciudad de México, 16 de agosto 2022**

**reginacastrojim@gmail.com**



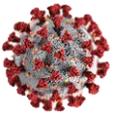
La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con la referencia 001465.

Así mismo, se contó con el Apoyo de CONACyT con el número de beca 1079808



**CONACYT**  
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología





# Agradecimientos

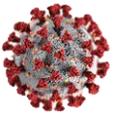
Al Laboratorio de Supercómputo y Visualización en Paralelo (LSVP) de la UAM-Unidad Iztapalapa por el uso de la súper computadora Yoltla.

A la gloriosa UAM porque sin duda ser una Pantera lo es todo.

A mi estimado director el Dr. César por compartir sus conocimientos de la forma en que lo hace, por nunca dejarme sola, por la paciencia, motivación, dedicación, las pláticas y todos sus consejos a lo largo de todo este tiempo.

A mí también director el Dr. Armando por aceptarme en el grupo de trabajo, por transmitirme en todo momento la pasión por el tema, por motivarme, por la confianza y apoyo para avanzar en todas las etapas de este proyecto.

Al laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios del Departamento de Biotecnología por enseñarme tanto en los últimos meses.



# Dedicatoria

A mis grandes pilares, mi motivación, mis incondicionales y mi inspiración mis padres  
Manuel y Susi.

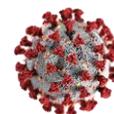
A mi Nitzi Ulises el hermano cómplice que me ha acompañado en todo momento.

A mi tío Melchor por ser mi inspiración y por todo su apoyo

A mis amigos Tere, Isaías, por siempre estar.

Los muéganos Tamy, Isa, Uriel, Iván por su cariño y sus porras.

*“Ammo quema xiquilcahua mo nelhuayohua”*



## Resumen

El virus SARS-CoV-2 ha cobrado relevancia en los últimos años, ya que es el causante de la pandemia por la enfermedad COVID-19 que ha afectado a más de 586 millones de personas y ocasionado más de 6.42 millones de muertes en todo el mundo al 11 de agosto de 2022.

La búsqueda de alternativas de prevención y tratamiento por esta enfermedad son cruciales para frenar la situación sanitaria actual. Pese a que se han propuesto diferentes tratamientos dirigidos a múltiples sitios que constituyen al virus y la aplicación masiva de vacunas a la población mundial, esto no ha sido del todo efectivo para el tratamiento de la enfermedad. Dentro de las posibles dianas terapéuticas se encuentra las proteínas estructurales entre las que destaca Spike, la cual es una proteína característica de la familia *Coronaviridae*. Por tanto, un tratamiento dirigido a esta estructura será una alternativa de amplio espectro que permite prevenir enfermedades causadas por la familia de los coronavirus.

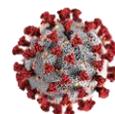
La proteína Spike de SARS-CoV-2 es la encargada de iniciar la infección al unirse al receptor de la célula huésped o enzima convertidora de angiotensina tipo 2 (ACE2). Además, lo hace de manera ordenada, motivando cambios conformacionales hasta llegar a una conformación de profusión. Los compuestos como flavonoides y/o terpenos que han mostrado tener propiedades antivirales, podrían ser alternativas que permitan bloquear la unión de la proteína Spike con el receptor ACE2.

Dada la importancia de la proteína Spike, el presente trabajo está enfocado en la búsqueda de metabolito secundarios con propiedades antivirales que puedan interferir en las conformaciones activas de la proteína Spike; además, conocer el efecto que tienen las mutaciones en la interacción de los metabolitos con las estructuras de las variantes con mayor relevancia.

Para conocer la forma en que los flavonoides y/o terpenos entran en contacto con las distintas conformaciones de la proteína Spike se seleccionaron tres estructuras representativas de esta: cerrada, semicerrada (un RBD erecto) y abierta (dos RBD erectos). De los metabolitos secundarios seleccionados con reporte de actividad antiviral, se probaron 7 quedando al final del trabajo solo dos: N7G y H7R. Mediante acoplamiento molecular (Molecular Docking) se determinó que estos compuestos presentan interacciones en distintos sitios de Spike, los cuales, han mostrado ser fundamentales para el movimiento o cambio conformacional de esta proteína durante el proceso infectivo.

Además, se mapearon las mutaciones de 16 variantes entre las que se encuentran Ómicron, Delta, Alpha, Kappa, etc. El acoplamiento molecular se realizó con Autodock Vina en cada conformación estructural, con cada compuesto y las diferentes variantes en 100 determinaciones, teniendo finalmente 9600 acoplamientos independientes.

Los resultados muestran que, las interacciones más representativas de los compuestos N7G y H7R se localizan en puntos clave del levantamiento del sitio de unión al receptor, tienen energías de interacción de  $-10.240 \pm 0.246$  kcal/mol y  $-9.794 \pm 0.325$  kcal/mol tanto en H7R como N7G en conformación cerrada, para la proteína Spike semicerrada las energías fueron de  $-9.565 \pm 0.267$  y  $-8.995 \pm 0.15$  kcal/mol respectivamente y para la estructura abierta la interacción se mantiene en  $-9.388 \pm 0.260$  kcal/mol para H7R y  $-8.960 \pm 0.052$  kcal/mol para N7G. Estos



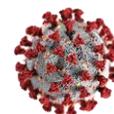
acoplamiento bloquean sitios fundamentales del movimiento necesario para iniciar el proceso infeccioso y favorecen la proyección del péptido de fusión.

Con respecto a las variantes estudiadas y a diferencia de los estudios demostrados con los anticuerpos monoclonales que han disminuido su eficiencia principalmente con la variante Ómicron, los flavonoides N7G y H7R mantienen la afinidad por la proteína Spike de Ómicron y sin importar la variante estudiada.

La energía de interacción para Spike-Ómicron con H7R es de  $-10.669 \pm 0.214$  kcal/mol en conformación cerrada, para el compuesto N7G este tiene una preferencia rotunda por el centro de la proteína estableciendo contacto con 6 de las mutaciones presentes en Ómicron entre las que destacan K417N, Y505H con una energía de  $-10.165 \pm 0.311$  kcal/mol estas interacciones se localizan dentro del motivo de unión al receptor ACE2. Las interacciones representativas para la conformación semicerrada tienen energías de  $-9.555 \pm 0.319$  y  $-8.963 \pm 0.151$  kcal/mol respectivamente entre H7R y N7G. Finalmente la proteína Spike de Ómicron en conformación abierta las energías radican entre  $-9.664 \pm 0.191$  para H7R y  $-8.961 \pm 0.05$  kcal/mol para N7G.

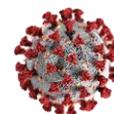
Es decir, las mutaciones presentes en la estructura proteica y basados en las energías y las interacciones parecen no ser un impedimento para una interacción favorable entre los ligandos y la proteína Spike. Adicional a lo anterior, N7G tiene un sitio de interacción igual de relevante en las conformaciones activas cercanos al péptido de fusión de membranas.

Basado en los resultados de este trabajo y en espera de análisis *in vitro* se sugiere que, N7G y H7G son flavonoides que se unen a la proteína Spike de SARS-CoV-2 sin importar la variante que hasta el momento han sido reportadas.

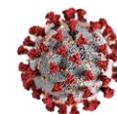


## INDICE

<b>1. Introducción</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Covid-19</b>	<b>12</b>
<b>1.2 Coronavirus</b>	<b>13</b>
1.2.1 HCoV-NL63	14
1.2.2 HCoV-229E	14
1.2.3 HCoV-OC43	15
1.2.4 HCoV-HKU1	15
1.2.5 MERS-CoV	15
1.2.6 SARS-CoV	16
<b>1.3 SARS-COV-2</b>	<b>16</b>
1.3.1 Estructura del SARS-CoV-2	16
<b>1.4 Variantes</b>	<b>18</b>
<b>1.5 Compuestos Potencialmente Activos</b>	<b>23</b>
1.5.1 Flavonoides	23
<b>1.6 Química Computacional</b>	<b>24</b>
1.6.1 Acoplamiento Molecular	25
<b>2. Antecedentes</b>	<b>27</b>
2.1 Principales dianas terapéuticas para Covid-19	27
2.2 Spike	30
2.3 Spike para el desarrollo de vacunas y como blanco terapéutico.	33
2.4 Flavonoides empleados en dianas terapéuticas	35
2.5 Estudios in silico de flavonoides similares para covid-19	36
<b>3. Justificación</b>	<b>37</b>
<b>4. Hipótesis</b>	<b>38</b>
<b>5. Objetivo General</b>	<b>38</b>
5.1 Objetivos Específicos	38
<b>6. Metodología</b>	<b>38</b>
6.1 Estrategia Experimental	39
6.2 Selección y preparación de flavonoides	39
6.3 Preparación y selección de estructura de Spike	40

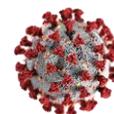


<b>6.4 Variantes de estudio .....</b>	<b>40</b>
<b>6.5 Acoplamiento Molecular.....</b>	<b>44</b>
<b>6.6 Análisis de interacciones.....</b>	<b>45</b>
<b>6.6.1 Etapa 1 Selección de estructuras en conformaciones con mayor repetición.....</b>	<b>45</b>
<b>6.6.2 Etapa 2 identificación de interacciones proteína ligando .....</b>	<b>46</b>
<b>6.6.3 Etapa 3 Energías de Afinidad.....</b>	<b>47</b>
<b>7. Resultados y Discusión .....</b>	<b>47</b>
<b>7.1 Selección de metabolitos secundarios .....</b>	<b>47</b>
<b>7.2 Acoplamiento molecular de la proteína Spike silvestre con Ligando H7R y F7G ..</b>	<b>48</b>
<b>7.2.1 Estructura en conformación cerrada.....</b>	<b>48</b>
<b>7.2.2 Estructura en conformación semicerrada .....</b>	<b>52</b>
<b>7.2.3 Estructura en conformación abierta.....</b>	<b>54</b>
<b>7.3 Interacciones relevantes en las conformaciones de la proteína Spike.....</b>	<b>57</b>
<b>7.4 Variantes del SARS CoV-2 .....</b>	<b>59</b>
<b>7.4.1 Mutaciones de la proteína Spike y su glicosilación .....</b>	<b>59</b>
<b>7.4.2 Delta.....</b>	<b>62</b>
<b>7.4.3 Ómicron.....</b>	<b>63</b>
<b>7.4.3.1 Conformación cerrada Spike-Ómicron con ligandos H7R y F7G.....</b>	<b>65</b>
<b>7.4.3.2 Conformación semicerrada y abierta de Spike-Ómicron con ligandos H7R y F7G .....</b>	<b>67</b>
<b>8. Conclusiones .....</b>	<b>72</b>
<b>9. Posibles Implicaciones .....</b>	<b>72</b>
<b>10. Perspectivas .....</b>	<b>73</b>
<b>11. Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>74</b>
<b>Anexo1.....</b>	<b>84</b>
<b>Interacciones del Acoplamiento Molecular de las 16 variantes de estudio.....</b>	<b>84</b>
<b>Energías de finidas de los clústers más poblados .....</b>	<b>92</b>



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organización del genoma del SARS-CoV-2 (tomada de Protein Data Bank <sup>9</sup> ).....	13
Figura 2. Clasificación de los Coronavirus tomado del Comité Internacional de Taxonomía de virus (ICTV)...	14
Figura 3. Proteínas Estructurales del virus SARS-CoV-2 <sup>29</sup> .....	17
Figura 4. Mutaciones compartidas de las principales variantes <sup>38</sup> .....	23
Figura 5. Mecanismos de acción de potenciales agentes terapéuticos. Se visualiza las relaciones entre el virus y la célula huésped con varias terapias y los nombres de los fármacos que están identificados por colores, tomado de Rando, et al.(2021) <sup>80</sup> .....	29
Figura 6. Mecanismo de acción de FP-07321332 y Molniravir fármacos autorizados por la OMS <sup>82</sup> .....	30
Figura 7. Dominios de la proteína Spike. Azul: Dominio de unión a receptor (RBD). Amarillo: CT RBD. Rojo: Dominio N-Terminal (NTD). Verde: CT NTD. Rosa: región del péptido de Fusión (PF). Verde claro: repetición Heptadal (HR1). Morado: región S2S2'. Lila: Dominio conector (CD).....	31
Figura 8. Secuencia de unión de la proteína S con ACE2, representan el comienzo del proceso infeccioso del virus SARS-CoV-2. Cada trímero de la proteína S están coloreados en azul, gris y dorado con ACE2 en verde, tomada de Benton et al(2020) <sup>84</sup> .....	33
Figura 9. Vacunas aprobadas por la Organización Mundial de la Salud, con sus ventajas y desventajas para su aplicación <sup>35</sup> .....	35
Figura 10. Conformaciones activas de la proteína S elegidas para el análisis de acoplamiento molecular. A conformación cerrada (6VXX), B conformación semicerrada con un RBD erecto(6VSB) y C conformación abierta dos de tres RBD's erectos (6X2B). ....	40
Figura 11. Compuestos potencialmente activos resultado de la revisión bibliográfica. ....	47
Figura 12 Proteína S cerrada, señala los dos clústeres encontrados en el análisis de resultados en interacción con F7G y H7R. A) Representa la cabeza globular de S y B) Se representa la estructura vertical de la proteína Spike, muestra todos los residuos que interactúan en cada monómero. En color rojo y naranja se localiza un primer grupo de aminoácidos que interactúan con el ligando H7R y F7G cada color representa la interacción en cada una de las cadenas. El color verde representa el clúster 2 de las interacciones.....	48
Figura 13. Tipos de interacción que tiene el ligando H7R con la proteína S en el clúster 1.....	50
Figura 14 Tipos de interacción que tiene el ligando F7G con la proteína S en el clúster 2.....	52
Figura 15. Interacciones de los ligandos H7R y F7G en la conformación semicerrada y abierta de la proteína Spike del clúster 1.....	56
Figura 16. Interacciones de los ligandos H7R y F7G en la conformación semicerrada y abierta de la proteína Spike del clúster 2. ....	57
Figura 17 Interacciones compartidas en las conformaciones de la proteína S. En color azul están resaltados los aminoácidos de una primera cadena y en color verde se localizan interacción en la cadena adyacente, se encuentran entre el dominio NTD y RBD. A) conformación cerrada (6VXX) de la proteína S con los aminoácidos señalados del cluster1. B) Mismos residuos de la conformación cerrada presentes en las estructuras semicerrada(6VSB) y cerrada(6X2B).....	58
Figura 18 Mutaciones en el genoma del SARS-CoV-2 se muestran en ampliación los aminoácidos mutados en la variante Ómicron, además la entropía de Shannon para identificar las posiciones en la secuencia genética con más susceptibilidad de mutación, tomado de Nextstrain.....	59
Figura 19. proteína Spike Glicosilada, N-glicosilaciones(azul), O-glicosilaciones (rojo), mutaciones Delta (verde), mutaciones Ómicron(naranja).....	61
Figura 20. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína S como v0 hace referencia a la secuencia de proteína Silvestre, v15 se refiere a la proteína S de la variante Ómicron. ....	65
Figura 21 Mutaciones que interactúan F7G en conformación cerrada de la proteína S de la variante ómicron. A) Estructura vertical de S-Ómicron, B) Cabeza globular de S-Ómicron, C) Estructura semicerrada de S-Ómicron posibles inhibiciones que tendría F7G basado en interacciones de la conformación cerrada.: Naranja señala las mutaciones de ómicron, en verde y amarillo la interacciones de cada protómero con F7G. ....	66
Figura 22 Interacciones interprotómeros en el centro de la proteína S-Ómicron.....	71

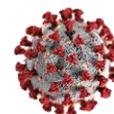


## INDICE DE DIAGRAMAS

<i>Diagrama 1 Estrategia Experimental</i> .....	39
<i>Diagrama 2. Conformación de un sistema para el estudio de variantes con los ligandos.</i> .....	45
<i>Diagrama 3. Primera etapa de análisis, generación de clústers.</i> .....	46
<i>Diagrama 4 Interacciones de F7G y H7R entre cadenas</i> .....	46

## INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Clasificación de Variantes según a la denominación por la OMS y la nomenclatura del Linaje Pango, los señalados con * representan mutaciones no localizadas en todas las secuencias.</i> .....	19
<i>Tabla 2. Listado de variantes del virus SARS-CoV-2 que fueron empleadas en el trabajo, la clasificación y el origen de cada variante.</i> .....	41
<i>Tabla 3 Interacciones del ligando H7R con cada monómero de la proteína Spike</i> .....	49
<i>Tabla 4 Interacciones del ligando F7G con cada monómero de la proteína Spike</i> .....	49
<i>Tabla 5 Interacciones de H7R con la conformación semicerrada con sus respectivas energías de afinidad promedio.</i> .....	53
<i>Tabla 6 Interacciones de la proteína S con F7G en conformación semiabierta.</i> .....	53
<i>Tabla 7 Interacciones de H7R con 6X2B conformación abierta de S.</i> .....	55
<i>Tabla 8 Interacciones de la proteína S con F7G en la estructura abierta.</i> .....	55
<i>Tabla 9 Interacciones compartidas en las conformaciones de Spike.</i> .....	57
<i>Tabla 10 Interacciones del compuesto H7R con Spike-Ómicron en estructura cerrada.</i> .....	65
<i>Tabla 11. Residuos de los aminoácidos de Spike-Ómicron que interactúan en acoplamiento con F7G en conformación cerrada.</i> .....	66
<i>Tabla 12 Interacciones del compuesto H7R con Spike-ómicron en conformación semicerrada.</i> .....	67
<i>Tabla 13 Interacciones del compuesto F7G con Spike-ómicron en conformación semicerrada.</i> .....	68
<i>Tabla 14 Interacciones del compuesto H7R con Spike-ómicron en conformación abierta.</i> .....	69
<i>Tabla 15 Interacciones del compuesto F7G con Spike-ómicron en conformación abierta.</i> .....	69
<i>Tabla 16 clasificación de las variantes de estudio</i> .....	84
<i>Tabla 17 Interacciones de ligando H7R con las 16 variantes de estudio, se enlista de acuerdo con los residuos que tienen en común.</i> .....	84
<i>Tabla 18 Interacciones con N7G de las 16 variantes estudiadas, los residuos que se enlistan tienen contacto con el ligando las conformaciones menciones.</i> .....	88
<i>Tabla 19 Energías de afinidad de la conformación cerrada en acoplamiento con H7R junto con el porcentaje de análisis y la desviación estándar.</i> .....	92
<i>Tabla 20 Energías de afinidad de la conformación semiabierta en acoplamiento con H7R junto con el porcentaje de análisis y la desviación estándar.</i> .....	93
<i>Tabla 21 Energías de afinidad de la conformación abierta en acoplamiento con H7R junto con el porcentaje de análisis y la desviación estándar.</i> .....	93
<i>Tabla 22 Energías de afinidad de la conformación cerrada en acoplamiento con N7G junto con el porcentaje de análisis y la desviación estándar.</i> .....	94
<i>Tabla 23 Energías de afinidad de la conformación semiabierta en acoplamiento con N7G junto con el porcentaje de análisis y la desviación estándar.</i> .....	94
<i>Tabla 24 Energías de afinidad de la conformación abierta en acoplamiento con N7G junto con el porcentaje de análisis y la desviación estándar.</i> .....	95



## 1. Introducción

Un coronavirus previamente desconocido, nombrado SARS-CoV-2, fue descubierto en diciembre de 2019 en Wuhan, provincia de Hubei de China. El SARS-CoV-2 está asociado con un síndrome de neumonía atípica (Covid-19) que ha afectado a más de 586 millones de personas y ocasionado más de 6.42 millones de muertes en todo el mundo al 11 de agosto de 2022.<sup>1</sup> El 30 de enero de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró que la epidemia de SARS-CoV-2 era una emergencia de salud pública de importancia internacional.

Sin embargo, a más de dos años del inicio de la pandemia las opciones de tratamiento terapéutico para este nuevo coronavirus siguen siendo limitados. Aunque los brotes anteriores de coronavirus humanos estimularon la investigación, hasta la fecha se tiene muy pocas terapias antivirales disponibles que se dirijan específicamente a este tipo de virus.

Varios grupos de investigación nacionales e internacionales han trabajado en el desarrollo de vacunas para prevenir y tratar el SARS-CoV-2, aunque estas fueron aprobadas de forma emergente, aún falta mucho por estudiar sobre ella. Aún existe una necesidad urgente de desarrollar estrategias efectivas de prevención y tratamiento contra de SARS-CoV-2.

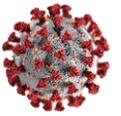
En promedio, un medicamento aprobado cuesta actualmente entre 2.000 y 3.000 millones de dólares y tarda más de 10 años en desarrollarse.<sup>2</sup> Esto se debe en parte a los costosos y largos experimentos en laboratorios, a los escasos compuestos que tienen éxito en pruebas iniciales y a las altas tasas de desgaste en las fases preclínicas y clínicas<sup>2</sup>. El uso de tecnologías computacionales basado en estructuras tiene el potencial para mitigar estos problemas.<sup>2</sup>

Mediante el *cribado* estructural, la calidad de aciertos para encontrar moléculas de interés terapéutico mejora con el número de compuestos examinados<sup>3</sup>.

Anteriormente, se han llevado a cabo investigaciones utilizando modelos computacionales con la proteína Spike (proteína S) del SARS-CoV-2, que tiene como receptor a la enzima convertidora de angiotensina tipo 2 (ACE2)<sup>4</sup>. De modo que con acoplamiento molecular se pueden identificar compuestos potenciales, antivirales con afinidad previamente estimada con la capacidad de interferir en la unión entre la proteína viral y ACE2.

El análisis de las estructuras moleculares, han sido utilizada para el descubrimiento de medicamentos como el nelfinavir contra el VIH. Los análisis computaciones tiene el potencial de reducir considerablemente el tiempo y costo que lleva el proceso de desarrollo de nuevos fármacos contra patógenos que pueden convertirse en una amenaza para la salud pública<sup>5</sup>.

En este sentido, el presente proyecto está enfocado en la búsqueda de compuestos potencialmente activos que logren un acoplamiento molecular *in silico* con la proteína Spike (S) y tengan gran afinidad por sus conformaciones activas (cerrada, semicerrada y abierta) así como evaluar el efecto que tienen los compuestos sobre el proceso de acoplamiento en las variantes reportadas. Para posteriormente en proteínas heterólogas de pseudovirus determinar el efecto *in vitro*, y frente al proceso infeccioso de SARS-CoV-2.



## 1.1 Covid-19

Los coronavirus son una familia de virus que pueden causar enfermedades como el resfriado común o enfermedades con mayor preocupación como el Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS), y el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS). En diciembre de 2019, un nuevo coronavirus, designado como Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), brotó y se propagó rápidamente causando una epidemia de neumonía inusual (Denominada COVID-19) en Wuhan, China.<sup>6</sup> En marzo de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró al COVID-19 como pandemia.<sup>7</sup>

Desde ese momento y hasta el día de hoy se han realizado incontables investigaciones para lograr frenar la pandemia causada por la enfermedad Covid-19, la búsqueda para conseguir tratamientos antivirales, que eviten la propagación y frenar la rápida infección por SARS-CoV-2 es intensa.

El genoma del SARS-COV-2 es una sola hebra de ARN que codifica una gran colección de proteínas que son sintetizados por la maquinaria ribosomal después de que el virus infecta una célula huésped. cuatro **proteínas estructurales (S, E, M, N)** empaquetan el **genoma de ARN** dentro de una **bicapa de lípidos membrana** para formar partículas virales infecciosas. dieciséis **proteínas no estructurales (NSP 1-16)** y seis **proteínas accesorias** facilitan la construcción y liberación de nuevas partículas virales y apoyar la evasión de las defensas celulares y el sistema inmunológico del huésped. (Figura 1)

Las investigaciones están dirigidas tanto al proceso de replicación del virus tomando como objetivos de estudio a proteínas no estructurales como Nsp3 que es un componente esencial del complejo de replicación/transcripción, es estudiada en varios de sus dominios.<sup>8</sup> Se ha optado como objetivos de estudio también, las proteínas estructurales que confieren estabilidad y ayudan a su propagación.

Dentro de las proteínas estructurales se encuentra la Proteína Spike (S), que se ha considerado como la proteína principal del virus, tal es su importancia que el diseño de las vacunas de emergencia autorizadas está basado en ella.

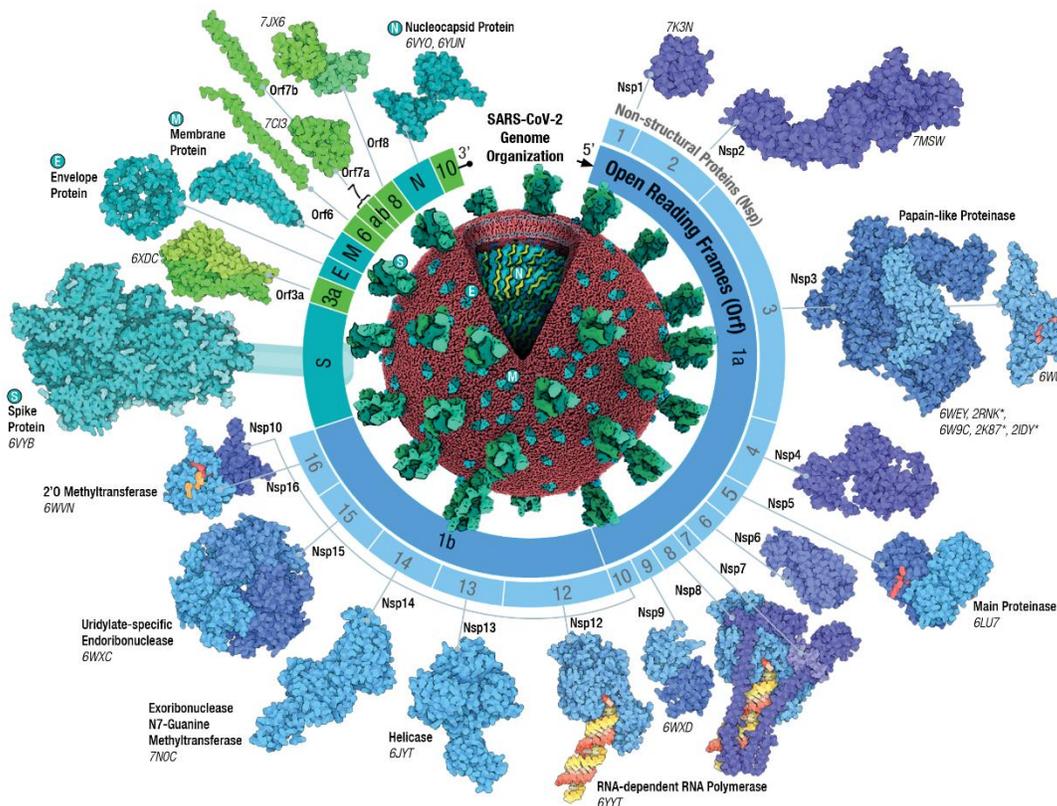
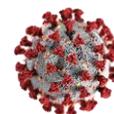


Figura 1. Organización del genoma del SARS-CoV-2 (tomada de Protein Data Bank<sup>9</sup>).

## 1.2 Coronavirus

Los coronavirus (CoV) son virus de ácido ribonucleico (ARN) monocatenario de sentido positivo con envoltura que pertenecen a la subfamilia *Orthocoronavirinae*, familia *Coronaviridae*, orden *Nidovirales*. Hay cuatro géneros de CoV: *Alphacoronavirus* ( $\alpha$ CoV), *Betacoronavirus* ( $\beta$ CoV), *Deltacoronavirus* ( $\delta$ CoV) y *Gammacoronavirus* ( $\gamma$ CoV)<sup>10</sup>. De los anteriores se sabe que, los CoV  $\alpha$  y  $\beta$  infectan a los seres humanos<sup>11, 2, 3</sup>

Antes de diciembre de 2019, se sabía que 6 CoV infectaban a humanos, incluidos 2  $\alpha$ CoV (HCoV-229E y HCoV-NL63) y 4  $\beta$ CoV (HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV y MERS-CoV) (Figura 2).<sup>12</sup>

En 2002-2003, el SARS-CoV surgió por primera vez en Guangdong, China y luego se propagó a 29 países con 8098 casos infectados y 774 muertes confirmadas. En 2012, MERS-CoV apareció en Oriente Medio. Aunque, el MERS-CoV tuvo una tasa de mortalidad más alta que el SARS-CoV (35% frente al 10%), y su transmisión fue menor.<sup>13</sup>

En diciembre de 2019 otro CoV patógeno, el nuevo coronavirus de 2019 (2019-nCoV/ SARS-CoV-2), fue reconocido en Wuhan, China. Tanto el SARS-CoV como el SARS-CoV-2 pertenecen al género  $\beta$  y al linaje B (Figura 2)<sup>2,12</sup>

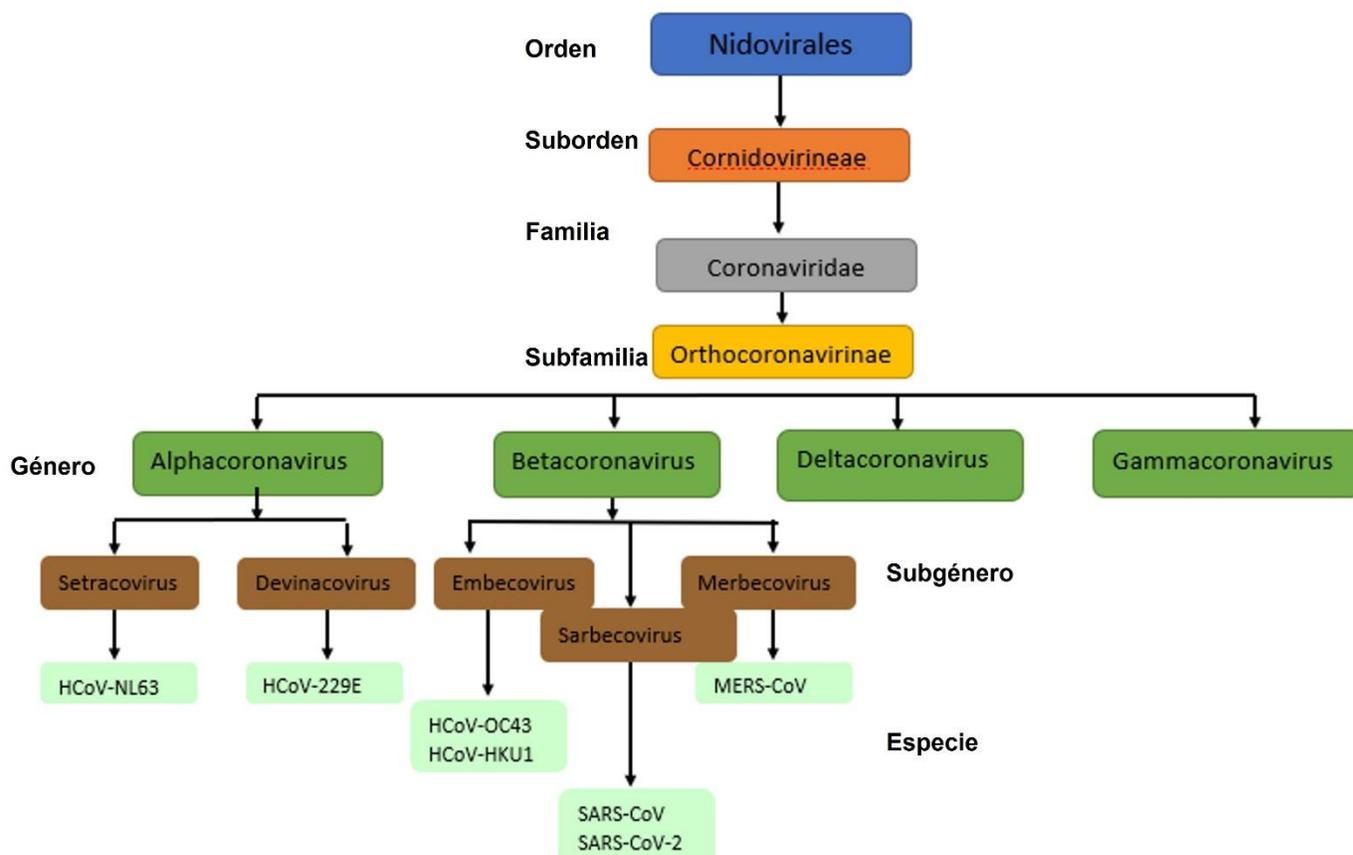
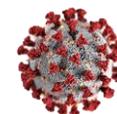


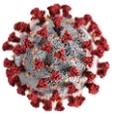
Figura 2. Clasificación de los Coronavirus tomado del Comité Internacional de Taxonomía de virus (ICTV)

### 1.2.1 HCoV-NL63

El HCoV-NL63 pertenece al grupo  $\alpha$ -coronavirus y se piensa que se origina en murciélagos y sus huéspedes son murciélagos y civetas de Palma. El genoma de este virus tiene 27,553 pb y se detectó por primera vez en un bebé en los Países Bajos en 2004.<sup>14</sup> El proceso infeccioso del virus comienza con la unión de la proteína S con la enzima convertidora de Angiotensina tipo 2 (ACE2). La entrada de virus se ve simplificada al unirse a los proteoglicanos de heparán sulfato en la superficie celular. El periodo de incubación de HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-HKU1 6, se estima que es entre dos a cuatro días debido a la baja inmunidad contra estos virus. Aunque, el HCoV-NL63 generalmente causa infecciones respiratorias de leve a moderada, se ha informado que induce a infecciones respiratorias graves.<sup>15</sup>

### 1.2.2 HCoV-229E

En 1966 Dorothy Hamre y John Procknow de la Universidad de Chicago describen un virus perteneciente al género  $\alpha$ -coronavirus, al que denominaron 229-E aislado de un estudiante de medicina en invierno de 1962.<sup>16</sup> La identidad de la secuencia genómica del HCoV-229E es 63% con el coronavirus HCoV-NL63 pertenecientes al mismo género.<sup>17</sup> La proteína Spike del virus HCoV-229E interactúa con la aminopeptidasa N (APN) o (CD13) como un receptor



funcional y la APN se expresa en las superficies apicales de muchas células receptoras, como las células dendríticas pulmonares (DC). Por lo que se plantea la hipótesis de que el HCoV-229E puede propagar su infección en el cuerpo a través de células DC.<sup>18</sup>

HCoV-229E se puede transmitir por contacto cercano y al tocar superficies contaminadas. Se ha informado de un patrón estacional para todos los HCoV con una alta disminución en invierno.<sup>15</sup>

### 1.2.3 HCoV-OC43

El HCoV-OC43 se descubrió e identificó por primera vez como un  $\beta$ -coronavirus en 1967. Las investigaciones señalan que los murciélagos son el origen y sus huéspedes son el ganado.<sup>15</sup> HCoV-OC43 utiliza al ácido N-acetil-9-O-acetilneuramínico como su receptor para unirse a la superficie celular y entrar a través de la endocitosis dependiente de caveolina-1.<sup>19</sup> La proteína M de HCoV-OC43, además de su papel de ensamblaje, puede contrarrestar la defensa antiviral del huésped al regular negativamente la expresión de IFNA1, IRF7, TLR7, MYD88, TRADD y MAVS que juegan un papel fundamental en el reconocimiento de patógenos y la activación de la inmunidad innata.<sup>20</sup> Algunos  $\beta$ -coronavirus, incluyendo HCoV-OC43 tienen otra proteína denominada HE, que se ubica entre los genes ORF1b y S involucrada en el proceso de entrada y/o liberación.<sup>13</sup>

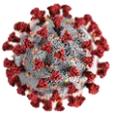
### 1.2.4 HCoV-HKU1

HCoV-HKU1 se identificó por primera vez en Hong Kong en enero de 2005. Según la clasificación del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), HKU1 es miembro del género  $\beta$ -coronavirus y parece que el origen HKU1 es en los murciélagos y su huésped natural son los ratones. HKU1 como OC43 contienen a la proteína HE. HCoV-HKU1 emplea ácidos siálicos O-acetilados como receptor primario para unirse a la superficie celular.<sup>13</sup>

### 1.2.5 MERS-CoV

MERS-CoV se aisló por primera vez en 2012 del pulmón de un paciente de 60 años que desarrolló neumonía aguda e insuficiencia renal en Arabia Saudita. Hasta el 14 de febrero de 2020, se informaron más de 2500 casos confirmados, con una tasa de mortalidad del 34.4%, lo que convierte al MERS-CoV en uno de los virus más devastadores.<sup>21</sup>

El MERS-CoV pertenece a los  $\beta$ -coronavirus y es otro patógeno zoonótico procedente de murciélagos e intermediado por camellos dromedarios. La proteína Spike de MERS-CoV tiene dos sitios de reconocimiento para la escisión por furina un sitio de escisión separa los dominios S1 y S2, así como un sitio adicional en S2' que es imprescindible para la entrada. Por lo tanto, la entrada del MERS-CoV se activa mediante una división de 2 pasos.<sup>22</sup> Dependiendo de la presencia de la enzima del huésped, los virus pueden usar diferentes vías de entrada. La fusión de la membrana celular ocurre cuando la serina proteasa transmembranal 2 (TMPRSS2) está presente e ingresa a través de la vía endosomal en presencia de cathepsina L. La Dipeptidil Peptidasa-4 (DPP4) es otro receptor de MERS-CoV que se expresa en células epiteliales del riñón, próstata, útero, tejido intestinal, cerebro, pulmones y activan los linfocitos,<sup>23</sup> por tanto DPP4 tiene un papel importante en la transmisión cruzada y en el tropismo tisular.<sup>24</sup>



### 1.2.6 SARS-CoV

En la provincia de Guangdong, China, durante el invierno de 2002 a 2003, apareció una forma inusual y a menudo mortal de neumonía, una enfermedad que posteriormente se denominó Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS). El virus SARS-CoV responsable de esta enfermedad pertenece al género  $\beta$ -coronavirus que se origina en los murciélagos y siendo las civetas de palma su huésped mediador. El punto de aparición inicial del SARS-CoV como reservorio animal fueron los mercados de animales vivos en Guangdong, donde se mantienen, comercializan y venden diversas especies animales a restaurantes en respuesta a la demanda de alimentos exóticos.<sup>25</sup>

### 1.3 SARS-COV-2

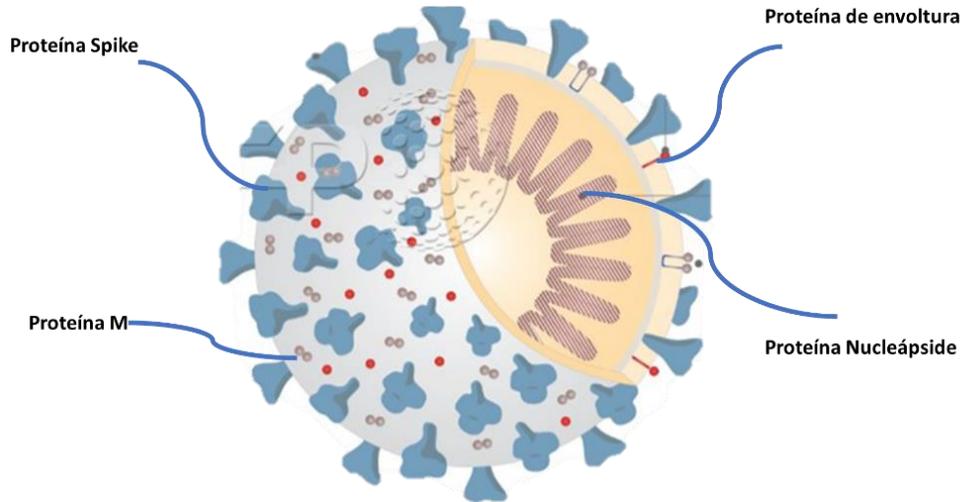
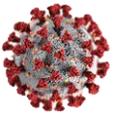
Las epidemias humanas con gravedad clínica variable que presentan manifestaciones respiratorias han sido causadas por varios CoV: SARS-CoV, SARS-CoV-2 y MERS-CoV pertenecientes a los  $\beta$ -coronavirus del linaje B y C. SARS-CoV-2 tiene una forma redonda o elíptica, y a menudo pleomórfica, y un diámetro de aproximadamente 60 a 140 nm.<sup>26</sup>

El SARS-CoV-2 tiene un genoma 82% idéntico al del coronavirus del SARS-CoV<sup>2,3</sup>, y un 51.8% de identidad con la secuencia de MERS-CoV<sup>27</sup>. El virus es filogenéticamente más cercano a un CoV similar al SARS de murciélago SL-ZC45 con 87.7% de identidad. El genoma de ARN del SARS-CoV-2 consta de 29,903 nucleótidos, que codifican a 9860 aminoácidos que a su vez conforman 29 proteínas. Los análisis genómicos sugieren que, el SARS-CoV-2 probablemente evolucionó a partir de una cepa que se encuentra en los murciélagos.<sup>10,27</sup>

El SARS-CoV-2 usa a la Enzima Convertidora de Angiotensina tipo 2 (ACE2) como receptor. La furina es capaz de escindir la glicoproteína S durante la entrada a la célula. Junto con la furina, dos enzimas celulares TMPRSS 2 y la catepsina lisosomal también pueden activar el proceso de escisión.<sup>26</sup>

#### 1.3.1 Estructura del SARS-CoV-2

El coronavirus (CoV) tiene un genoma de ARN monocatenario no segmentado de polaridad positiva, y su virión contiene 4 proteínas estructurales principales: la proteína de la nucleocápside (N), la proteína transmembrana (M), la proteína de la envoltura (E) y la proteína espiga o Spike (S)<sup>3</sup> (Figura 3) Estas proteínas forman una parte esencial en la producción del genoma viral, replicación, unión virión-receptor, formación de viriones y viroproteínas, que promueven su entrada en un organismo huésped y proliferan, propagando así la infección.<sup>28</sup>

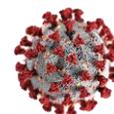


*Figura 3. Proteínas Estructurales del virus SARS-CoV-2<sup>29</sup>*

La proteína N es la única proteína que forma la nucleocápside y funciona principalmente para unirse al genoma del ARN del coronavirus. La proteína N se une al ARN viral para formar un núcleo, es una ribonucleoproteína que ayuda en la entrada de la célula huésped y en la interacción con los procesos celulares después de la fusión del virus.<sup>30</sup> La proteína N desempeña un papel en la replicación del ARN viral y la respuesta celular del huésped a la infección viral. La proteína N tiene la función de localización del retículo endoplásmico y el participa en el ensamblaje y la gemación. Además, en algunos coronavirus, se ha demostrado que la expresión de la proteína N aumenta significativamente la producción de partículas similares a virus.<sup>31</sup>

En el ensamblaje del virus, la proteína M del coronavirus juega un papel central, ya que convierte las membranas celulares en fábricas donde el virus y los factores del huésped se unen para crear nuevas partículas de virus. Las proteínas M de SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV, están dirigidas a la vecindad del aparato de Golgi. Los estudios de genética inversa sugieren que la proteína M fomenta el ensamblaje del virus al interactuar con la ribonucleoproteína viral (RNP) y las glicoproteínas S en el sitio de gemación y al crear una red de interacciones M-M capaz de excluir parte de las proteínas de la membrana del huésped de la envoltura viral.<sup>32</sup>

Mientras que, la proteína E se expresa abundantemente dentro de la célula infectada durante el ciclo de replicación, solo una pequeña porción se incorpora a la envoltura del virión. La mayor parte de la proteína se localiza en el compartimento intermedio del retículo endoplásmico (ER) y en el aparato de Golgi en el sitio del tráfico intracelular, donde participa en el ensamblaje y la gemación de CoV. Según estudios publicados, se han propuesto 3 roles para la proteína E del CoV: a) la interacción entre las colas citoplasmáticas de las proteínas M y E, lo que sugiere que E participa en el ensamblaje viral; b) su dominio transmembrana hidrofóbico es esencial para la liberación de viriones y c) está implicado en la patogenia del virus.<sup>33</sup>



La proteína S del coronavirus es la proteína estructural responsable de la forma de corona de las partículas virales CoV, a partir de la cual se acuñó el nombre original “coronavirus”. La proteína S tiene una longitud aproximada de 1200 aminoácidos y pertenece a las proteínas de fusión viral de clase I y contribuye a la unión del receptor celular, tropismo tisular y la patogénesis.<sup>34</sup>

#### **1.4 Variantes**

Los virus en general evolucionan continuamente a medida que se producen cambios en el código genético (mutaciones genéticas) durante la replicación de su genoma como es el caso del SARS-CoV-2. Es importante tener en cuenta que los virus mutan con regularidad y que el SARS-CoV-2 ha sufrido miles de mutaciones desde que apareció por primera vez. Pero es probable que solo una minoría de esas mutaciones cambie al virus de manera significativa ocasionando una facilidad de propagación, aumento en la gravedad de la enfermedad asociada, a la respuesta a la inmunidad generada por las vacunas, a la sensibilidad a los medicamentos para el tratamiento, la respuesta a los medios de diagnóstico u otras medidas de salud pública y social.<sup>35</sup>

Una variante tiene una o más mutaciones que la diferencian de otras variantes de los virus SARS-CoV-2. Como era de esperar, se han documentado múltiples variantes del SARS-CoV-2 en todo el mundo durante esta pandemia.<sup>36</sup>

La aparición tan rápida y constante de variantes que suponían un mayor riesgo para la salud pública mundial, a finales de 2020, hizo que se empezaran a utilizar las categorías específicas de variante de interés (VOI), variante de preocupación (VOC), y variantes bajo vigilancia (VUM) o variantes supervisadas (VBM), con el fin de priorizar el seguimiento y la investigación a escala mundial y, en última instancia, orientar la respuesta a la pandemia de COVID-19.<sup>35,37</sup>

##### **Variante de Interés (VOI)**

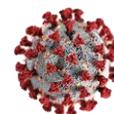
Una variante VOI del SARS-CoV-2 es aquella con marcadores genéticos específicos que se han asociado con cambios en la unión al receptor, neutralización reducida por anticuerpos generados contra infecciones o vacunas previas, eficacia reducida de los tratamientos, impacto diagnóstico potencial o aumento previsto en la transmisibilidad o gravedad de la enfermedad.<sup>37</sup>

##### **Variantes de Preocupación (VOC)**

Una variante VOC del SARS-CoV-2 es aquella para la cual hay evidencia de un aumento en la transmisibilidad, enfermedad más grave (por ejemplo, aumento de hospitalizaciones o muertes), reducción significativa en la neutralización por anticuerpos generados durante una infección o vacunación previa, efectividad reducida de tratamientos o vacunas, o fallas en la detección diagnóstica.<sup>37</sup>

##### **Variantes bajo vigilancia (VUM) o variantes supervisadas (VBM)**

Las variantes designadas como VBM incluyen aquellas en las que los datos indican que existe un impacto potencial o claro en las contramedidas médicas aprobadas o autorizadas, o que se



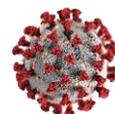
han asociado con una enfermedad más grave o una mayor transmisión pero que ya no se detectan o circulan a niveles muy bajos. Estas variantes no representan un riesgo significativo e inminente para la salud pública.<sup>37</sup>

Una variante de interés o una variante de preocupación puede ser degradada a esta lista después de una reducción significativa y sostenida en sus proporciones nacionales y regionales a lo largo del tiempo, u otra evidencia indica que una variante no representa un riesgo significativo para la salud pública.<sup>35</sup>

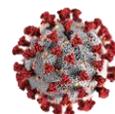
La tabla 1 describe las variantes reportas hasta el mes de abril del 2022, clasificadas según la CDC y la OMS, a que linaje Pango pertenece cada una, la fecha de su clasificación, además del país donde fue reportada por primera vez.

*Tabla 1. Clasificación de Variantes según a la denominación por la OMS y la nomenclatura del Linaje Pango, los señalados con \* representan mutaciones no localizadas en todas las secuencias.*

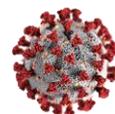
Denominación de la OMS	Linaje Pango	Origen	Mutaciones y deleciones	Fecha de designación
Variantes de Preocupación				
Delta	B.1.617.2	India, octubre 2020	T19R (V70F*) T95I G142D E156- F157- R158G (A222V*) (W258L*) (K417N*) L452R T478K D614G P681R D950N	VOI: 04/04/2021 VOC: 11/05/2021
Ómicron	B.1.1.529	Sudáfrica, noviembre 2021	A67V del69-70 T95I del142-144 Y145D del211 L212I ins214EPE G339D S371L	VUM: 24/11/2021 VOC: 26/11/2021



			S373P S375F K417N N440K G446S S477N T478K E484A Q493R G496S Q498N N501Y Y505H T547K D614G H655Y N679K P681H N764K D796Y N856K Q954H N969K L981F	
Variantes supervisadas				
Alfa	B1.1.7	Reino Unido, Septiembre 2020	H69- V70- Y144- E484K* S494P* N501Y A570D D614G P681H T716I S982A D1118H	VOC: 29/12/2020 MBV:21/09/2021
Beta	B.1.351	Sudáfrica, mayo 2020	D80A D215G L241- L242- A243- K417N E484K	VOC: 29/12/2020 MBV:21/09/2021

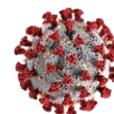


			N501Y D614G A701V	
Gamma	P.1	Brasil, noviembre 2020	L18F T20N P26S D138Y R190S K417T E484K N501Y D614G H655Y T1027I L1164F	VOC: 29/12/2020 MBV:21/09/2021
Épsilon	B.1.4.27 B.1.429	EUA, marzo 2020	S13I W152C L452R D614G S813I S1159I	VOC: 19/3/2021 VOI:26/02/2021 VOI:29/06/2021 MBV:21/09/2021
Eta	B.1.525	Reino Unido/ Nigeria, diciembre2020	Q52R* A67V H69- V70- Y144- E484K D614G Q677H F888L	VOI: 26/02/2021 MBV: 21/9/2021
Lota	B.1.526	EUA, noviembre 2020	L5F T95I D253G S477N E484K D614G A701V L1151F	VOI: 26/02/2021 MBV:21/9/2021
Kappa	B.1.617.1	India, octubre 2020	T95I* G142D* E154K* L452R E484Q D614G P681R Q1071H	VOI: 7/05/2021 MBV: 21/9/2021



Zeta	P.2	Brasil, abril 2020	E484K F565K D614G	VOI: 26/02/2021 MBV:21/09/2021
N/A	B.1.617.3	India octubre 2020	T19R G142D L452R E484Q D614G P681R D950N	VOI:07/05/2021 MBV:21/09/2021
Mu	B.1.621 B.1.621.1	Colombia, enero 2021	T95I Y144S Y145N R346K E484K N501Y D614G P681H D950N	MBV:21/09/2021
N/A	B.1.526.1	EUA, noviembre 2020	D80G F157S L452R D614G T791I T859N D950H	VOI: 26/02/2021
N/A	B.1.617	India, octubre 2020	L452R E484Q D614G	VOI:07/05/2021

El mayor número de mutaciones se concentra en la variante ómicron, con más de 30 sustituciones tan solo en la proteína S; sin embargo, existen mutaciones que son compartidas entre las variantes que en su momento fueron de preocupación, lo que significa que representan un mayor riesgo de contagio por su transmisibilidad y resistencia a los anticuerpos ya



demostrado. La Figura 4 muestra el diagrama de las mutaciones compartidas entre las variantes más importantes.

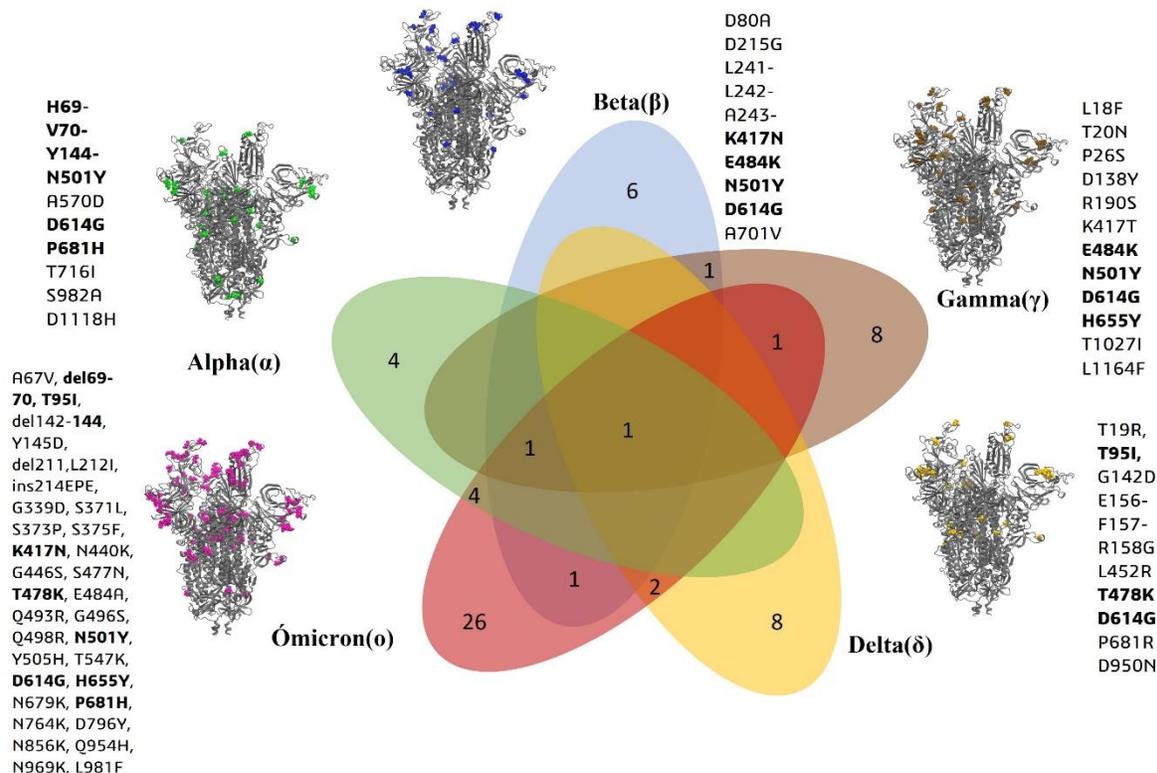


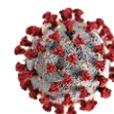
Figura 4. Mutaciones compartidas de las principales variantes<sup>38</sup>.

## 1.5 Compuestos Potencialmente Activos

A pesar de que SARS y MERS surgieron anteriormente y hubo investigación, el proceso para encontrar terapias antivirales disponibles que se dirijan específicamente a estos virus ha sido complicado.<sup>39,40</sup> Hay varios informes que proponen fármacos potenciales, para la infección por SARS-CoV-2 y la enfermedad por COVID-19. Estos medicamentos incluyen: cloroquina, lopinavir/ritonavir, remdesivir, umifenovir, análogos de nucleósidos, inhibidores de la neuraminidasa, inhibidores de la síntesis de ADN, péptidos basados en ACE2, nuevos inhibidores de la proteasa vinilsulfona, teicoplanina, proteotrilina similar a la quimio-3 (3CLpro) e inhibidores de proteasa tipo papaína (PLpro)<sup>41,42</sup>. Pero hasta el momento, la FDA solo ha aprobado el uso de Remdesivir para el tratamiento de COVID-19 en pacientes hospitalizados, el Molnupiravir dirigido a la polimerasa encargada de la replicación del virus, comercializada por la farmacéutica Merck, Por su parte Pfizer comercializa Paxlovid encargada de la inhibición de la proteasa principal de virus. Pero al final de todo son compuestos que no fueron diseñados para aliviar síntomas de COVID-19, o que necesitan ir acompañados de algún potenciador, además, el costo de adquisición es muy elevado.

### 1.5.1 Flavonoides

Los flavonoides se definen como importantes compuestos naturales con estructura fenólica, son compuestos que presentan un esqueleto de quince carbonos que consta de dos anillos de



benceno conectados a través de un anillo de pirano. Estos compuestos se clasifican por su estructura química, nivel de oxidación y el patrón de sustitución de su anillo de pirano heterocíclico, también conocido como anillo C.<sup>43</sup>

La clasificación de los compuestos individuales dentro de cada clase se basa en la sustitución de los anillos de benceno, estos pueden ser flavanones, flavonoles, flavanoles, flavonas, isiflavonoides, chalconas y antocianinas. Los flavonoides son metabolitos secundarios de las plantas responsables de su color, sabor y están relacionados con las actividades farmacológicas de las plantas. Los flavonoides poseen importantes capacidades antibacterianas, antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias e inmunomoduladores. Además, los flavonoides ejercen una fuerte capacidad antiviral en numerosas patologías. Más importante aún, los flavonoides demostraron actividades antivirales e inmunomoduladores contra los coronavirus.<sup>43</sup>

Varios flavonoides se han descubierto que inhiben diferentes dianas de los coronavirus SARS y MERS.<sup>44</sup> A su vez, bloquean las actividades enzimáticas de proteasas virales como la proteasa similar a la 3-quimotripsina (3CLpro), la proteasa similar a la papaína (PLpro) y helicasa o interfiriendo con proteína Spike (S)<sup>45</sup>.

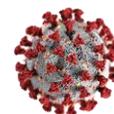
La mayoría de los estudios sobre flavonoides, se realizan *in vitro* basándose en el hecho de que estos compuestos polifenólicos a menudo tienen baja biodisponibilidad, poca estabilidad y mala distribución cuando se prueban *in vivo* utilizando modelos de células animales o humanas.<sup>40,46</sup> Existen diferentes estrategias reportadas para potenciar estas funciones, como la introducción de modificaciones estructurales, potenciadores de la absorción o nanotecnología.<sup>47,48</sup>

Debido a su baja estabilidad y poca disponibilidad de los flavonoides se ha hecho uso de otras tecnologías como el acoplamiento molecular con fines de detección. El acoplamiento molecular ha permitido identificar cualquier interacción potencial que sea candidato a alternativa de tratamiento, por ejemplo, se han logrado evaluar muchos fármacos existentes como lopinavir, oseltamivir, ritonavir y favipiravir, además compuestos flavonoides y péptidos sintéticos, reduciendo así los tiempos de estudio.<sup>49</sup>

## 1.6 Química Computacional

Paralela al desarrollo exponencial de la computación en los años ochenta, surge en las grandes empresas farmacéuticas una rama de la química, la química computacional. Surge de la necesidad de obtener resultados más precisos a las ecuaciones desarrolladas a partir de la ecuación de Schrödinger capaz de explicar el espectro de los sistemas hidrogenoides dando origen a la química cuántica y es ampliamente utilizada en el diseño de nuevos medicamentos y materiales.<sup>50</sup>

Para la descripción del comportamiento de la materia a nivel molecular fueron desarrollados los métodos *ab initio* y métodos atomísticos. Las técnicas *ab initio* describen la estructura electrónica y la reactividad de sistemas moleculares a partir de postulados mecano-cuánticos; mientras que, los métodos atomísticos utilizan los principios de la mecánica clásica para simular sistemas a nivel atómico, pudiendo determinarse de esta manera propiedades macroscópicas a partir de postulados de la física estadística.<sup>51</sup> La metodología atomística produce como



resultado la información necesaria para explicar los detalles del comportamiento proveniente de la interacción proteína-ligando en sistemas de interés biológico.<sup>52</sup>

Mientras que la química teórica permite el desarrollo de modelos para describir cualquier sistema químico, independientemente de su complejidad, la química computacional pretende brindar las técnicas operacionales para resolver los modelos teóricos y para probar su validez mediante la comparación simultánea con los datos experimentales.

Con la ayuda de la química computacional se pueden obtener diversos cálculos, que han ayudado al desarrollo de nuevos materiales, fármacos, entre otros, sin involucrar costos o experimentación innecesaria.<sup>50</sup>

Algunos ejemplos son los siguientes:

- I. Los arreglos geométricos de los átomos que corresponden a moléculas estables y al estado de transición.
- II. Las energías relativas de varias moléculas.
- III. Momento dipolar, polarizabilidad.
- IV. Propiedades espectroscópicas como corrimientos químicos y constantes de acoplamiento, frecuencias vibracionales.
- V. Propiedades termoquímicas.
- VI. La rapidez con la que sucede una reacción.
- VII. La dependencia de algunas propiedades, como la estructura molecular con el tiempo

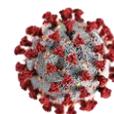
Más recientemente, la química computacional se ha enfocado en el diseño de compuestos que presenten no sólo una elevada afinidad por su receptor, sino también una optimización de sus propiedades farmacéuticas, que aseguran un balance en la absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad del fármaco, Las técnicas como la Dinámica Molecular (DM) y el método de Monte Carlo (MC) han sido fundamentales para la correcta interpretación de resultados experimentales, muchas veces ambiguos o contradictorios.<sup>53</sup>

### 1.6.1 Acoplamiento Molecular

El acoplamiento molecular o *Molecular Docking* es una de técnicas computacionales de mayor importancia en el modelado molecular. Con acoplamiento molecular se predice la conformación más adecuada de una molécula al estar unida con otra para lograr formar un complejo estable. La orientación preferida es usada para predecir la fuerza de interacción también conocida como energía de afinidad o energía de unión entre dos moléculas usando funciones de puntuación definidos por cada programa.

El Acoplamiento Molecular es una técnica muy usada para predecir la orientación del enlace de moléculas pequeñas (ligandos o compuestos), que podrán ser candidatas a fármacos, con la proteína que será el blanco y ejercerá en ella su acción, de esta forma se podrá predecir la afinidad y la actividad del ligando.<sup>54</sup>

Debido a la importancia biológica y farmacéutica han trabajado en los últimos años en la mejora de cada método usado para predecir el anclaje molecular, disminuyendo cada vez más el requerimiento computacional y el tiempo de análisis.<sup>54</sup> El Acoplamiento Molecular es visto regularmente como la optimización de un mecanismo de búsqueda describiendo el “mejor anclaje” del ligado cuando se une a la proteína de interés. Sin embargo, tanto el ligando como la proteína son sistemas flexibles (acoplamiento flexible), por lo tanto, durante el proceso, el ligando y la proteína ajustan su conformación para lograr el “mejor anclaje” global o bien, la



proteína puede permanecer rígida; mientras, el ligando (por sus ángulos de torsión) se ajusta para lograr el “mejor anclaje” (acoplamiento rígido).

El objetivo de esto es simular computacionalmente el proceso de reconocimiento molecular con el fin alcanzar una conformación óptima tanto para la proteína, como para su ligando, haciendo que la orientación entre estos minimice la energía libre.<sup>55</sup>

Para llevar a cabo un ensayo de acoplamiento proteína-ligando o proteína-proteína, es necesaria la estructura 3D de la proteína de estudio, la cual puede haber sido determinada principalmente a través de técnicas biofísicas como la cristalografía de rayos X (Rx) o Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la Microscopia Electrónica (3DEM)<sup>9</sup>

Las coordenadas de la proteína en formato pdbqt y los datos del o los ligandos potenciales son los valores que se ingresan al programa para calcular el acoplamiento.

La función de puntuación y el algoritmo de búsqueda son los factores que darán éxito al programa de acoplamiento molecular.

El algoritmo de búsqueda consiste en la búsqueda espacial de las conformaciones (poses) y orientaciones posibles que puede haber en el acoplamiento proteína-ligando.

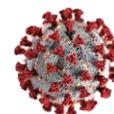
Como el componente más importante del acoplamiento molecular, las funciones de puntuación tienen tres funciones principales<sup>56</sup>: la primera es determinar el modo y el sitio de unión de un ligando que se une a una proteína<sup>51</sup>; el segundo es predecir la afinidad de unión absoluta entre la proteína y el ligando en la optimización<sup>52</sup>; el tercero es el cribado virtual, que puede identificar posibles fármacos para una determinada proteína diana mediante la búsqueda en una gran base de datos de ligandos.<sup>55</sup>

La función de puntuación toma una pose como dato a introducir y entrega un número, indicando si la interacción puede ser favorable. La mayoría de las funciones de puntuación están basadas en la mecánica de la física molecular por campos de fuerza que estiman la energía de la pose; así una energía baja (negativa) indica un sistema estable y por tanto con una mayor posibilidad de que así se lleve a cabo la interacción.<sup>57</sup>

Una interacción proteína-ligando pueden resultar en la activación o la inhibición de la proteína que puede ser una enzima en tal caso. Si la proteína es un receptor, el resultado del enlace con el ligando puede resultar en un agonismo o antagonismo. El acoplamiento molecular es usado en el campo del diseño de fármacos, ya que la mayoría de estos son pequeñas moléculas orgánicas. Dentro de las aplicaciones del acoplamiento molecular se encuentra:

- La identificación de ligandos potenciales: Las funciones de puntuación pueden ser usadas para encontrar rápidamente grandes bases de datos con fármacos *in silico* potenciales, de esta manera se pueden descubrir ligandos que tienen una mayor probabilidad de enlazar a una proteína de nuestro interés.
- Optimización dirigida: el acoplamiento molecular puede ser usado para predecir dónde y en qué orientación relativa el ligando enlazará con la proteína. Esta información puede usarse para diseñar análogos más potentes y selectivos.

El Acoplamiento Molecular es un campo que ha venido creciendo mucho en los últimos años. Entre algunas de las aportaciones se encuentran las de David S. Goodsell, quien fue el creador del programa llamado AutoDock<sup>58</sup>, cuyo objetivo es el estudio de compatibilidad de moléculas pequeñas llamadas ligandos con moléculas grandes llamadas receptores como candidatas a la formación de fármacos; también está la aportación de Kuntz Group creador del programa llamado UCSFdock<sup>59</sup> y recientemente el Dr. Oleg Trott quien diseñó el programa AutoDock Vina<sup>54</sup> en el Graphics Lab molecular del Instituto de Investigación Scripps, dicho programa junto con Smina<sup>60</sup> son de código abierto para hacer acoplamiento molecular.



El programa AutoDock, el cual consta de un conjunto de herramientas de conexión automatizadas diseñado para predecir la forma en la cual pequeñas moléculas, tales como ligandos o sustratos candidatos a fármacos, pueden unirse a un receptor de una molécula cuya estructura 3D es conocida. Autodock consta de dos generaciones de software: AutoDock 4 y AutoDock Vina. AutoDock Vina, el cual es una nueva generación de software que logra mejoras significativas en la exactitud promedio de las predicciones del modo de unión en comparación con AutoDock 4. Vina utiliza una función de puntuación más simple que permite un método de búsqueda más rápido y a la vez proporciona resultados reproducibles para sistemas más grandes con más de 20 enlaces flexibles.<sup>54</sup>

Vina utiliza el algoritmo genético Lamarckiano (LGA), el cual es un algoritmo genético híbrido con búsqueda local. Un algoritmo genético es un método de búsqueda basado en la mecánica de la selección natural y de la genética natural. Combina la supervivencia del más apto entre estructuras de secuencias con un intercambio de información estructurado, aunque aleatorizado, para constituir así un algoritmo de búsqueda que tenga algo de las genialidades de los procesos evolutivos naturales.<sup>61</sup>

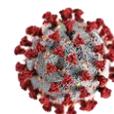
En estudios donde se aplica el acoplamiento molecular, usualmente se considera la mejor pose aquella que reporta la menor energía de unión. Alternativamente, puede ser seleccionada del clúster más poblado entre los clústers obtenidos después del acoplamiento molecular y, en ocasiones, también se selecciona el menor valor de RMSD (Root Mean Square Deviation) con respecto a una estructura de referencia<sup>52</sup>

En los últimos 20 años se han desarrollado más de 60 herramientas y programas de acoplamiento diferentes para uso académico y comercial, como DOCK<sup>62</sup>, AutoDock4<sup>63</sup>, FlexX<sup>64</sup>, Surflex<sup>65</sup>, GOLD<sup>66</sup>, ICM<sup>67</sup>, Glide<sup>68</sup>, Cdocker, LigandFit<sup>62</sup>, MCDock, FRED<sup>69</sup>, MOE-Dock<sup>70</sup>, LeDock<sup>71</sup>, AutoDock Vina<sup>54</sup>, rDock<sup>72</sup>, UCSF Dock<sup>59</sup> y muchos otros. Aunque las estrategias en la ubicación del ligando difieren unas de otras, estos programas se clasifican en términos generales desde enfoques de construcción incremental, como FlexX, hasta algoritmos basados en formas, algoritmos genéticos (GOLD), técnicas de búsqueda sistemática (Glide) y simulaciones Monte Carlo (LigandFit).<sup>73</sup>

## 2. Antecedentes

### 2.1 Principales dianas terapéuticas para Covid-19

Las terapias dirigidas al virus SARS-CoV-2 tienen el potencial de evitar que las personas infectadas con SARS-CoV-2 desarrollen síntomas potencialmente dañinos. Las terapias antivirales impiden la propagación de un virus dentro del huésped, en lugar de destruir las copias existentes del virus, y estos medicamentos pueden variar en su especificidad para una gama estrecha o amplia de objetivos virales. Este proceso requiere inhibir el ciclo de replicación del material genético viral. A diferencia de los virus de ADN, que pueden usar las enzimas del huésped para propagarse, los virus de ARN como el SARS-CoV-2 dependen de su propia polimerasa, la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP) para la replicación.<sup>74</sup> Por lo tanto, RdRP es un objetivo potencial de los antivirales contra los virus de ARN. La interrupción de RdRP es el mecanismo propuesto subyacente al tratamiento de SARS y MERS con ribavirina.<sup>75</sup>



Considerando los componentes básicos naturales para la síntesis de ARN, un enfoque alternativo ha sido explorar los análogos de nucleósidos y nucleótidos por su potencial para inhibir la replicación viral. Los análogos que contienen modificaciones en los componentes pueden interrumpir procesos clave, incluida la replicación.<sup>76</sup>

Un antiviral candidato considerado para el tratamiento de COVID-19 es Favipiravir (Avigan), también conocido como T-705, que fue descubierto por Toyama Chemical Co. Ltd. Favipiravir (6-fluoro-3-hidroxi-2-pirazinacarboxamida) actúa como una purina y un análogo de nucleósido de purina que inhibe la ARN polimerasa viral de manera dependiente de la dosis en una variedad de virus de ARN, incluidos los virus de la influenza (Figura 5).<sup>77</sup>

Otro análogo de nucleósido, remdesivir, es uno de los pocos tratamientos contra el COVID-19 que ha recibido la aprobación de la FDA. Remdesivir (GS-5734) es un antiviral intravenoso propuesto por Gilead Sciences como posible tratamiento para la enfermedad por el virus del Ébola. El remdesivir se metaboliza a GS-441524, un análogo de adenosina que inhibe una amplia gama de polimerasas y luego evade la reparación de la exonucleasa, provocando la terminación de la cadena (Figura 5).<sup>78</sup> Gilead recibió una autorización de uso de emergencia para remdesivir de la FDA a principios de la pandemia (mayo de 2020) y luego se descubrió que reducía la mortalidad y el tiempo de recuperación en un ensayo clínico de fase 3, doble ciego, controlado con placebo realizado en 60 ensayos, 45 de los cuales estaban en los Estados Unidos.<sup>79</sup>

En la (Figura 5), se visualiza la relación entre la célula huésped y los diversos mecanismos de acción de agentes terapéuticos potenciales que se han estudiado y aprobado para atacar al virus SARS-CoV-2 o modificar el entorno del huésped a través de distintos mecanismos.

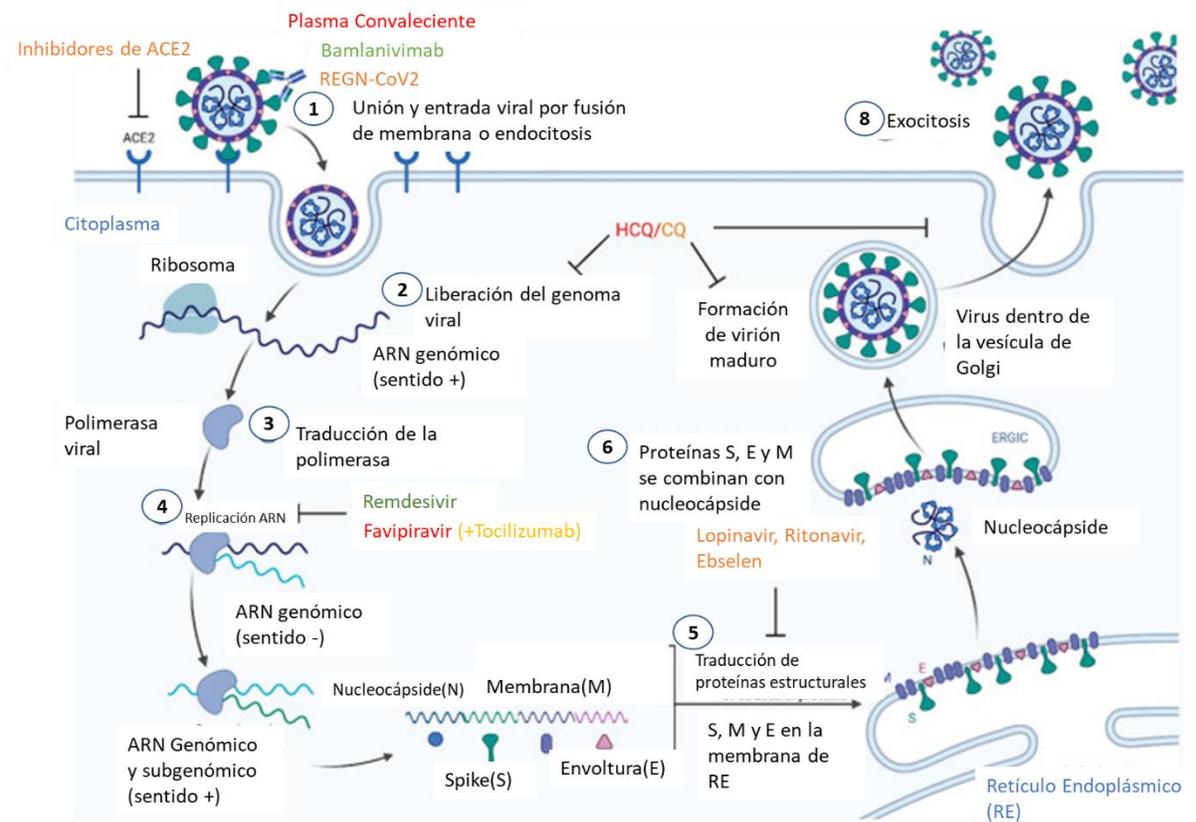
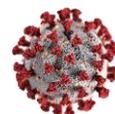


Figura 5. Mecanismos de acción de potenciales agentes terapéuticos. Se visualiza las relaciones entre el virus y la célula huésped con varias terapias y los nombres de los fármacos que están identificados por colores, tomado de Rando, et al.(2021)<sup>80</sup>

En noviembre de 2021 y a medida que aumentan las complicaciones por el virus, las farmacéuticas Pfizer y Merck anunciaron los productos destinados a tratamiento de Covid-19 con resultados prometedores en ensayos clínicos. Cuando el SARS-CoV-2 infecta las células, se reproduce y se propaga, pero el coronavirus depende de docenas de proteínas virales y del huésped para completar su ciclo de vida.

La píldora oral de Pfizer inhibe la proteasa principal viral utilizada para crear otras proteínas para el virus. Por otro lado, el medicamento de Merck inserta un bloque de construcción de ARN defectuoso cuando el virus usa la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP), para copiar su genoma. El tratamiento de Pfizer en realidad consta de dos medicamentos distintos: el inhibidor de la proteasa SARS-CoV-2 diseñado por Pfizer, conocido como Paxlovid (PF-07321332) (Figura 6) y un medicamento genérico contra el VIH llamado ritonavir que aumenta la eficacia de los inhibidores de la proteasa. El molnupiravir (Figura 6) funciona de manera muy diferente a un inhibidor de la proteasa. Engaña al SARS-CoV-2 para que incorpore el compuesto en su información genética, codificada por ARN, y al hacerlo, muta el virus hasta un punto en el que puede replicarse por más tiempo, la replicación infinita de la información genética ocasiona la pérdida de la funcionalidad del virus.<sup>81</sup>

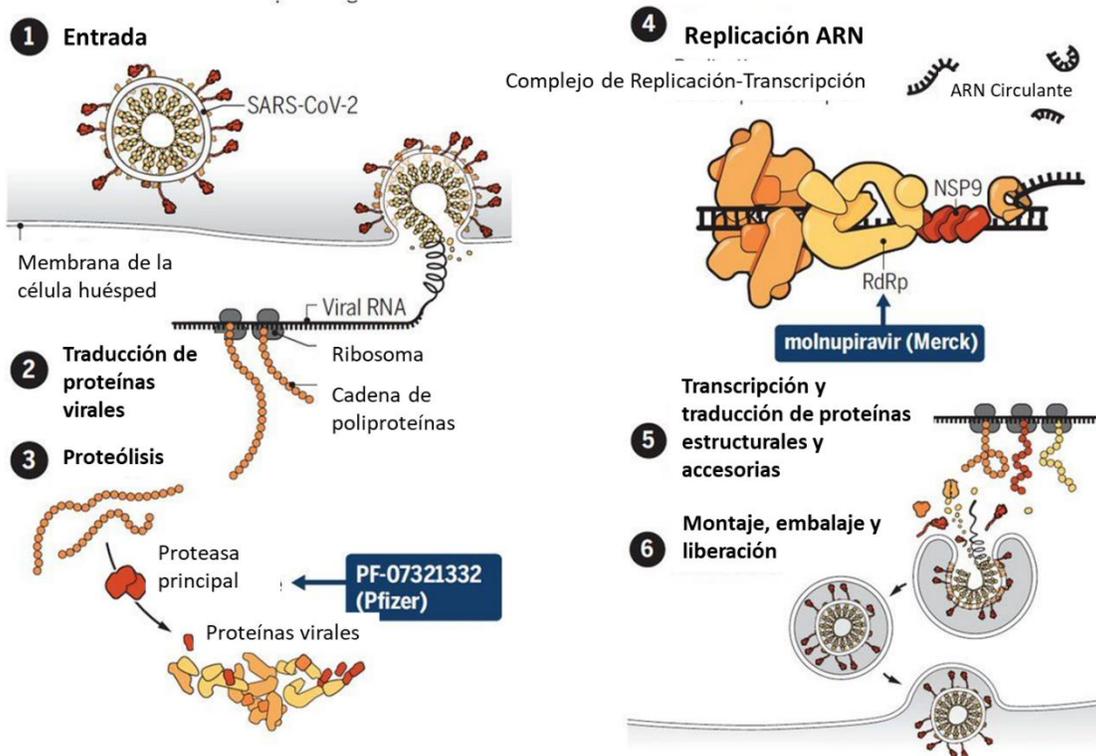
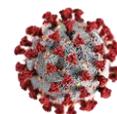
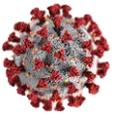


Figura 6. Mecanismo de acción de FP-07321332 y Molnuiravir fármacos autorizados por la OMS<sup>82</sup>

Además de numerosos tratamientos dirigidos a la replicación del virus también se han buscado alternativas de tratamiento abordando distintas proteínas. Las principales son las proteínas estructurales del SARS-CoV-2. Algunos tratamientos están encaminados a inhibir a la proteína Spike considerada la proteína principal del virus.

## 2.2 Spike

La proteína S consta de un tallo helicoidal central, que comprende dominios S1 y S2. El dominio S2 es responsable de la fusión y entrada del virus en la célula huésped y además está cubierto en la parte superior por S1.<sup>83</sup> El dominio S1 juega un papel esencial en la unión inicial con los receptores de la célula huésped y consta de dos grandes subdominios, el subdominio N-terminal (NTD) (residuos 14-303) y el subdominio de unión al receptor (RBD) (residuos 319-541)(Figura 7).<sup>84</sup>

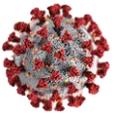


*Figura 7. Dominios de la proteína Spike. Azul: Dominio de unión a receptor (RBD).  
Amarillo: CT RBD. Rojo: Dominio N-Terminal (NTD). Verde: CT NTD. Rosa: región del  
péptido de Fusión (PF). Verde claro: repetición Heptada1 (HR1). Morado: región S2S2'.  
Lila: Dominio conector (CD)*

En las membranas del virus, un gran número de proteínas S glicosiladas cubren la superficie del SARS-CoV-2.<sup>79</sup> Un total de 22 sitios de N-glicosilación y 17 O-glicosilaciones están presentes en la proteína S.<sup>3,85,86</sup> La porción N-terminal del dominio S1 está altamente glicosilada; mientras que, el dominio S2 está glicosilado intermitentemente dentro de toda la región que inicia la fusión viral dentro de las células huésped.<sup>83</sup>

Las estructuras resueltas mediante microscopía crioelectrónica (crio-EM) proporcionan evidencia de que la proteína Spike se encuentra en una conformación cerrada (pre-fusión) y abierta (post-fusión).<sup>83</sup> La conformación cerrada de la proteína S es aquella en la que el RBD cubre el núcleo S2, y una conformación abierta es aquella donde el RBD se expone para la unión con el receptor de la célula huésped, la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2).<sup>84</sup> Luego de esta unión se fusionan las membranas virales con la del huésped a través de la subunidad S2 (Figura 8).<sup>87</sup> El virus SARS-CoV-2 se replica en células epiteliales primarias de las vías respiratorias, los pulmones y el sistema gastrointestinal principalmente.<sup>88</sup>

El dominio S1 se compone principalmente de hojas  $\beta$  en el centro. Ambos lados de las hojas  $\beta$  están rodeados por varias hélices  $\alpha$  y se pliegan en una arquitectura en forma de V. Particularmente, el pliegue estructural muestra que el dominio de unión al receptor (RBD) se empaqueta contra la región N-terminal. Estas dos regiones están conectadas por un bucle de



bisagra que les permite plegarse entre sí. Además, el RBD está cubierto con una conformación de bucle flexible en la parte superior de su cabeza globular.<sup>83,84,89</sup>

El dominio S2 se compone principalmente de hélices  $\alpha$  y hojas  $\beta$  y está altamente glicosilado. Similar a S1, las hojas  $\beta$  en S2 también ocupan el centro del núcleo del trímero y están rodeadas por hélices  $\alpha$  en el exterior. Estos dos dominios están conectados por un bucle largo y flexible que proporciona movimiento y flexibilidad a estos dominios. Tres subunidades monoméricas de proteína S se ensamblan y forman una unidad funcional, que se une a la proteína de la envoltura a través de la región transmembranal (región C-terminal). Tras el ensamblaje, el RBD ocupa la parte superior del homotrímero y forma una cabeza globular y sobresale de la superficie de la célula viral.<sup>83</sup>

Antes de entrar en contacto la proteína S con su receptor se encuentra con los dominios de unión a receptor (RBD) hacia el centro de la cabeza (cerrada). El proceso infectivo comienza (*Figura 8*) cuando la proteína S eleva el RBD de uno de sus monómeros, interactúa con ACE2, la energía liberada ocasiona el levantamiento de un segundo RBD (semicerrada) para unirse a otra proteína ACE2 hasta tener los 3 RBD erectos (abierta) unidos a 3 ACE2 para posteriormente lograr la fusión.

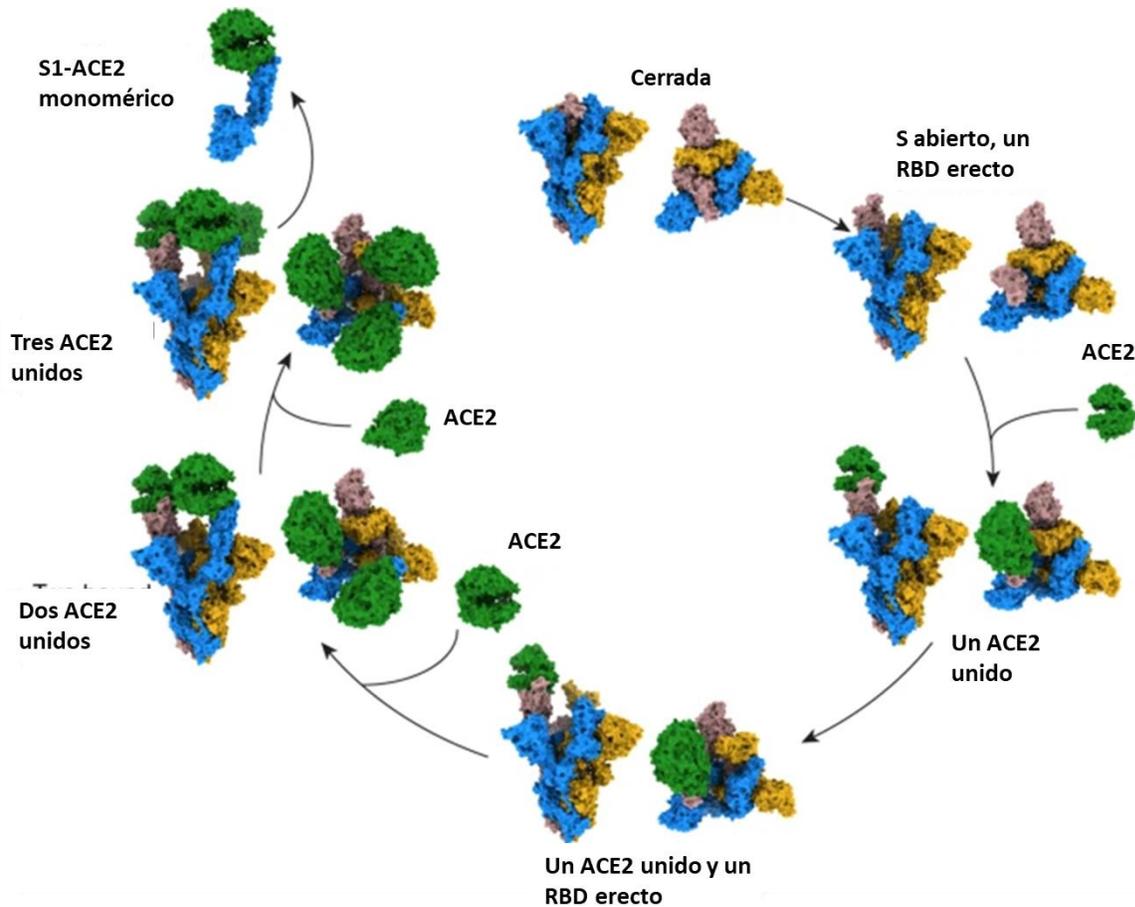
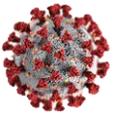
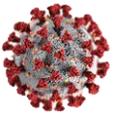


Figura 8. Secuencia de unión de la proteína S con ACE2, representan el comienzo del proceso infeccioso del virus SARS-CoV-2. Cada trímero de la proteína S están coloreados en azul, gris y dorado con ACE2 en verde, tomada de Benton et al(2020)<sup>84</sup>.

Algunos otros coronavirus usan dominios distintos dentro de la subunidad S1 para reconocer una variedad de receptores de unión y entrada, dependiendo de la especie viral. Los coronavirus humanos endémicos OC43 y HKU1 se unen a través del dominio A de S a 5-N-acetil-9- O -acetil-sialósidos que se encuentran en las glicoproteínas y glicolípidos en la superficie de la célula huésped<sup>90,91</sup>. Sin embargo, MERS-CoV S usa el dominio A(NTD) para reconocer los receptores de unión de sialósidos no acetilados que probablemente promueve la unión posterior del dominio B de S al receptor de entrada, dipeptidil-peptidasa 4.<sup>92,93</sup> La glicoproteína S del coronavirus está expuesta a la superficie y media la entrada en las células huésped,<sup>85</sup> con esa importancia es fundamental definir el RBD en la subunidad S1 del SARS-CoV-2 como el objetivo más probable para el desarrollo de inhibidores de la unión del virus, anticuerpos neutralizantes y vacunas.<sup>79,94</sup>

### 2.3 Spike para el desarrollo de vacunas y como blanco terapéutico.

La proteína S es posiblemente la proteína más importante dentro del proceso de infección del virus. La proteína S es necesaria para comenzar la infección mediante la unión con el receptor



ACE2 y promover la fusión con la célula huésped, esto ocurre gracias al anclaje de la proteína Spike.

Dada la importancia que tiene la proteína S en la infección del virus se han desarrollado vacunas, para poder tener una respuesta inmune temprana y segura.

Las vacunas que circulan hoy en día son potenciales para la prevención de COVID-19 grave, según la Organización Mundial de la Salud los diferentes tipos incluyen:

- Vacunas basadas en proteínas, que utilizan fragmentos inofensivos de proteínas o carcasas de proteínas que imitan al virus COVID-19 con el objetivo de obtener una respuesta inmunitaria segura.
- Vacunas con virus inactivados o debilitados, que utilizan una forma del virus que ha sido inactivada o atenuada para que no cause la enfermedad, pero genere una respuesta inmunitaria.
- Vacunas de vectores víricos, que emplean un virus seguro que no puede causar la enfermedad, pero que sirve de plataforma para producir proteínas de coronavirus con el fin de provocar una respuesta inmunitaria.
- Vacunas de ARN y ADN: un enfoque vanguardista que usa el ARN o el ADN manipulado genéticamente para crear una proteína que, a su vez, induce una respuesta inmunitaria de forma segura.

Hasta 12 de enero de 2022, las siguientes vacunas han sido incluidas en la lista OMS de uso en emergencias (Figura 9):

- BNT162b2 de Pfizer-BioNTech, 31 de diciembre de 2020.
- Oxford/AstraZeneca, 16 de febrero de 2021.
- Ad26.CoV2. S de Janssen, 12 de marzo de 2021.
- La vacuna de Moderna contra la COVID-19 (ARNm-1273), 30 de abril de 2021.
- La vacuna de Sinopharm contra la COVID-19, 7 de mayo de 2021.
- La vacuna CoronaVac de Sinovac, 1 de junio de 2021.
- La vacuna BBV152 (Covaxin) de Bharat Biotech, 3 de noviembre de 2021.
- La vacuna Covavax, 17 de diciembre de 2021
- La vacuna Nuvaxovid, 20 de diciembre de 2021

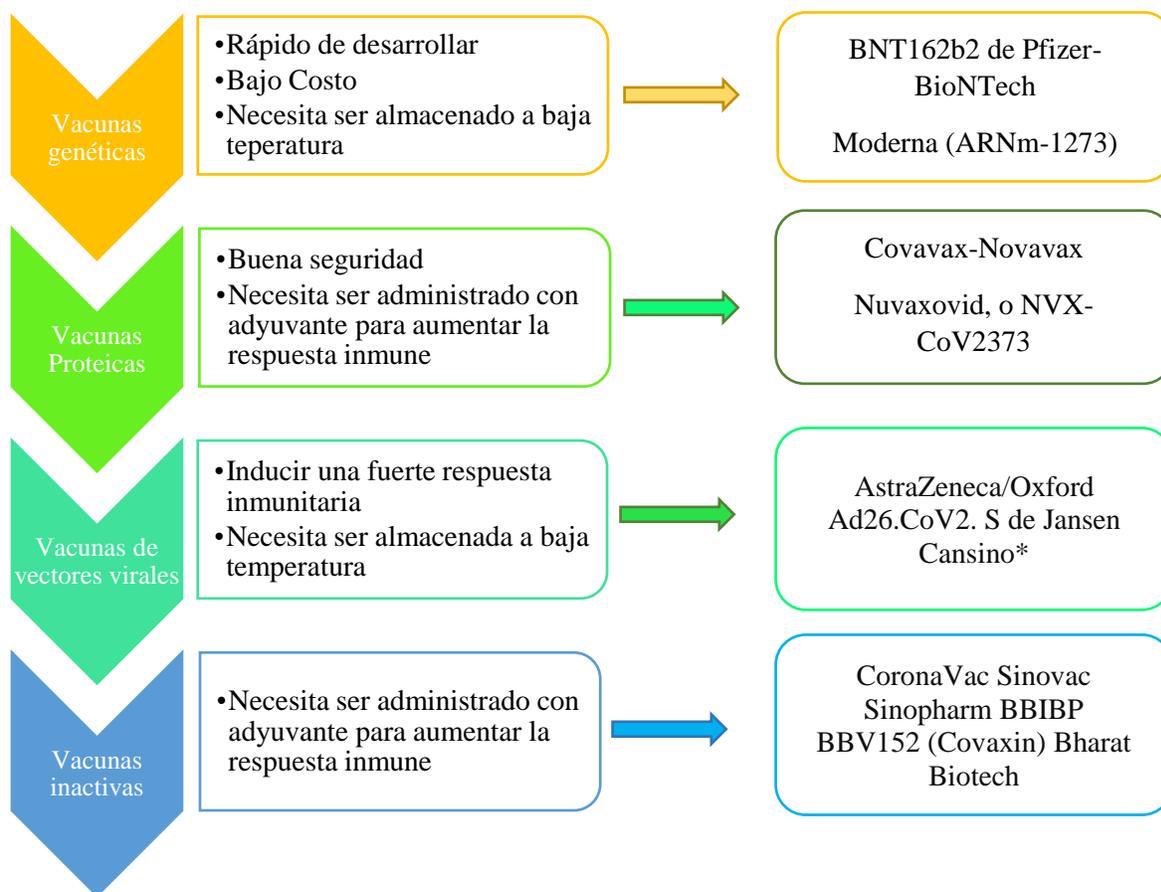
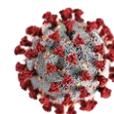


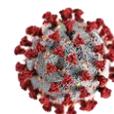
Figura 9. Vacunas aprobadas por la Organización Mundial de la Salud, con sus ventajas y desventajas para su aplicación<sup>35</sup>

Por otro lado, se han evaluado un gran número de compuestos dirigidos a bloquear la interacción con el receptor de la célula huésped ACE2.

Se habla, de los anticuerpos monoclonales que bloquean las proteínas de Spike del coronavirus y pueden retrasar la infección de nuevas células con SARS-CoV-2, pero su aplicación se ha visto obstaculizada por el costo, la disponibilidad y la necesidad de infundirlos o inyectarlos, además de su baja eficiencia con algunas variantes.

#### 2.4 Flavonoides empleados en dianas terapéuticas

Los compuestos polifenólicos pueden tener un papel fundamental en los tratamientos de apoyo y profilaxis, para los coronavirus, como para COVID-19, y presentan un enfoque alternativo para el manejo de Coronavirus.<sup>95</sup> Muchos de ellos son compuestos bioactivos capaces de interferir con ácidos nucleicos o proteínas, lo que significa que tienen diversas propiedades farmacológicas<sup>96</sup>. Hay numerosos estudios que destacan la amplia gama de actividades biológicas de flavonoides, y sugieren que apoyan y mejoran las defensas del organismo contra el estrés oxidativo y en la prevención de enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis y cáncer, son antimicrobianos, y presentan actividades antivirales y antiinflamatorias.<sup>97-100</sup>



Se ha descubierto que varios flavonoides inhiben diferentes dianas de los coronavirus SARS y MERS<sup>44</sup>, bloquean las actividades enzimáticas de proteasas virales como la proteasa similar a la 3-quimotripsina (3CLpro), la proteasa similar a la papaína (PLpro) y helicasa o interfiriendo con proteínas de Spike (S).<sup>45</sup> Algunos flavonoides suprimen la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ACE2)<sup>101</sup> que no solo desempeña un papel importante en las enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, sino que también puede representar un determinante clave en las infecciones virales y la neumonía.

## 2.5 Estudios *in silico* de flavonoides similares para covid-19

Los flavonoides forman el grupo más grande de compuestos polifenólicos en plantas superiores, con más de 9000 estructuras identificadas. Representan una clase importante de metabolitos secundarios de plantas, ampliamente distribuidos en todo el reino vegetal.<sup>95</sup>

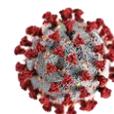
Dado que las opciones de terapia para los coronavirus, para la enfermedad COVID-19 comprenden solo medidas preventivas y de apoyo, los productos naturales pueden tener un papel fundamental en los tratamientos de apoyo y profilaxis, y presentan un enfoque alternativo para el manejo de la enfermedad causada por coronavirus.

Los flavonoides evaluados en estudios anteriores han demostrado que interfieren con la activación del inflammasoma NLRP3 que regula a producción de citoquinas inflamatorias y, por lo tanto, puede causar el síndrome de dificultad respiratoria que ocurre con frecuencia dentro de las enfermedades por coronavirus del SARS e infecciones por SARS-CoV-2.<sup>102,103</sup> Además estudios recientes han evaluado al glucósido de flavona baicalina de *Scutellaria baicalensis* y después de una administración intravenosa demostró ser útil en el tratamiento antiviral o profilaxis.<sup>104</sup> Los diversos estudios se han centrado principalmente en la interferencia de los flavonoides con algunas proteasas virales como 3CLpro y PLpro de SARS y MERS-CoV mediante el uso de métodos enzimáticos comunes basados en fluorogénicos (FRET) y estudios de acoplamiento molecular. 3CLpro y PLpro son objetivos clave ya que procesan varias poliproteínas virales que están involucradas en la replicación y transcripción del ARN genómico dentro de las células huésped.<sup>42</sup> Además, comparten una homología significativa con las proteasas virales de varios otros coronavirus, especialmente con las del SARS-, SARS-2- y MERS-CoV.<sup>105</sup>

Otros dos flavonoides, luteína y quercetina, mostraron la capacidad de bloquear la entrada del SARS-CoV en las células huésped.<sup>106</sup> Las chalconas también representaron un interesante grupo de flavonoides con una importante actividad inhibitoria contra las dos principales proteasas del coronavirus. En un estudio basado en nueve chalconas alquiladas aisladas de la planta japonesa *Angelica keiskei* (Miq.) Koidz, se demostró una capacidad significativa para inhibir la actividad de la proteasa tanto del SARS-CoV 3CL<sup>pro</sup> como del SARS-CoV PL<sup>pro</sup> en células y ensayos libres.<sup>107</sup>

Varios artículos virtuales y de revisión discutieron las posibles actividades antivirales de la hesperidina, la curcumina y la quercetina, contra el SARS-CoV-2.<sup>105</sup>

Según Wu, *et al*(2020). la hesperidina es un candidato a fármaco prometedor para la prevención y el tratamiento de la COVID-19. La hesperidina interfiere con la entrada viral a través de los



receptores ACE2, mejora la inmunidad celular del huésped, minimiza la liberación de mediadores inflamatorios y su mezcla protege contra el tromboembolismo venoso.<sup>108</sup>

### 3. Justificación

Desde diciembre de 2019 presenciamos una situación realmente extraordinaria en todo el mundo, la pandemia causada por la enfermedad COVID-19. Esta pandemia es ocasionada por la infección con el virus SARS-CoV-2. Desde ese momento se han administrado fármacos que no fueron diseñados para el tratamiento de enfermedades por coronavirus. Para finales del 2021 se han aprobado el Molnupiravir de Merck y Paxlovid acompañado de ritonavir de Pfizer que se dirigen a eliminar al virus desde su replicación. Pero existen también otros enfoques que son cruciales y sustanciales para prevenir la enfermedad, tal es el caso de las proteínas estructurales, que son los responsables de comenzar el proceso infeccioso. Entre las proteínas estructurales se encuentra la proteína Spike encargada de dar comienzo al proceso infeccioso al unirse al receptor de la célula huésped.

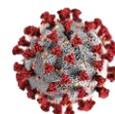
Usar como dina terapéutica a la proteína Spike ha llevado al desarrollo y la autorización del uso de anticuerpos monoclonales, dirigidos a evitar la infección por COVID-19 entre los que se encuentran bamlanivimab y etesevimab administrados conjuntamente y REGEN-COV (casirivimab e imdevimab), pero la desventaja más grande es el costo de adquisición, disponibilidad y la difícil aplicación de cada tratamiento; además recientemente según estudios de la FDA ya tiene una reducción marcada de actividad contra la variante Ómicron, quedando así solo el Sotrovimab como un anticuerpo autorizado.

El diseño y aplicación de las vacunas basadas en la proteína Spike, son muestra de que puede ser un objetivo clave para el control de la enfermedad. Las vacunas han sido administradas a gran parte de la población mundial de forma emergente y han demostrado una reducción de las complicaciones por la enfermedad, la reducción de casos y la prevención de hospitalizaciones, pero no se puede considerar como una cura para la enfermedad por COVID-19.

Aunado a esto el uso de herramientas computacionales en el descubrimiento de nuevos fármacos, en estudios para la reutilización de algunos otros, brinda alternativas viables sin la inversión de tanto tiempo y dinero ya que realizar un ensayo tradicional llevaría de 10 a 15 años de estudio para proponer candidatos a fármacos dirigidos a cualquier zona de la estructura del virus SARS-CoV-2.

Por lo anterior, el uso de herramientas computacionales como el acoplamiento molecular es una manera de acelerar la búsqueda de fármacos, con la ventaja de realizarlo en menor tiempo, menor costo, sin dejar de lado el análisis experimental *in vitro* e *in vivo*.

En este trabajo se presentan análisis de acoplamiento molecular de dos compuestos de origen natural acoplado con la proteína Espiga (Spike) del virus SARS-CoV-2, como en su momento fue evaluado el remdesivir, lopinavir etc., estos compuestos naturales podrían ser alternativas a fármacos incluso para cualquier variante reportada hasta finales del mes de mayo del 2021.



El estudio por acoplamiento molecular es entonces una ventana de oportunidades en búsqueda de compuestos potencialmente activos con propiedades antivirales, que interactúen de manera específica y brindar un efecto antiviral.

#### **4. Hipótesis**

Existen metabolitos secundarios que interaccionan de manera efectiva con la proteína Spike del virus SARS-CoV-2 e interfieren en el proceso de acoplamiento con el receptor ACE-2 de la célula huésped.

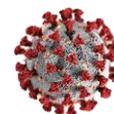
#### **5. Objetivo General**

Evaluar si metabolitos secundarios interfieren conformaciones activas de la proteína Spike del virus SARS-CoV-2.

##### **5.1 Objetivos Específicos**

1. Seleccionar metabolitos secundarios de baja citotoxicidad que presenten similitudes estereo-estructurales con moléculas que hayan mostrado actividad contra virus de la familia *coronaviridae*.
2. Mediante análisis *in silico* seleccionar aquellos metabolitos secundarios que muestren la mejor afinidad en residuos de los dominios NTD y RBD de la proteína Spike.
3. Analizar *in silico* los metabolitos secundarios seleccionados con las diferentes variantes del virus SARS-CoV-2.
4. Determinar el efecto de las mutaciones de las nuevas variantes en la interacción entre los ligandos y la proteína Spike.

#### **6. Metodología**



## 6.1 Estrategia Experimental

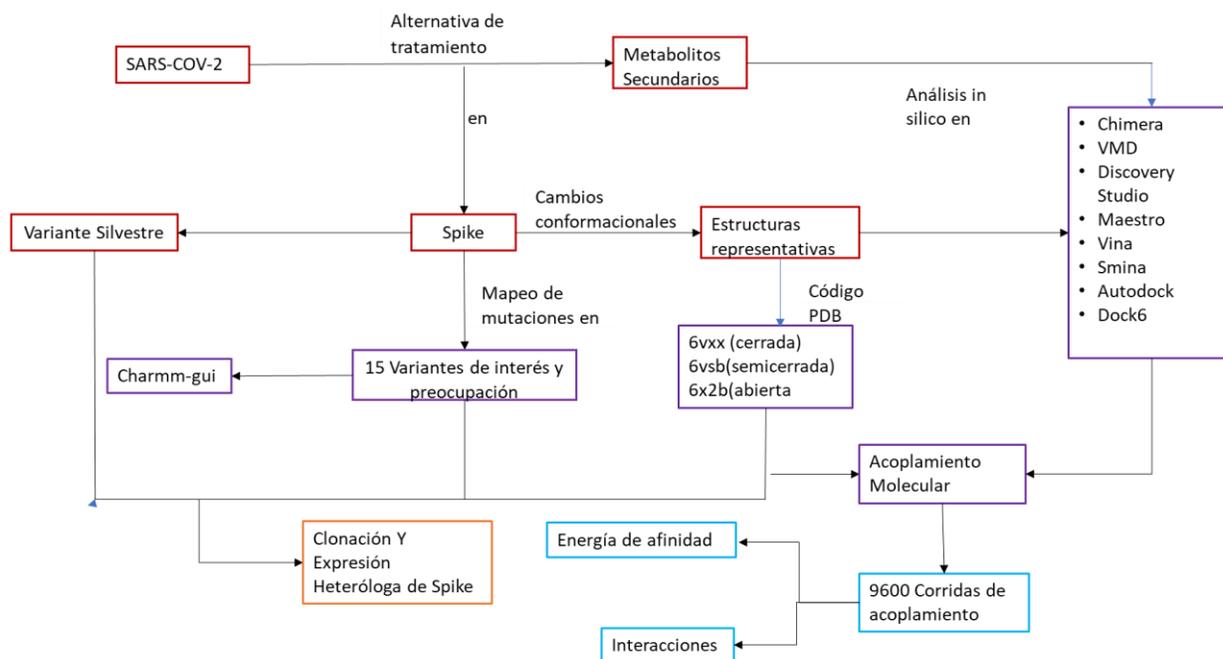


Diagrama 1 Estrategia Experimental

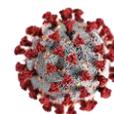
Los pasos que se describen (Diagrama 1) para realizar el análisis de acoplamiento molecular son para 3 estructuras representativas de la proteína Spike en el proceso infeccioso del virus SARS-CoV-2. También se enlista la elección de los flavonoides usados en los 96 sistemas creados para el acoplamiento.

Para realizarse el acoplamiento molecular fue necesario el mapeo de las 13 variantes reportadas por la CDC hasta finales del mes de mayo de 2021, las mutaciones reportadas en México por la secretaria de Salud Publica en febrero 2021 y finalmente se mapeo la variante Ómicron reportada en noviembre de 2021 como una excepción por la relevancia y permanencia en los contagios a la población.

## 6.2 Selección y preparación de flavonoides

Se realizó una búsqueda exhausta en NCBI y PubMed, de compuestos de origen natural que presentan efectos antivirales con la familia de los coronavirus que han existido en los últimos años. Y por estudios anteriores próximos a publicarse del grupo de trabajo se seleccionaron 7 compuestos entre los que destacan flavonoides y terpenos.

De los 7 compuestos que se habían seleccionado con anterioridad se eligieron dos flavonoides los que llamamos F7G y H7R. Tanto F7G como H7R son flavonoides que interactúan mayoritariamente con la proteína Spike en zonas de nuestro interés, Cercanos a los dominios NTD y RBD.

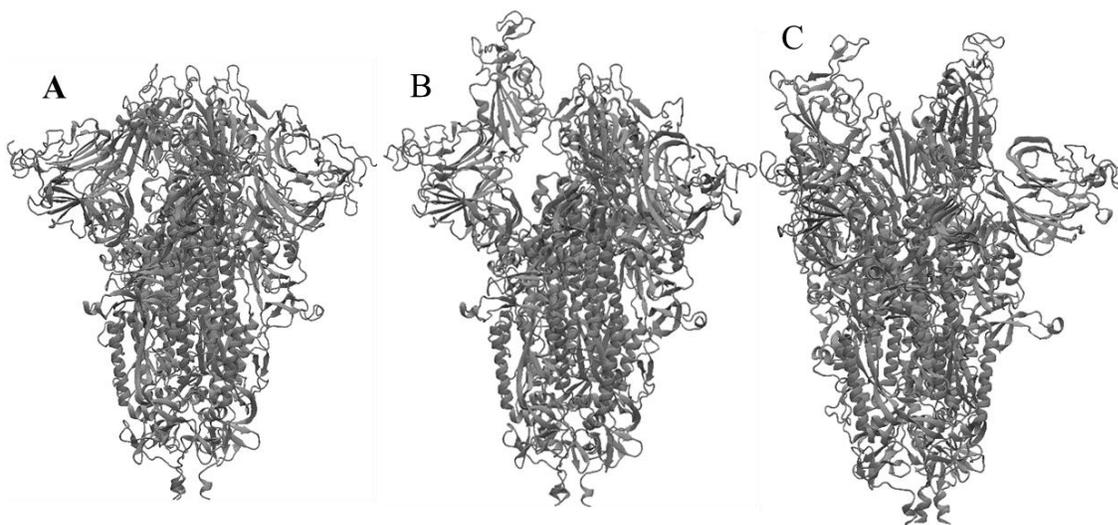


Para un acoplamiento molecular es necesario preparar la estructura de los compuestos que fueron previamente recuperados de PubChem. La preparación consiste en la minimización de la energía y optimización de la estructura tridimensional del ligando en UCSF Chimera.

### 6.3 Preparación y selección de estructura de Spike

Para seleccionar las estructuras de las conformaciones de la proteína se llevó a cabo la revisión en las dos bases de datos: UNIPROT y Protein Data Bank (PDB), en ellas se buscaron estructuras recuperadas por Microscopia electrónica y con 3.6 Å de resolución como máximo. Hasta el mes de junio del 2022 se tienen reportadas 984 estructuras en el Protein Data Bank en el apartado Recursos de COVID-19/ SARS-CoV-2 de la proteína Spike. De las cuales se buscan aquellas que sean representativas en el proceso infectivo como se describe en (*Figura 8*).

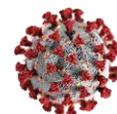
El criterio de selección principal es la glicosilación de la proteína en las distintas conformaciones. Por tanto, se recuperaron del servidor charmm-gui (charmm-gui.org) las estructuras: 6VXX (cerrada), 6VSB (semicerrada) y 6X2B(abierta) cada una con 20 N-glicosilaciones (*Figura 10*) que son idóneas para la representación del cambio conformacional. La preparación de las estructuras para someterlos a acoplamiento molecular, es decir, eliminar aguas, agregar hidrógenos, y asignar cargas parciales se realizó en UCSF Chimera<sup>109</sup>. Un acoplamiento ciego se realizó por lo que no se define un sitio de acción específico, el acoplamiento abarca a toda la cabeza globular de la proteína.



*Figura 10.* Conformaciones activas de la proteína S elegidas para el análisis de acoplamiento molecular. A conformación cerrada (6VXX), B conformación semicerrada con un RBD erecto(6VSB) y C conformación abierta dos de tres RBD's erectos (6X2B).

### 6.4 Variantes de estudio

Una vez seleccionadas las 3 estructuras de la proteína Spike, para realizar el acoplamiento molecular fue necesario mapear las mutaciones partiendo de la proteína S de la secuencia original del virus, debido a que en el momento de la realización del trabajo (y hasta el momento) aún no se encuentran disponibles estructuras cristalográficas en la base de datos de cada una de las variantes que se describe en (Tabla 2). Las variantes están reportadas por la CDC y se usó

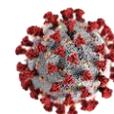


charmm-gui para modificar los aminoácidos mutados. La elección de las variantes de estudio se realizó de acuerdo con lo reportado hasta finales del mes de mayo de 2021. Las variantes que fueron mapeadas hasta esas fechas estaban clasificadas como variantes de preocupación y de interés. Con la aparición y el tiempo transcurrido de la pandemia algunas fueron degradadas a variantes en vigilancia. A principios de junio de 2021 la variante con mayor dominio en el mundo continúa siendo Ómicron.

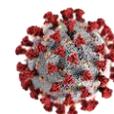
Es relevante mencionar que las mutaciones que se presentan en cada variante son las reportadas hasta esas fechas como las confirmadas en todas las secuencias reportadas.

*Tabla 2. Listado de variantes del virus SARS-CoV-2 que fueron empleadas en el trabajo, la clasificación y el origen de cada variante.*

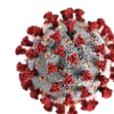
	Variantes de Preocupación		
	Clasificación	País	Mutaciones puntuales
V1	B.1.1.7 Alpha	Reino Unido	E484K S494P N501Y A570D D614G P681H T716I S982A D1118H
V4	B.1.427 Épsilon	California	L452R D614G
V3	B.1.351 Beta	Sudáfrica	D80A D215G K417N E484K N501Y D614G A701V
V2	P.1Gamma	Japón/ Brasil	L18F T20N P26S D138Y R190S K417T E484K N501Y D614G H655Y T1027I



			L1164F
V5	B.1.429 Épsilon	California	S13I W152C L452R D614G S813I S1159I
Variantes de interés			
V6	B.1.526 Lota	New York	L5F T95I D253G S477N E484K D614G A701V L1151F
V8	B.1.526.1	New York	D80G F157S L452R D614G T791I T859N D950H
V9	P.2 Zeta	Brasil	E484K F565K D614G
V7	B.1.525 Eta	Reino Unido/ Nigeria	A67V E484K D614G Q677H F888L
V11	B.1.617	India	L452R E484Q D614G
V12	B.1.617.1 Kappa	India	T95I G142D E154K L452R E484Q D614G P681R Q1071H
V13	B.1.617.2 Delta	India	T19R G142D R158G



			L452R T478K D614G P681R D950N
V14	B.1.617.3	India	T19R G142D L452R E484Q D614G P681R D950N
V10	B.1.1.222 + 478 Renombrada como 1.1.519 (de la anterior incluye 681)	Mexicana	D614G T732A T478K P681H
V15	B.1.1.529 Ómicron	Sudáfrica	A67V T95I G142D Y145D L212I G339D S371L S373P S375F K417N N440K S477N G446S T478K E484A Q493R G496S Q498R N501Y Y505H T547K D614G H655Y N679K P681H N764K D796Y N856K Q954H N969K



			L981F
--	--	--	-------

### 6.5 Acoplamiento Molecular

El programa Vina se usó para realizar el acoplamiento molecular ciego de la proteína Spike (receptor) y los compuestos (ligando F7G y H7R) en una caja de interacción de dimensiones  $\sim 175 \times 185 \times 105 \text{ \AA}^3$  con centro en  $x=11.60$ ,  $y=-4.64$ ,  $z=229.307$  establecida en UCSF Chimera.

El estudio consistió en 100 corridas de acoplamiento molecular independientes de cada receptor con cada ligando. Es decir, la conformación cerrada (6VXX) de las 15 variantes incluida la variante silvestre se acoplo con el compuesto F7G en 100 experimentos independientes generando 16 sistemas (receptor-ligando). Independientemente y en corridas separadas se generaron 16 sistemas más con el ligando H7R, de la misma forma se construyeron los sistemas de acoplamiento para las dos estructuras restantes (6VSB y 6X2B) con ambos ligandos F7G y H7R creando un total de 96 sistemas receptor-ligando (Diagrama 2) El acoplamiento molecular se realizó en la super computadora YOLTLA de la UAM.

Para obtener las 100 salidas del acoplamiento de un solo sistema se requiere de al menos 36 horas de cómputo. Finalmente, se tienen 9600 salidas de acoplamiento molecular para su análisis (ANEXO1). En resumen, con las 3 conformaciones, 16 variantes, y dos ligandos (F7G y H7R) se hicieron las combinaciones necesarias para lograr evaluar cada una de las variantes con cada conformación y con cada ligando.

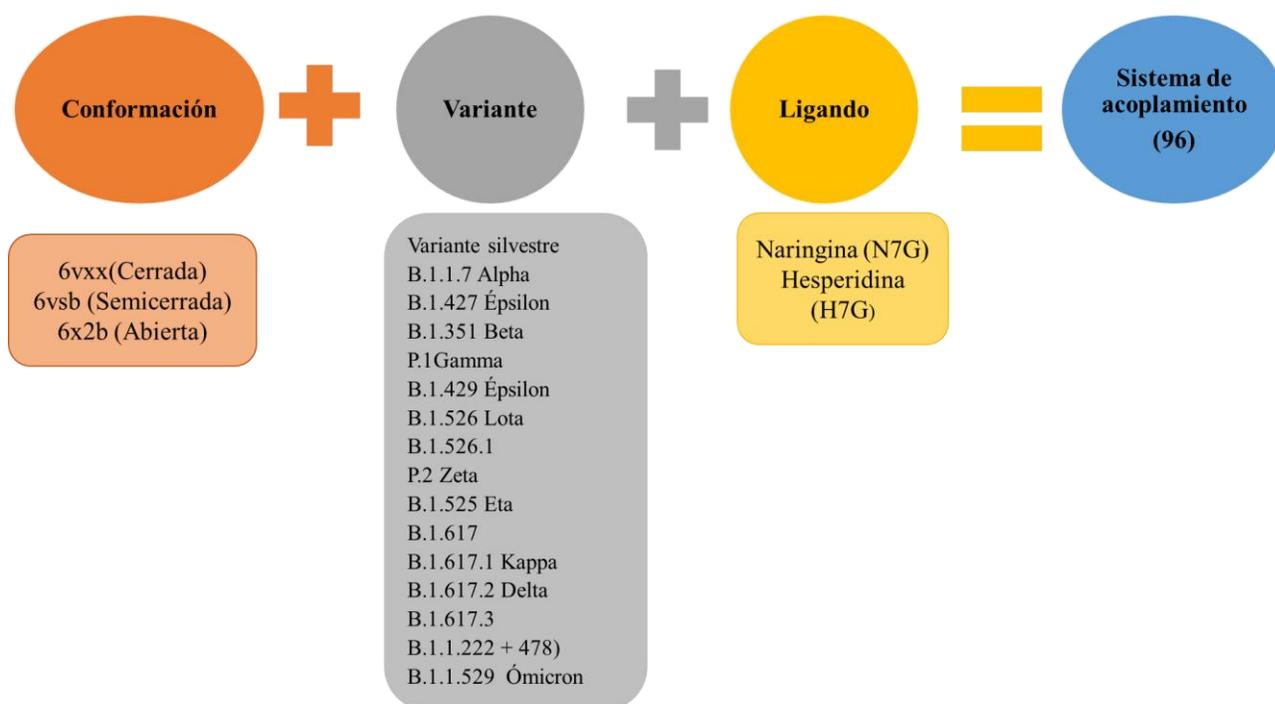
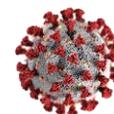


Diagrama 2. Conformación de un sistema para el estudio de variantes con los ligandos.

## 6.6 Análisis de interacciones

Para llevar a cabo el análisis de resultados se realiza por etapas:

### 6.6.1 Etapa 1 Selección de estructuras en conformaciones con mayor repetición

Consiste en seleccionar aquellas estructuras donde la diferencia en la posición de cada átomo de ligando con respecto a la misma estructura sea menor a 2 Å es decir un RMSD (<2 Å) generando un conjunto de estructuras (clúster) con mayor repetición de posición (Diagrama 3).

Esta primera clasificación solo permite conocer las interacciones repetidas para cada una de las 3 cadenas que constituye a la proteína S, pero no se localizan las interacciones puntuales por consiguiente no se puede localizar o determinar el sitio de unión específico (el ligando entre que residuos se localiza y entre cuales cadenas se encuentra). Por tanto, se requiere además del análisis de RMSD, la búsqueda de interacciones para cada subunidad (cadena) de Spike. Localizar interacciones por cada residuo de aminoácido en cada subunidad de la proteína Spike, es lo que se buscara en la Etapa 2.

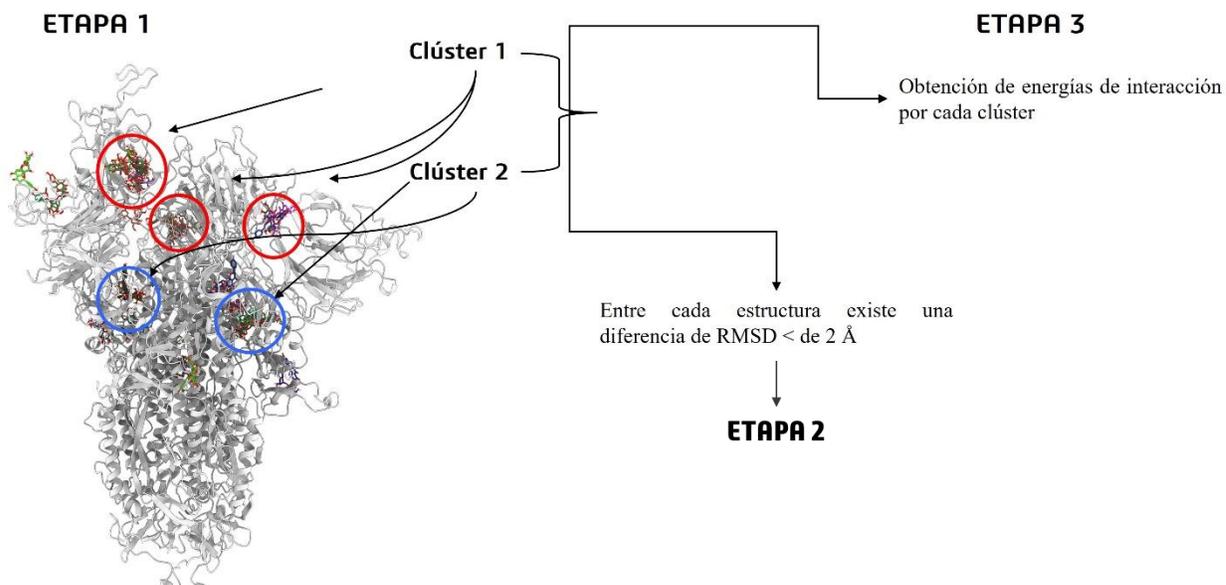
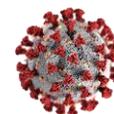


Diagrama 3. Primera etapa de análisis, generación de clústers.

### 6.6.2 Etapa 2 identificación de interacciones proteína ligando

Una vez que se tiene el grupo de estructuras con el mismo RMSD, se realiza una reagrupación de los ligandos. La nueva clasificación concentra compuestos con el mismo RMSD y la interacción del ligando en las mismas coordenadas, es decir son interacciones F7G o H7R en una misma zona (mismas cadenas, mismos residuos, mismas interacciones). Esto permite hallar las interacciones de mayor repetición por cadena. Identificar el tipo de interacción ligando-proteína. (Diagrama 4)

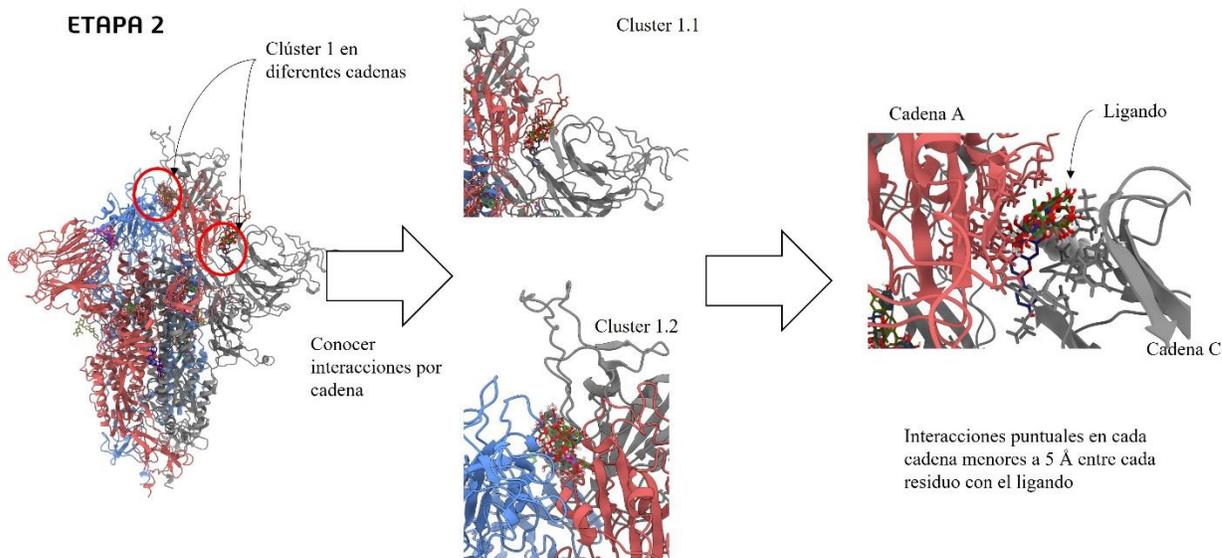
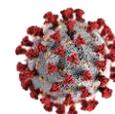


Diagrama 4 Interacciones de F7G y H7R entre cadenas



Después de la etapa 2 se localizan interacciones puntuales de los ligandos F7G y H7R con los residuos de aminoácidos por cada subgrupo (Clúster 1.1, 1.2, etc)

### 6.6.3 Etapa 3 Energías de Afinidad

Consisten en la obtención de la energía de afinidad promedio de los acoplamientos con mayor presencia; es decir, después de la clasificación por RMSD (Etapa 1) ya se tienen estructuras con mayor repetición, pero hay que recordar que también se tienen interacciones puntuales en cada subunidad de la proteína Spike. Por tanto, de la misma forma se determinaron dos posiciones del ligando en interacción con cada proteína mapeada incluida la silvestre. Estas se seleccionaron por el porcentaje de repetición y se obtuvo la energía promedio por cada conjunto de estructuras.

## 7. Resultados y Discusión

### 7.1 Selección de metabolitos secundarios

La revisión bibliográfica arrojó un gran número de compuestos con propiedades antivirales, antiinflamatorios, anticoagulantes, en distintas dianas terapéuticas para el virus SARS-CoV-2 entre ellos a los flavonoides y terpenos que además son compuestos bioactivos y de origen natural.

Los 7 compuestos seleccionados tienen reporte de actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y antiviral contra los coronavirus, y son de origen natural, con los códigos de PubChem siguientes: 6549 Linalool, 8842 Citronellol, 10621 Hesperetin-7-Rutinosido(H7R), 14896 Beta-Pinene, 440917 D-Limoneno, 442428, Flavonona-7-O-glucosido (F7G), 5281515 Beta-Cariofileno. (Figura 11)

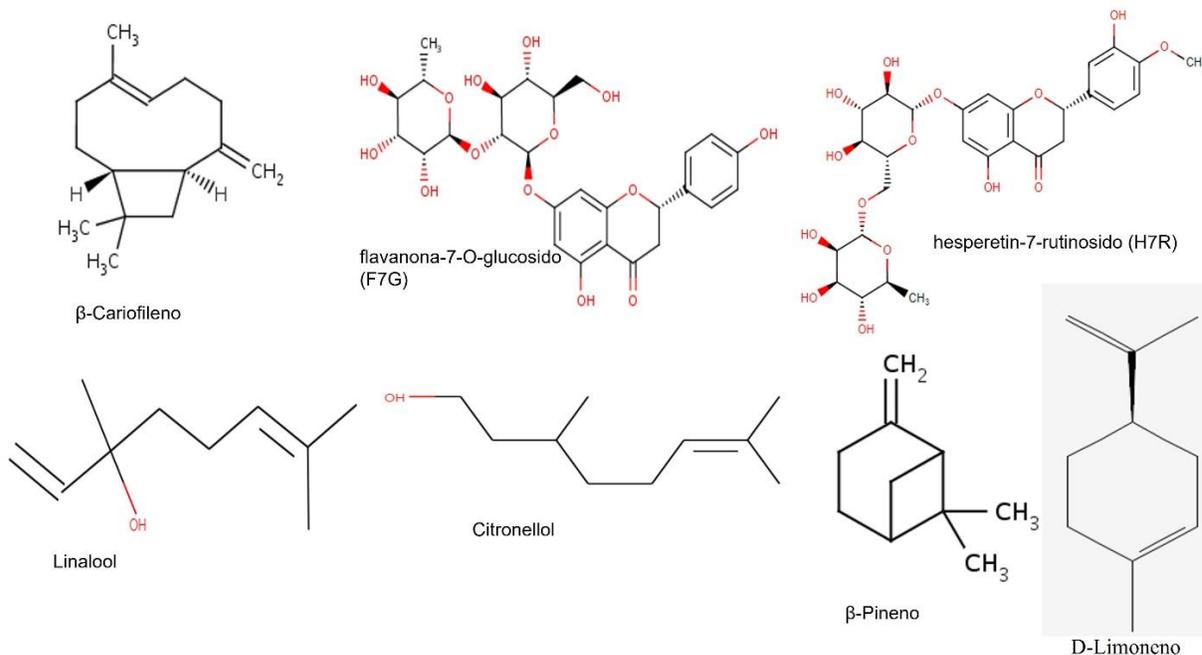
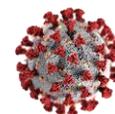


Figura 11. Compuestos potencialmente activos resultado de la revisión bibliográfica.



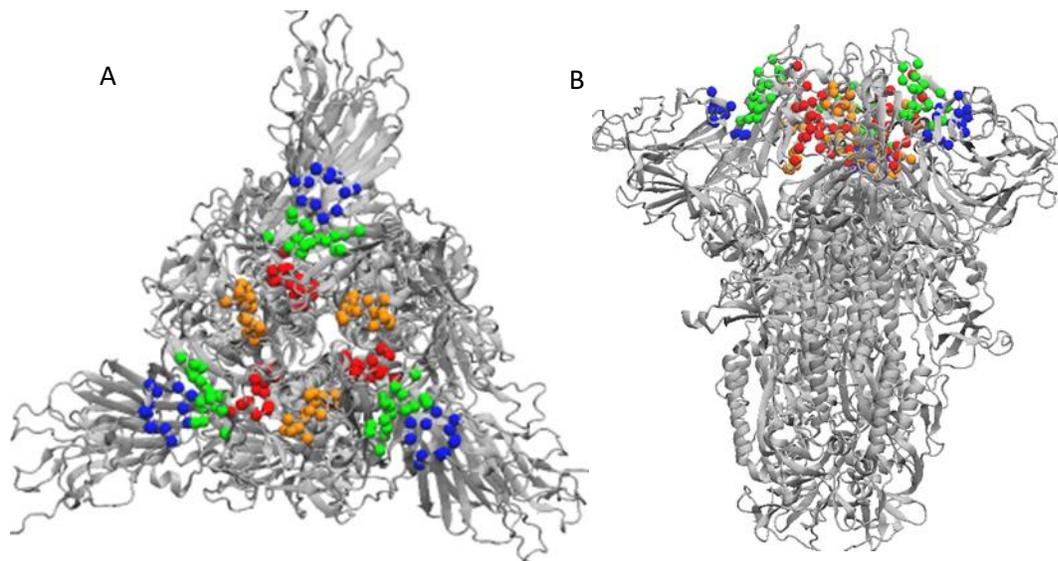
Para el objetivo del proyecto resultaron los ligandos Flavonona-7-O-glucosido (F7G) y Hesperetin-7-Rutinosido (H7R) como mejores propuestas de acoplamiento molecular con la proteína Spike en sitios de interés. Basados en estudios anteriores próximos a publicar por el grupo de investigación.

## 7.2 Acoplamiento molecular de la proteína Spike silvestre con Ligando H7R y F7G

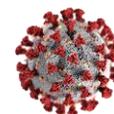
### 7.2.1 Estructura en conformación cerrada

La proteína obtenida por cristalografía de rayos X<sup>85</sup> y modificada por charmm-gui. para la glicosilación, se estabilizó por UCSF Chimera y se llevó a cabo el acoplamiento molecular en Vina.

Se realizaron 100 repeticiones independientes de acoplamiento molecular con H7R. Al analizar los resultados del 70% de los acoplamientos se encontraron dos clústers perfectamente definidos, las interacciones con los aminoácidos se presentan en la Tabla 3. Por otro lado, y siguiendo el mismo proceso de análisis descrito en la metodología se identificaron también dos grupos de estructuras (Figura 12) para la interacción de la proteína con el ligando F7G (Tabla 4) siendo exactamente las mismas zonas de interacción para ambos ligandos. Para F7G, el análisis fue del 60% del total de datos. En color rojo y naranja se tiene el clúster 1 y en verde y azul el clúster 2.



*Figura 12 Proteína S cerrada, señala los dos clústeres encontrados en el análisis de resultados en interacción con F7G y H7R. A) Representa la cabeza globular de S y B) Se representa la estructura vertical de la proteína Spike, muestra todos los residuos que interactúan en cada monómero. En color rojo y naranja se localiza un primer grupo de aminoácidos que interactúan con el ligando H7R y F7G cada color representa la interacción en cada una de las cadenas. El color verde representa el clúster 2 de las interacciones*



La (Figura 12) muestra a la estructura de la proteína S en una conformación cerrada sin las glicosilaciones para una mejor apreciación de las interacciones. En color rojo y naranja se localiza un primer grupo de aminoácidos que interactúan con el ligando H7R y F7G cada color representa la interacción en cada una de las cadenas. El color verde y azul representa el clúster 2 de las interacciones.

Los residuos que se encuentran interaccionando están enlistados en la Tabla 3 aparentemente se localizan en la subunidad S1 de la proteína S, lo que conformaría al dominio de unión a receptor entre dos de las tres cadenas del trímero de S.

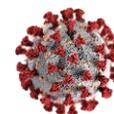
Para una mejor apreciación se tiene una vista desde la parte de arriba de la proteína S (Figura 12(A)). Las interacciones siempre se dieron entre dos cadenas juntas. Ya que la estructura de la proteína S para ser funcional se encuentra empaquetada en 3 cadenas acomodadas en forma V.<sup>110</sup> Las interacciones ocurren en conjunto en ambas cadenas una cadena principal y la siguiente adyacente (Tabla 3 y 4).

*Tabla 3 Interacciones del ligando H7R con cada monómero de la proteína Spike*

Interacciones Clúster 1	Energía kcal mol <sup>-1</sup>	Interacciones Clúster 2	Energía kcal mol <sup>-1</sup>
<b>Cadena A Y D</b> 403R 405D 406E 408R 409Q 411A 412P 413G 414Q 415T 416G 417K 418I 427D 453Y 495Y	-10.057±0.224	<b>Cadena A y B</b> 346R 347F 348A 349S 351Y 352A 353W 354N 355R 356K 450N 451Y 452L 466R 467D 468I 492L	-10.240±0.246
<b>Cadena A y B</b> 368L 369Y 370N 371S 372A 374F 375S 376T 377F 378L 379C 380Y 381G 382V 383S 384P 385T		<b>Cadena B Y D</b> 113K 114T 115Q 116S 130V 131C 132E 165N 167T 168P 231I 232G 233I 234N	
<b>Cadena A y B</b> 984L 985D 987V 988E			

*Tabla 4 Interacciones del ligando F7G con cada monómero de la proteína Spike*

Interacciones Clúster 1	Energía kcal mol <sup>-1</sup>	Interacciones Clúster 2	Energía kcal mol <sup>-1</sup>
<b>Cadena B</b> 403R 405D 406E 408R 409Q 411A 412P 413G 414Q 415T	-9.578±0.097	<b>Cadena A, B, D</b> 346R 347F 348A 349S 351Y 352A 353W 354N 355R 356K 450N 451Y	-9.794±0.325



416G 417K 418I 427D 453Y 495Y		452L 466R 467D 468I 492L	
<b>Cadena D</b> 368L 369Y 370N 371S 372A 374F 375S 376T 377F 378L 379C 380Y 381G 382V 383S 384P 385T		<b>Cadena A, B, D</b> 113K 114T 115Q 116S 130V 131C 132E 165N 167T 168P 231I 232G 233I 234N	

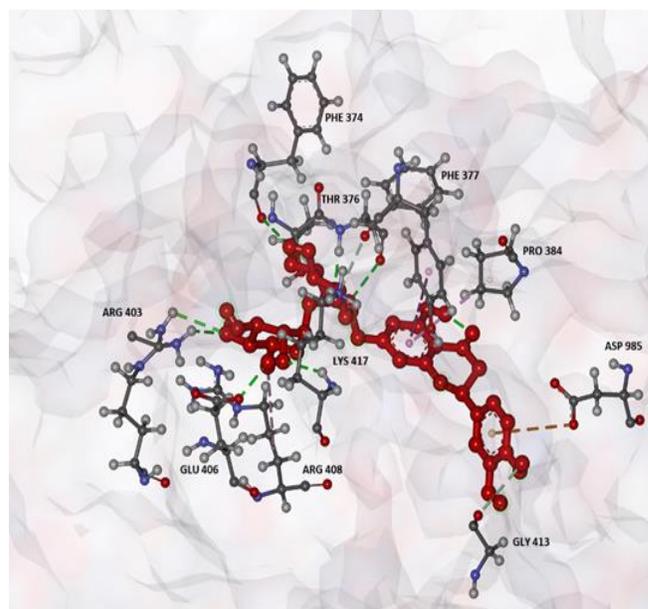
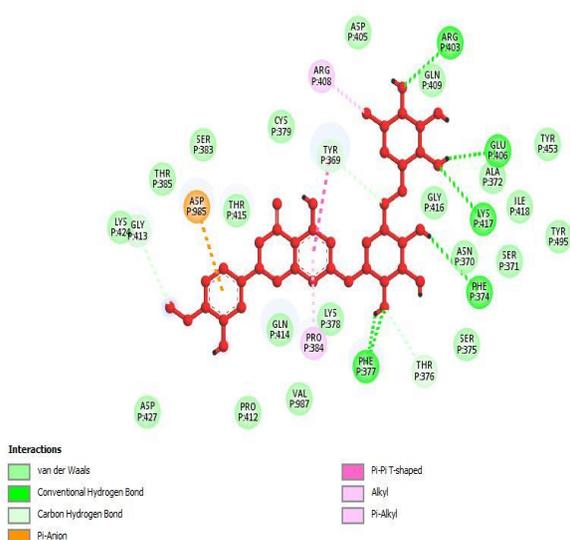
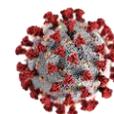


Figura 13. Tipos de interacción que tiene el ligando H7R con la proteína S en el clúster 1

Además de las interacciones electrostáticas que tiene H7R con la proteína S (en conformación cerrada que se encargan de estabilizar al compuesto con interacciones no covalentes de van der Waals), existen otras interacciones que funcionan para anclar al ligando, como lo son los enlaces de hidrogeno con PHE373, PHE377, ARG403, GLU406, LYS 417, enlaces Pi-Pi y enlace C-H con TYR369, la interacción con PRO384 es de tipo Alkil y un enlace Pi anión con ASP985.(Figura 13)

Para el ligando H7R el clúster 1 tiene una energía de interacción de  $-10.057 \pm 0.224$  (Tabla 3) mientras que para F7G la energía es de  $-9.578 \pm 0.097$  (Tabla 4) se observa entonces que en la misma zona H7R tiene mejor anclaje con respecto a F7G.

Anteriormente se comentó que las zonas de interacción son los mismos para F7G y H7R. La descripción del clúster 1 es para ambos ligandos, aunque se tomó de ejemplo a H7R, y debido a que el clúster 2 también es compartido ahora se describe tomando como ejemplo las interacciones con F7G. En esencia son lo mismo, como si se describiera con H7R.



El clúster número 2 es aún más interesante en la (Figura 12) se observa en color verde y azul los aminoácidos que se localizan entre lo que pareciera ser el dominio N-Terminal o NTD (azul) y el dominio de unión a receptor RBD (verde).

Basados en el mapa de interacción de la (Figura 14) se tienen interacciones no covalentes en mayor presencia, pero además a GLN115, TYR351, ARG355 con enlaces de hidrogeno; mientras que, ALA348, ALA352, ILE468, con enlaces de tipo alquil y finalmente un enlace C-H en ARG466 (Figura 14). La energía de interacción para H7R es de  $-10.240 \pm 0.246$  y para F7G es de  $-9.794 \pm 0.325$  lo que muestra que el clúster 2 también hay una preferencia por H7R sobre F7G.

En el total de los acoplamientos de H7R y F7G con la estructura cerrada de la proteína Spike. observamos en primer lugar, se encontraron dos sitios definidos para el acoplamiento de los ligandos (Cluster 1 y 2). Las energías de afinidad para ambos compuestos se presentan en las tablas 3 y 4. Las energías para H7R ( $-10.057 \pm 0.224$ ,  $-10.240 \pm 0.246$ ) y para F7G ( $-9.578 \pm 0.097$ ,  $-9.794 \pm 0.325$ ) por cada clúster descrito, es evidente que para las interacciones de H7R y la proteína se tiene una menor energía en comparación con F7G. Los resultados muestran que, el clúster 1 es el de menor energía y, por consiguiente, el sitio de unión más estable energéticamente hablando. De la misma forma, muestra que el ligando H7R tiene mayor afinidad en ambos clústers en comparación con F7G a pesar de que el sitio de unión es el mismo.

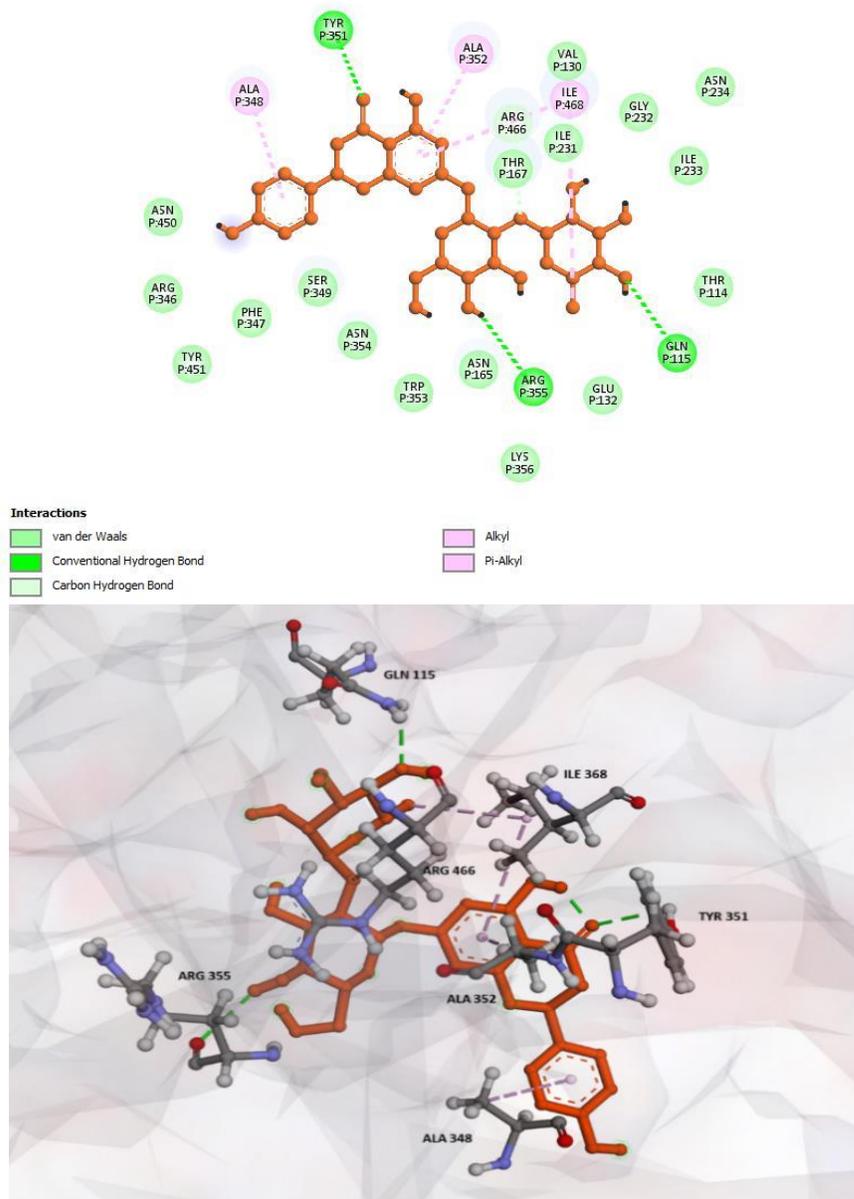
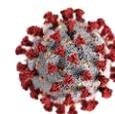
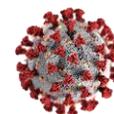


Figura 14 Tipos de interacción que tiene el ligando F7G con la proteína S en el clúster 2.

### 7.2.2 Estructura en conformación semicerrada

En la búsqueda de compuestos que inhiban las conformaciones activas de la proteína Spike además de la conformación cerrada. Se evaluaron conformaciones que representan el proceso infectivo, en la conformación semicerrada se tiene una de las 3 cadenas con un dominio de unión expuesto (cadena A).

La conformación semicerrada se evaluó 100 veces en acoplamiento molecular con cada ligando. El análisis de resultados se hizo con el 48% de las corridas obtenidas del acoplamiento con H7R y con F7G el porcentaje de análisis es de 47%. El porcentaje representa las conformaciones que se repiten con mayor frecuencia, el resto del acoplamiento se encuentra disperso en otros sitios de la proteína S.



El análisis dio como resultado dos conjuntos de estructuras donde el clúster 1 mantiene las interacciones de la conformación cerrada mostrados anteriormente en la (Tabla 3 y 4). Tanto en la cadena erecta con el dominio de unión a receptor RBD expuesto, así como en la cadena en conformación cerrada con una energía de afinidad de  $-9.565 \pm 0.267$  para H7R y para F7G de  $-8.995 \pm 0.15$  (Tabla 5 y 6). La interacción es más favorable en H7R en comparación con F7G.

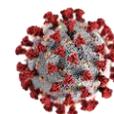
Pero además del clúster 1, la otra zona de interacción con mayor número de interacciones pertenece a el cluster2 se localiza en lo que pareciera ser el centro de la proteína con una energía de afinidad para este clúster 2 de  $-11.443 \pm 0.855$  para H7R y para F7G de  $-9.696 \pm 0.615$  (Tabla 5 y 6). Es decir, el clúster 2 tiene una mejor energía de interacción, pero es el clúster menos poblado en comparación con el clúster 1. Todos los aminoácidos de la proteína S que interactúan con los compuestos se enlistan en las Tablas 5 y 6.

*Tabla 5 Interacciones de H7R con la conformación semicerrada con sus respectivas energías de afinidad promedio.*

Interacciones Clúster 1	Energía kcal mol <sup>-1</sup>	Interacciones Clúster 2	Energía kcal mol <sup>-1</sup>
<b>Cadena A B D</b> 353W 355R 396T 426P 427D 428D 429F 430T 463P 464F 465E 466R 514S 515F 516E 517L 518L	$-9.565 \pm 0.267$	<b>Cadena A B D</b> 40D 42V 44R 740M 741Y 742I 743C 744G 745D 855P 856N 966L 967S 975S 976V 977L 978N 979D 996L 1000R	$-11.443 \pm 0.855$
<b>Cadena A B D</b> 114T 115Q 116S 117L 130V 231I 167T 168F 196N 197I 198D 199G 230P 232G 233I 234N 235I		<b>Cadena A B D</b> 518L 519H 541F 545G 546L 547T 548G 565F 566G 567R 570A 571D 572T 573T 574D 587I 589P	

*Tabla 6 Interacciones de la proteína S con F7G en conformación semiabierta.*

Interacciones Clúster 1	Energía kcal mol <sup>-1</sup>	Interacciones Clúster 2	Energía kcal mol <sup>-1</sup>
<b>Cadena A B</b> 353W 355R 396T 426P 427D 428D 429F 430T 463P 464F 465E 466R 514S 515F 516E 517L 518L	$-8.995 \pm 0.15$	<b>Cadena A</b> 40D 42V 44R 740M 741Y 742I 743C 744G 745D 855P 856N 966L 967S 975S 976V	$-9.696 \pm 0.615$



		977L 978N 979D 996L 1000R	
<b>Cadena B D</b>		<b>Cadena D</b>	
114T 115Q 116S		518L 519H 541F	
117L 130V 231I		545G 546L 547T	
167T 168F 196N		548G 565F 566G	
197I 198D 199G		567R 570A 571D	
230P 232G 233I		572T 573T 574D	
234N 235I		587I 589P	

En H7R, las interacciones fueron en las 3 cadenas que conforman a la proteína S, para ambos grupos; mientras que en F7G, el clúster 2 se mostraron interacciones en la cadena erecta y la cadena adyacente. Lo que podría sugerirse que el levantamiento de uno de los dominios favorece la entrada de F7G al centro de la proteína.

### 7.2.3 Estructura en conformación abierta

Debido a la importancia de las conformaciones de la proteína Spike en este proyecto. Se seleccionó una estructura donde se encontrará mayormente abierta. Es decir, la conformación de la estructura 6X2B tiene el dominio de unión al receptor (RBD), expuesto en las cadenas A y B quedando la cadena D con el RBD hacia el centro de la proteína.

Tanto el ligando H7R y F7G fueron acoplados 100 veces con el receptor independientemente, para receptor-H7R se analizaron el 32% de los resultados del acoplamiento, por otro lado, receptor-F7G resultó una población de estructuras con mayor repetición del 30%. Se puede notar una disminución en frecuencia de interacciones en sitios definidos, los ligandos se mostraron más dispersos en toda la estructura. Posiblemente, por la cavidad creada por el movimiento de dos cadenas dejando solo una hacia el centro de la proteína. Aun con esto, se analizarán solo las conformaciones con mayor frecuencia de repeticiones.

Para la conformación abierta no hubo grandes diferencias con respecto a la conformación semicerrada ambas estructuras mostraron los mismos grupos de interacción. Aunque es evidente que las interacciones del primer clúster presentan una preferencia hacia las cadenas de S elevadas, tanto para F7G como para H7R. Para el clúster 2 posiblemente por la cavidad que genero el levantamiento de 2 de 3 RBD las interacciones de las proteínas fueron en las 3 cadenas de la proteína Spike (Tabla 7 y 8).

Las energías de afinidad de ambos compuestos para con sus receptores es mayor en el clúster 2 con  $-10.494 \pm 0.423$  para H7R y  $-10.190 \pm 0.148$  para F7G. El clúster 1 presenta energías de  $-9.388 \pm 0.260$  para H7R y  $-8.960 \pm 0.052$  para F7G, estas energías son incluso menores en comparación con la estructura cerrada. Los resultados anteriores nos pueden estar hablando de una ligera preferencia hacia la conformación cerrada. Las interacciones presentes en los residuos de aminoácidos que participaron en el acoplamiento de la proteína y los compuestos se observan en la (Tabla 7 y 8).

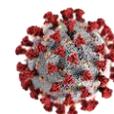


Tabla 7 Interacciones de H7R con 6X2B conformación abierta de S.

Interacciones Clúster 1	Energía kcal mol <sup>-1</sup>	Interacciones Clúster 2	Energía kcal mol <sup>-1</sup>
<b>Cadena A D</b> 353W 355R 396T 426P 427D 428D 429F 430T 463P 464F 465E 466R 514S 515F 516E 517L 518L	-9.388±0.260	<b>Cadena A B D</b> 40D 42V 44R 740M 741Y 742I 743C 744G 745D 746S 855P 856N 966L 967S 975S 976V 977L 978N 979D 996L	-10.494±0.423
<b>Cadena A B</b> 114T 115Q 116S 117L 130V 231I 167T 168F 196N 197I 198D 199G 230P 232G 233I 234N 235I		<b>Cadena A B D</b> 319R 541F 545G 546L 547T 548G 549T 550G 565F 567R 571D 572T 573T 587I 588T 589P	

Tabla 8 Interacciones de la proteína S con F7G en la estructura abierta.

Interacciones Clúster 1	Energía kcal mol <sup>-1</sup>	Interacciones Clúster 2	Energía kcal mol <sup>-1</sup>
<b>Cadena A</b> 353W 355R 396T 426P 427D 428D 429F 430T 463P 464F 465E 466R 514S 515F 516E 517L 518L	-8.960±0.052	<b>Cadena A B D</b> 40D 42V 44R 740M 741Y 742I 743C 744G 745D 746S 855P 856N 966L 967S 975S 976V 977L 978N 979D 996L	-10.190±0.148
<b>Cadena B</b> 114T 115Q 116S 117L 130V 231I 167T 168F 196N 197I 198D 199G 230P 232G 233I 234N 235I		<b>Cadena A B D</b> 319R 541F 545G 546L 547T 548G 549T 550G 565F 567R 571D 572T 573T 587I 588T 589P	

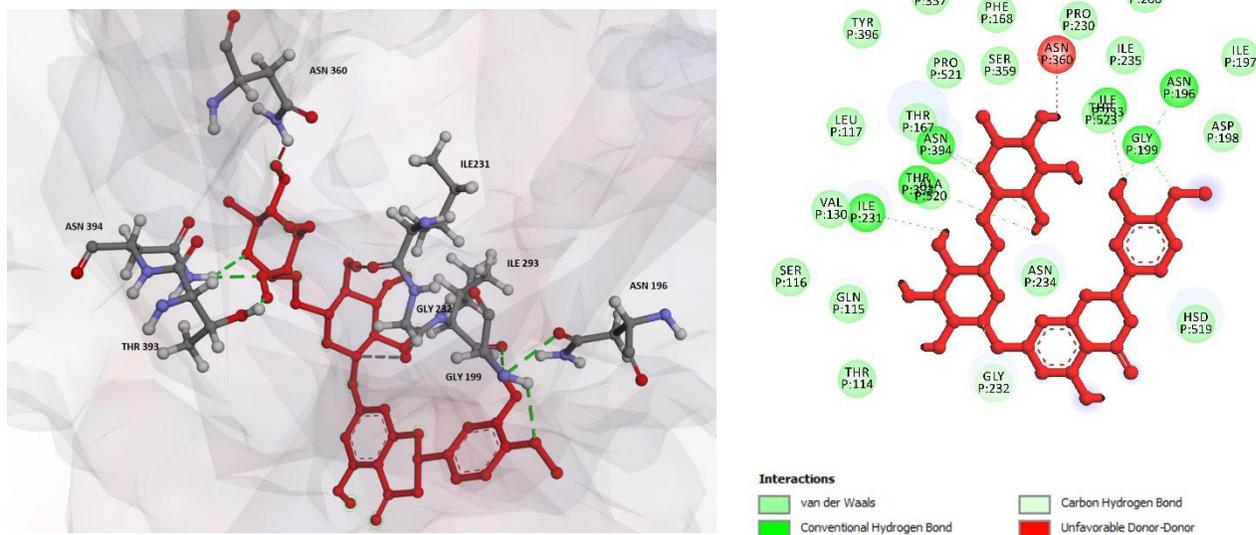
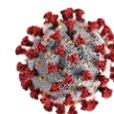


Figura 15. Interacciones de los ligandos H7R y F7G en la conformación semicerrada y abierta de la proteína Spike del clúster 1

La (Figura 15) presenta las principales interacciones de las estructuras de la proteína en conformación semicerrada y abierta, entre las que destacan además de los enlaces covalentes de Van der Waals, los enlaces de H con ASN196, GLY199, ILE231, ILE293, THR303, y un enlace C-H con Gly232. Estos aminoácidos que presentan interacción son residuos que forman parte de la subunidad S1 de la estructura de Spike, se localizan en el dominio N-Terminal (NTD) y en el dominio de unión a receptor (RBD).

Para el clúster dos, los compuestos F7G Y H7R interactúan con los aminoácidos de la proteína S en el centro de la estructura (Figura 16) estas interacciones son principalmente electrostáticas, pero además se tiene los enlaces convencionales de hidrógeno con THR 549, enlaces de Carbono-Hidrogeno con GLY744, VAL976, ASN978, de tipo alquil con VAL42, ARG567, LEU966 y un Pi-alkil con PHE565.

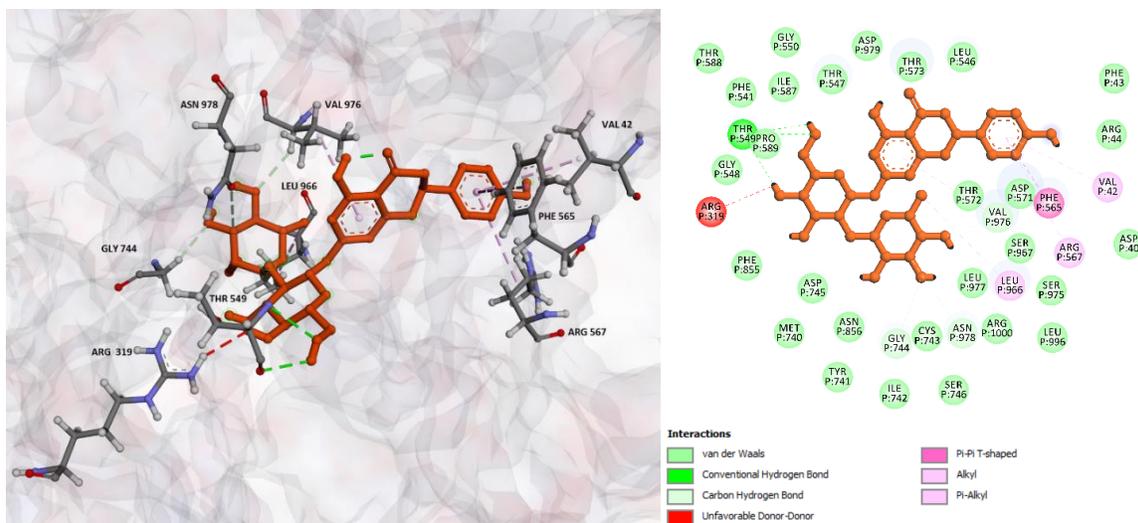
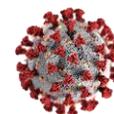


Figura 16. Interacciones de los ligandos H7R y F7G en la conformación semicerrada y abierta de la proteína Spike del clúster 2.

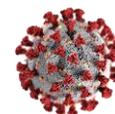
### 7.3 Interacciones relevantes en las conformaciones de la proteína Spike.

De los clústers que se identificaron se tuvieron interacciones en común, la (Tabla 9) muestra los residuos de aminoácidos donde se tiene mayor interacción del ligando F7G y H7R, sin importar la conformación de la estructura mostrada. Estas interacciones localizadas en las 3 conformaciones pertenecen al bucle que generan las cadenas adyacentes al empaquetarse en una estructura funcional. Los residuos pertenecen a la zona donde es necesario el levantamiento de ese brazo para poder interactuar con su receptor.<sup>84</sup> Los residuos de la proteína que interactúan con los compuestos se localizan entre el dominio NTD de una de las 3 cadenas y el dominio RBD de la cadena adyacente. Los aminoácidos señalados corresponden a la subunidad S1 de la proteína Spike y a los mencionados dominios.<sup>87</sup>

Un segundo grupo de aminoácidos que se tiene en repetidas ocasiones en la estructura semicerrada (6VSB) y abierta (6X2B) se localizan en el centro de la estructura. Estas interacciones tienen lugar cerca del dominio NTD y al inicio de la subunidad S2, muy cerca de donde se localizan los péptidos de fusión.<sup>84</sup> Por tanto, además de bloquear en zonas del RBD y NTD en el cluster1, también podrían incluso bloquear al péptido de fusión que se localiza entre los residuos 835 al 856.<sup>110</sup>

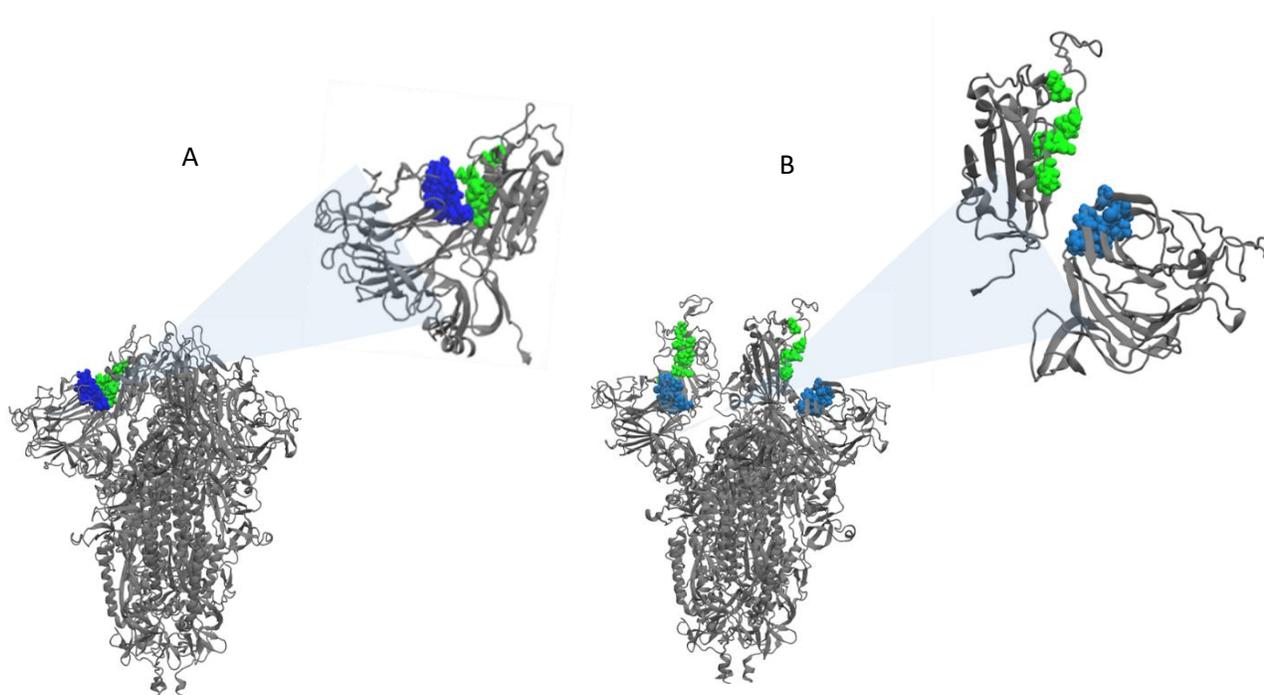
Tabla 9 Interacciones compartidas en las conformaciones de Spike.

Interacciones 6VXX-6VSB-6X2B	Interacciones Clúster 2 en 6VSB y 6X2B
353W 355R 356K	40D 42V 44R
466R 467D 468I	740M 741Y 742I
492L	743C 744G 745D
114T 115Q 116S	855P 856N 966L
130V 131C 132E	967S 975S 976V
165N 167T 168F	

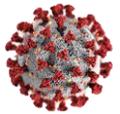


231I	232G	233I	977L	978N	979D
234N			996L		
			541F	545G	546L
			547T	548G	565F
			567R	571D	572T
			573T	587I	589P

La proteína S tiene dos grandes dominios S1 y S2, en el dominio S1 se localiza las subunidades NTD y RBD. Hay que recordar que, el proceso infeccioso del SARS-CoV-2 comienza por una conformación cerrada de la proteína, por tal motivo encontrar compuestos que permite un posible bloqueo dentro del proceso infeccioso es crucial para sugerir alternativas de tratamiento. Como resultado de los acoplamientos en las tres estructuras de la proteína silvestre se identifica que los ligandos F7G Y H7R se unen a la parte superior de la proteína, muy cerca al motivo de unión con ACE2, incluso cuando no parece bloquear la interacción podría estar inhibiendo o interfiriendo el movimiento que necesita el RBD de la proteína S (Figura 17) al interferir en los residuos mencionados en el cluster1.



*Figura 17 Interacciones compartidas en las conformaciones de la proteína S. En color azul están resaltados los aminoácidos de una primera cadena y en color verde se localizan interacción en la cadena adyacente, se encuentran entre el dominio NTD y RBD. A) conformación cerrada (6VXX) de la proteína S con los aminoácidos señalados del cluster1. B) Mismos residuos de la conformación cerrada presentes en las estructuras semicerrada(6VSB) y cerrada(6X2B).*



## 7.4 Variantes del SARS CoV-2

### 7.4.1 Mutaciones de la proteína Spike y su glicosilación

Ha surgido una gran cantidad de variantes del virus SARS CoV-2, cuyos efectos en la evolución de la pandemia fueron realmente relevantes. Además, se ha reportado evidencia con respecto a las mutaciones y su comportamiento en la transmisibilidad, la unión a su receptor y el escape del sistema inmune que gran parte está dada también por la repulsión electrostática de los azúcares que rodean a la proteína S.

La proteína Spike está altamente glicosilada que además de sus mutaciones aleatorias resulta de grandes intereses revisar las implicaciones que podrían tener las mutaciones en los sitio glicosilados o cercanos a ellos.

Amicone *et al.*(2022) Demostraron que las mutaciones acumuladas son heterogéneas en todo el genoma, con una tasa de mutación espontánea en SARS-CoV-2 de  $1.3 \times 10^{-6} \pm 0.2 \times 10^{-6}$  por cada ciclo de infección. Aunque la acción de selección positiva sobre la proteína Spike es mayor ya que ha acumulado cinco veces más mutaciones que el promedio genético de los demás genes<sup>111</sup>.(Figura 18)

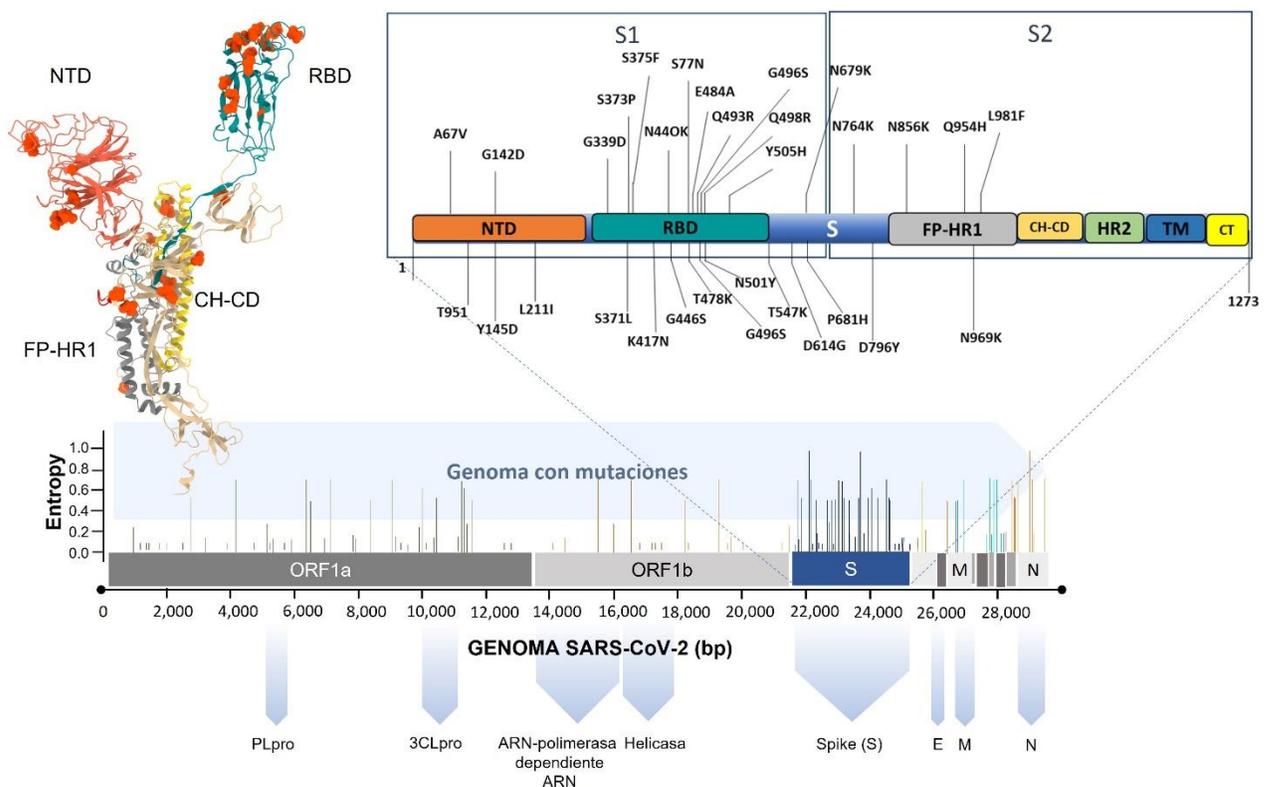
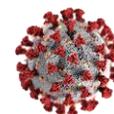


Figura 18 Mutaciones en el genoma del SARS-CoV-2 se muestran en ampliación los aminoácidos mutados en la variante Ómicron, además la entropía de Shannon para identificar las posiciones en la secuencia genética con más susceptibilidad de mutación, tomado de Nextstrain

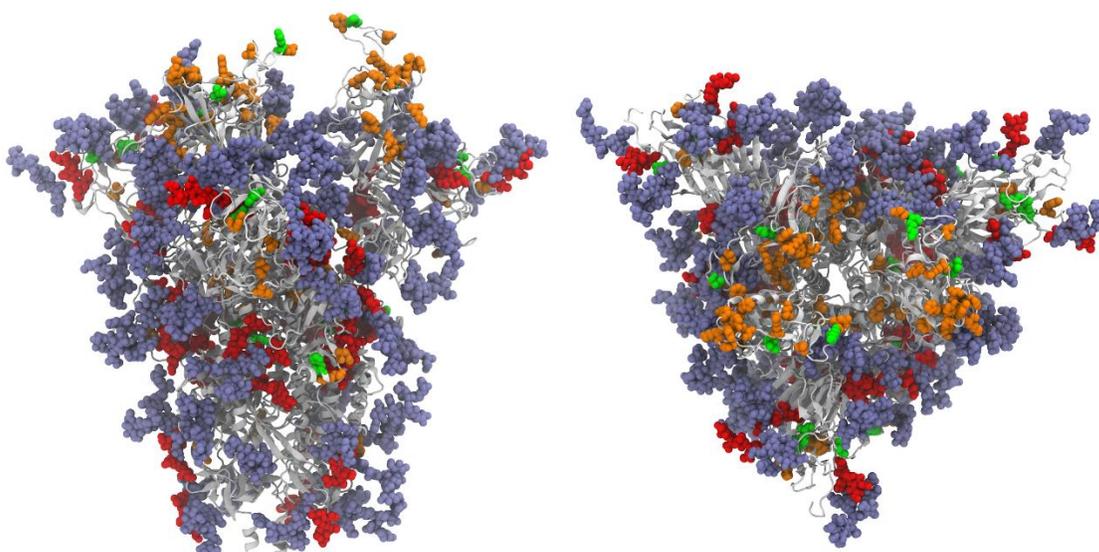
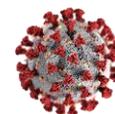


La revisión de los miles de variantes que han surgido ha sido complicada, por su parte Qianqian *et al*(2020). Estudiaron 80 variantes y 26 modificaciones del sitio de glicosilación y su efecto en la infectividad y reactividad a anticuerpos neutralizantes y a sueros de pacientes convalecientes. En ese trabajo, determinaron que todas las variantes que contienen D614G, fueron significativamente más infecciosos<sup>112</sup>.

Además, se menciona que la mayoría de las variantes que estudiaron que presentan sustitución de aminoácidos en el dominio de unión a receptor son menos infecciosas pero las mutaciones como A475V, L452R, V483A y F490L se volvieron resistentes a algunos anticuerpos neutralizantes<sup>112</sup>. Esto se puede corroborar en las variantes Delta que presenta la mutación L452R y que en su momento fue más infecciosa, y si duda alguna en Ómicron que prevalece hoy en día logrando evadir a algunos anticuerpos.

Las glicosilaciones en el proceso infeccioso del SARS-CoV-2 son de suma importancia un estudio de Zhang *et al.*(2022) revelo que la ausencia de la glicosilación N370 debido a A372 presente en otro coronavirus es lo que permite que a la proteína Spike adoptar una conformación abierta y estable que es fundamental para interactuar eficientemente con el receptor ACE-2 y conllevar a una mayor infectividad del virus SARS-COV-2<sup>113</sup>.

Para el momento de la realización del trabajo solo se habían identificado las 22 N-glicosilaciones, pero a finales de 2021 Tian *et al.*(2021) estudiaron el patrón de glicosilación que tiene la proteína Spike de SARS-CoV-2. Ellos mostraron que además de las 22 N-glicosilaciones ya conocidas, se detectaron por primera vez diez y siete O-glicosilaciones en la proteína S. Trece de las N-glicosilaciones se encuentran en la subunidad S1 y 9 de ellas en la subunidad S2. Adicional a lo anterior, existen once O-glicosilaciones en la subunidad S1 y seis O-glicosilaciones en el N-terminal de la subunidad S2<sup>86</sup>. Las investigaciones señalan que los glicanos secuestrados de maquinaria de la célula huésped ayudan a los virus en su infectividad, pero también juegan un papel en la evasión o modulación inmunitaria.<sup>114</sup> (Figura 19)



*Figura 19. proteína Spike Glicosilada, N-glicosilaciones(azul), O-glicosilaciones (rojo), mutaciones Delta (verde), mutaciones Ómicron(naranja)*

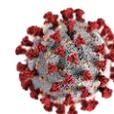
Es clara la importancia de la glicosilación en las proteínas de la envoltura viral ya que permiten la regulación del tropismo viral, estabilidad y protección de las proteínas<sup>115</sup>. Contemplar a la proteína Spike con sus mutaciones y sus glicosilaciones en la búsqueda de estrategias terapéuticas y profilácticas brindara un mejor acercamiento a terapias efectivas y eficaces.

Por tal motivo hacer un análisis de acoplamiento molecular únicamente con la proteína Spike silvestre glicosilada, no es una opción ya que el predominio de las variantes es inminente. Como ya se mencionó en la metodología el estudio de acoplamiento molecular involucra a 16 variantes reportadas hasta el mes de mayo de 2021. Y en noviembre del 2021, se agregó la variante Ómicron por su importancia en la pandemia.

Al momento de escribir esta tesis, las dos variantes reportadas hasta hoy como preocupantes son Ómicron y Delta, con mayor predominio de Ómicron. En la variante ómicron existen 37 mutaciones en el Gen S que codifican a la proteína Spike, 6 deleciones, 1 mutación de inserción y 30 mutaciones de sustitución. En la Delta existen 8 mutaciones de sustitución y dos deleciones.

Algunas mutaciones de ómicron que se superponen con alfa, beta, gamma y delta (69–70del, T95I, G142D/143–145del, K417N, T478K, N501Y, N655Y, N679K y P681H) lo anterior conduce a que exista un aumento de la transmisibilidad, una mayor afinidad de unión viral y a un mayor escape a los anticuerpos.

Los efectos de la mayoría de las mutaciones de *Ómicron* restantes se desconocen, lo que genera un alto nivel de incertidumbre.



Para fines prácticos se presenta el análisis de resultados de Spike-Delta y Spike-Ómicron en acoplamiento con F7G y H7R en la conformación cerrada, semicerrada y abierta. La información de las 14 variantes restantes Alpha, Kappa, Gamma, etc.; se encuentran en el (ANEXO1)

#### 7.4.2 Delta

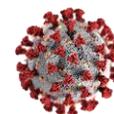
Desde la aparición del linaje B.1.617 al que pertenece Delta había sido dominante de varias regiones del mundo, hasta la aparición de Ómicron. El linaje incluye tres subtipos principales que son B.1.617.1, B.1.617.2, B.1.617.3 para el momento en el que se estaba realizando el análisis de acoplamiento molecular estas 3 habían sido reportadas sin aun tener una clasificación en el alfabeto griego, por tanto, se hizo el análisis molecular para las 3 variantes procedentes a este linaje. Las variantes contienen diversas mutaciones en el dominio N-Terminal (NTD) y el dominio de unión receptor (RBD). Se cree que B.1.617.2, también denominada variante Delta, se propaga más rápido en comparación con otras variantes excepto Ómicron. La variante Delta ha acumulado 8 mutaciones de aminoácidos (T19R, G142D, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N) y la delección FR156-157 en la proteína Spike.<sup>116</sup>

El análisis de interacción de las estructuras con los compuestos de todas las variantes fue muy similar, entre sí, por tanto, se analizaron a profundidad en la variante Ómicron. Aquí se describirá la importancia de las mutaciones de delta que entran en contacto con los compuestos en estudio y las que comparte con la variante ómicron.

En la conformación cerrada de la proteína Spike tanto el compuesto F7G como H7R entran en contacto con el residuo mutado L452R esta mutación se localiza dentro de la región del motivo de unión al receptor (RBM) en la región RBD. Junto con F490 y L492 forman un parche hidrofóbico en la superficie de Spike, por tanto la mutación L452R puede causar cambios estructurales en esta región que estabilizan la interacción entre la proteína espiga y el receptor ACE2 de la célula huésped, lo que lleva a una mayor infectividad.<sup>117</sup> De estar interfiriendo F7G o H7R en esos residuos además de bloquear a la proteína aparentemente estaría interfiriendo en el aumento de la infectividad en esta variante.

Las mutaciones T478K y P681R son mutaciones que tienen tanto Delta como Ómicron. Para T478K la sustitución de un aminoácido no cargado (treonina) por un positivo (lisina) puede alterar significativamente la superficie electroestática de S y aumentar el impedimento estérico de la proteína Spike, estos factores podrían mejorar la afinidad de unión de RBD a ACE2 y mejorar la capacidad del virus para invadir la célula huésped.<sup>118</sup> La mutación P681R está ubicada en el sitio de escisión de furina (residuos RRAR posicionados entre 682-685) y la escisión de esta región es la clave para la entrada en la célula huésped. Varios análisis han encontrado que la mutación P681R afecta la dinámica de replicación viral.<sup>119</sup> Por tanto, tener compuestos que promuevan el bloqueo de estas zonas clave para la propagación del virus, es indispensable para un pronto control de la pandemia.

Los estudios anteriores sugirieron que L452R, T478K y P681R son las tres mutaciones clave de la variante Delta del SARS-CoV-2. Estas mutaciones aumentaron la transmisibilidad y generaron un escape inmune de la variante Delta



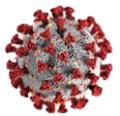
### 7.4.3 Ómicron

En la variante Ómicron existen 37 mutaciones en el Gen S que codifican a la proteína Spike, 6 deleciones, 1 mutación de inserción y 30 mutaciones de sustitución.

Algunas mutaciones que se superponen con alfa, beta, gamma y delta (69–70del, T95I, G142D/143–145del, K417N, T478K, N501Y, N655Y, N679K y P681H) lo anterior conduce a que exista un aumento de la transmisibilidad, una mayor afinidad de unión viral y a un mayor escape a los anticuerpos. Los efectos de la mayoría de las mutaciones de Ómicron restantes se desconocen, lo que genera un alto nivel de incertidumbre.

La estructura cristalográfica de la proteína con las mutaciones de la variante Ómicron para la fecha que se realizó el estudio aún no se tenía; por tanto, estas se mapearon en la estructura silvestre empleando el servidor charmm-gui.

Las mutaciones que presenta la variante Ómicron se encuentran señaladas en color verde (Figura 20). Como puede notarse en el alineamiento las mutaciones más consecutivas se localizan entre los residuos 480 y 540 justo en el dominio de unión a receptor (RBD). Debido a esto, se consideró necesario evaluar los compuestos en la variante en las tres conformaciones.



6vxx_v0	MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLXSTQDLFLPFFS	60
6vxx_v15	MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLXSTQDLFLPFFS *****	60
6vxx_v0	NVTWFXIIXVSGTNGTKRFDNPNVLPFNDGVYFASIEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIV	120
6vxx_v15	NVTWFXIIXVSGTNGTKRFDNPNVLPFNDGVYFASIEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIV *****	120
6vxx_v0	NNATNVVIVKVECFQFCNDPFLGVYIXKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLE	180
6vxx_v15	NNATNVVIVKVECFQFCNDPFLGVYIXKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLE *****	180
6vxx_v0	GKQGNFKNLRVFNKIDGYFKIYSKXTPINIVRDLPOGFSALEPLVDLPIGINITRFQT	240
6vxx_v15	GKQGNFKNLRVFNKIDGYFKIYSKXTPINIVRDLPOGFSALEPLVDLPIGINITRFQT *****	240
6vxx_v0	LLALXRSYLTGPDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETK	300
6vxx_v15	LLALXRSYLTGPDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETK *****	300
6vxx_v0	CTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPPDEVFNATRFASVYAWNRRKRISN	360
6vxx_v15	CTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPPDEVFNATRFASVYAWNRRKRISN *****	360
6vxx_v0	CVADYSVLVNSASFSTFKCYGVSPTKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQIAPGQTKGIAD	420
6vxx_v15	CVADYSVLVNSASFSTFKCYGVSPTKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQIAPGQTKGIAD *****	420
6vxx_v0	YNYKLPDDFTGCVIAWNSNLDKSKVSGNYNYLRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGNRPKPC	480
6vxx_v15	YNYKLPDDFTGCVIAWNSNLDKSKVSGNYNYLRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGNRPKPC *****	480
6vxx_v0	NGVGFNCFYFLPSYGFQPTNGVGVQPYRVVLSFELLXAPATVCGPKKSTNLVKNKCVN	540
6vxx_v15	NGVGFNCFYFLPSYGFQPTNGVGVQPYRVVLSFELLXAPATVCGPKKSTNLVKNKCVN *****	540
6vxx_v0	FNFNGLTGTGVLTESNKKFLFPQQFGRDIADTTDAVRDPQLEILDITPCSFGGVSVITP	600
6vxx_v15	FNFNGLTGTGVLTESNKKFLFPQQFGRDIADTTDAVRDPQLEILDITPCSFGGVSVITP *****	600
6vxx_v0	GTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIXADQLTPTWRVYSTGNSVNFQTRAGCLIGAEVNNNSY	660
6vxx_v15	GTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIXADQLTPTWRVYSTGNSVNFQTRAGCLIGAEVNNNSY *****	660
6vxx_v0	ECDIPIGAGICASYQTQTSXRRRARSVASQSI IAYTMSLGAENSVAYSNNNSIAIPTNFTI	720
6vxx_v15	ECDIPIGAGICASYQTQTSXRRRARSVASQSI IAYTMSLGAENSVAYSNNNSIAIPTNFTI *****	720
6vxx_v0	SVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQE	780
6vxx_v15	SVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQE *****	780
6vxx_v0	VFAQVKQIYKTPPIKIFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLDAGFIKQYGDC	840
6vxx_v15	VFAQVKQIYKTPPIKIFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLDAGFIKQYGDC *****	840
6vxx_v0	LGDIAARDLICAQKFGGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAM	900
6vxx_v15	LGDIAARDLICAQKFGGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAM *****	900
6vxx_v0	QMAYRFNGIGVTONVLYENQKLIANQFNNSAIGKIQDSLSTASALGKLQDVVNXNAQALN	960
6vxx_v15	QMAYRFNGIGVTONVLYENQKLIANQFNNSAIGKIQDSLSTASALGKLQDVVNXNAQALN *****	960
6vxx_v0	TLVKQLSSIFGAISSVLNDIERSLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRA	1020
6vxx_v15	TLVKQLSSIFGAISSVLNDIERSLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRA *****	1020
6vxx_v0	SANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYXLMSPQSAFXGVVFLXVTYVPAQEKNFTTAPA	1080
6vxx_v15	SANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYXLMSPQSAFXGVVFLXVTYVPAQEKNFTTAPA *****	1080
6vxx_v0	ICXDGKAXFPREGVFSNGTXWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDP	1140
6vxx_v15	ICXDGKAXFPREGVFSNGTXWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDP *****	1140
6vxx_v0	LQPELD	1146
6vxx_v15	LQPELD	1146
	*****	

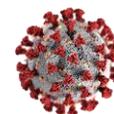


Figura 20. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína S como v0 hace referencia a la secuencia de proteína Silvestre, v15 se refiere a la proteína S de la variante Ómicron.

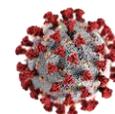
#### 7.4.3.1 Conformación cerrada Spike-Ómicron con ligandos H7R y F7G

El acoplamiento molecular se realizó bajo los mismos parámetros que la proteína silvestre. Las 100 corridas de acoplamiento molecular dieron como resultado 2 grupos perfectamente definidos con el 44% de los resultados en clúster 1 y el 13% del total de los datos para el clúster 2 del compuesto H7R. Las interacciones más repetitivas se muestran a continuación en la Tabla 10 con energías de afinidad muy similares  $-10.470 \pm 0.189$  y  $-10.669 \pm 0.214$  respectivamente. 6 de las 16 mutaciones presentes en el dominio de unión a receptor (RBD), tienen interacción con el compuesto H7R las mutaciones 371, 373, 375, además 417, 493 Y 505 se localizan dentro de la región más expuesta, estas mutaciones afectan en el reconocimiento de mAbs o los anticuerpos en plasma convaleciente.<sup>120,121</sup> El acoplamiento en esta zona de gran interés es crucial para inhibir el movimiento aún por encima de los anticuerpos monoclonales.

Tabla 10 Interacciones del compuesto H7R con Spike-Ómicron en estructura cerrada.

Interacciones Clúster 1	Energía kcal mol <sup>-1</sup>	Interacciones Clúster 2	Energía kcal mol <sup>-1</sup>
<b>Cadena A B C</b> 403R 405D 406E 408R 409Q 411A 412P 413G 414Q 415T 416G 417N 418I 424K 427D 453Y <b>493R</b> <b>505H</b>	$-10.470 \pm 0.189$	<b>Cadena A</b> 346R 347F 348A 349S 351Y 352A 353W 354N 355R 356K 450N 451Y 452L 466R 467D 468I 492L	$-10.669 \pm 0.214$
<b>Cadena A B D</b> 369Y 370N <b>371L</b> 372A <b>373P</b> 374F <b>375F</b> 376T 377F 378K 379C 383S 384P 385T		<b>Cadena B</b> 113K 114T 115Q 116S 130V 131C 132E 165N 167T 168P 231I 232G 233I 234N	
<b>Cadena A</b> 985D <b>986K</b> 987V 988E			

El compuesto F7G tuvo mayor preferencia de acoplamiento solo en el clúster 1 (Tabla 11), se acoplo en un 82% a la parte central de la proteína muy cercano al motivo de unión a receptor. Estos residuos son algunos de ellos mutaciones de ómicron se localizan en la parte erecta de la proteína Spike. Por tanto, el ligando podría lograr inhibir el levantamiento del RBD por cadena, más allá de lograr bloquear la interacción RBD-ACE-2. Debido a que, en la forma abierta, los residuos cercanos al sitio de unión de ACE2 (405, 415, 416, 417 y 468)



quedan mucho más expuestos tanto en el RBD vertical como en el RBD cerrado adyacente en el sentido de las agujas del reloj (Figura 21). Es probable que el efecto de las mutaciones en estas posiciones sea mayor para los anticuerpos que pertenecen a RBD.

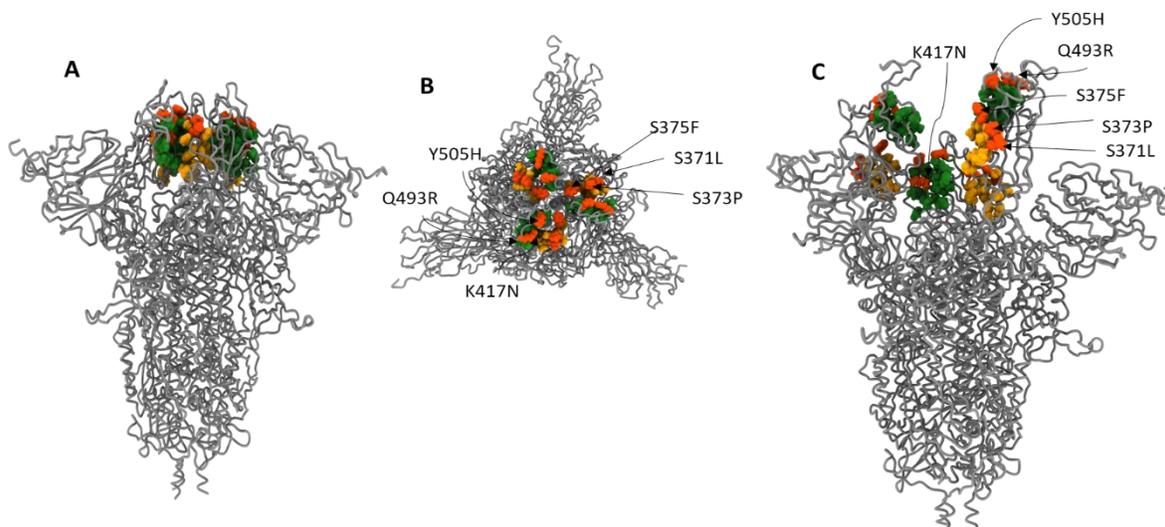
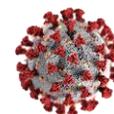


Figura 21 Mutaciones que interactúan F7G en conformación cerrada de la proteína S de la variante ómicron. A) Estructura vertical de S-Ómicron, B) Cabeza globular de S-Ómicron, C) Estructura semicerrada de S-Ómicron posibles inhibiciones que tendría F7G basado en interacciones de la conformación cerrada.: Naranja señala las mutaciones de ómicron, en verde y amarillo la interacciones de cada protómero con F7G.

Tabla 11. Residuos de los aminoácidos de Spike-Ómicron que interactúan en acoplamiento con F7G en conformación cerrada.

Interacciones Clúster 1	Energía kcal mol <sup>-1</sup>
<b>Cadena</b>	-10.1646±0.3105
403R 405D 406E	
408R 409Q 414Q	
415T 416G 417N	
418I 419A 420D	
421C 453Y 455L	
460N 493R 504G	
505H	
<b>Cadena A</b>	
369Y 370N <b>371L</b>	
372A 374F 373P	
<b>375F</b> 376T 377F	
378K 383S 384P	
385T	



Las mutaciones dadas por Ómicron en E484A anulan interacciones electrostáticas mientras que Q493R y S477N amortiguan la neutralización y K417N, E484A y Q493R dificultan el acoplamiento de anticuerpos tales como LY-CoV555, LY-CoV16 y CT-P59 a través de una combinación de impedimento estérico y remodelación de contactos electrostáticos, evitando así la unión<sup>122,123</sup>

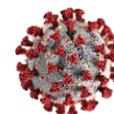
La región que comprende los residuos 366 a 375, que alberga las sustituciones S371L/S373P/S375F, se desvía notablemente de la conformación observada para el RBD de la variante silvestre, Según datos de otras investigaciones, la conformación adoptada en estructura de ómicron es incompatible con la unión de algunos mAbs como S2X35. Las mutaciones presentes en la proteína S en ómicron podrían ser mutaciones que participen en hacer que esta región del RBD sea dinámica y así mediar en la evasión inmune de algunos mAbs.<sup>124,125</sup> Por tanto, se observa la importancia de las mutaciones Q493R, K417N, S371L, S373P, S375F en el uso de anticuerpos, los compuestos F7G Y H7R parecen no tener mayor problema para su interacción y el posible bloqueo de la estructura de la proteína. Estas interacciones podrían ser relevantes ya que se estaría hablando de compuestos con mayor capacidad de afinidad por encima de los anticuerpos monoclonales, ya que las mutaciones no escapan de los ligandos F7G y H7R.

#### 7.4.3.2 Conformación semicerrada y abierta de Spike-Ómicron con ligandos H7R y F7G

Las conformaciones semicerradas y abiertas tienen dos grupos con mayor repetición (Tabla 12-15) tanto para el compuesto H7R como para F7G. Ambas estructuras comparten los sitios de interacción en cada uno de los clústers. Además, el clúster 1 es similar al clúster 2 de la conformación cerrada de la proteína S con el ligando H7R. Estas interacciones se localizan en el dominio S1 de la proteína.

*Tabla 12 Interacciones del compuesto H7R con Spike-ómicron en conformación semicerrada.*

Interacciones Clúster 1	Energía kcal mol <sup>-1</sup>	Interacciones Clúster 2	Energía kcal mol <sup>-1</sup>
<b>Cadena A B</b>	-9.729±0.186	<b>Cadena A</b>	-11.163 ±0.637
353W 355R 393T 396K 426P 427D 428D 429F 430T 431G 462K 463P 464F 465E 466R 514A 515F 516E 517L 518L 519X 520A 521P 523T		737D 740M 741Y 742I 743C 744G 745D 746S 749C 839D 840C 847R 851C 852A 853Q 855P 856K 963V 966L 975S 976V 977L 978N	
<b>Cadena D</b>		<b>Cadena B</b>	



114T 115Q 116S 130C 167E 168F 196N 197I 198D 19G9 200Y 230P 231I 232G 233I 234N 235I		318F 319R 320V 321Q 322P 538C 541F 543F 546L 547K 548G 549T 550G 556N 557K 568D 569I 570A 571D 572T 573T 574D 575A 576V 586D 587I 588T 589P 590C 591S 592F 756Y 759F	
<b>Cadena A</b>			

*Tabla 13 Interacciones del compuesto F7G con Spike-ómicron en conformación semicerrada.*

Interacciones Clúster 1	Energía kcal mol <sup>-1</sup>	Interacciones Clúster 2	Energía kcal mol <sup>-1</sup>
<b>Cadena A B</b> 353W 355R 393T 396K 426P 427D 428D 429F 430T 431G 462K 463P 464F 465E 466R 514A 515F 516E 517L 518L 519X 520A 521P 523T	-8.963±0.151	<b>Cadena A B</b> 725E 727L 728P 736V 737D 738C 739T 740M 754L 760C 761T 764K 765R 770I 773E 776K 780E 946G 947K 948L 949Q 950D 951V 952V 954H 1010Q 1012L 1013I 1014R 1017E 1018I 1019R 1020A 1021S 1023N 1024L	-9.684±0.263
<b>Cadena D</b>		<b>Cadena C</b> 274T 291C 292A 293L 298E 301C 302R 304K 315T 316S 317N 318F 319R 627D 628Q 629L 630T 633W 725E 727L 728P	
<b>Cadena A</b>			

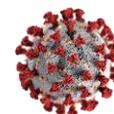
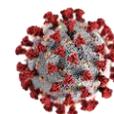


Tabla 14 Interacciones del compuesto H7R con Spike-ómicron en conformación abierta.

Interacciones Clúster 1	Energía kcal mol <sup>-1</sup>	Interacciones Clúster 2	Energía kcal mol <sup>-1</sup>
<b>Cadena A D</b> 353W 355R 393T 396K 426P 427D 428D 429F 430T 431G 462K 463P 464F 465E 466R 514A 515F 516E 517L 518L 519X 520A 521P 523T	-9.664±0.191	<b>Cadena A C</b> 737D 740M 741Y 742I 743C 744G 745D 746S 749C 839D 840C 847R 851C 852A 853Q 855P 856K 963V 966L 975S 976V 977L 978N 1012 1015 1016 1019 1023	-10.867± 0.973
<b>Cadena A B</b> 114T 115Q 116S 130C 167E 168F 196N 197I 198D 19G9 200Y 230P 231I 232G 233I 234N 235I		<b>Cadena B C</b> 318F 319R 320V 321Q 322P 538C 541F 543F 546L 547K 548G 549T 550G 556N 557K 568D 569I 570A 571D 572T 573T 574D 575A 576V 586D 587I 588T 589P	

Tabla 15 Interacciones del compuesto F7G con Spike-ómicron en conformación abierta.

Interacciones Clúster 1	Energía kcal mol <sup>-1</sup>	Interacciones Clúster 2	Energía kcal mol <sup>-1</sup>
<b>Cadena A B</b> 353W 355R 393T 396K 426P 427D 428D 429F 430T 431G 462K 463P 464F 465E 466R 514A 515F 516E 517L 518L 519X 520A 521P 523T	-8.963±0.151	<b>Cadena A B</b> 725E 727L 728P 736V 737D 738C 739T 740M 744G 745D 754L 758S 760C 761T 762Q 764K 765R 852A 855F 966L 967S 975S 976V 977L 978N 996L 1000R 946G 947K 948L 950D 951V 952V	-9.684±0.263



		954H 1010Q 1012L 1013I 1014R 1016A 1017E 1018I 1019R 1020A 1021S 1023N 1024L	
<b>Cadena D</b>		<b>Cadena C</b> 274T 291C 292A 293L 298E 301C 302R 304K 315T 316S 317N 318F 319R 627D 628Q 629L 630T 633W 725E 727L 728P 770I 773E 776K 780E 1012L 1019R 1020A 1023N	
<b>Cadena A</b>			

Mientras que, la mayoría de los COV tienen solo unas pocas mutaciones más allá de las regiones del sitio de escisión de furina, NTD y RBD, La proteína S de Ómicron alberga ocho sustituciones fuera de estas áreas: T547K, H655Y, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K y L981F. Tres de estas mutaciones introducen contactos electrostáticos interprotómeros entre las subunidades S<sub>2</sub> y S<sub>1</sub>: N764K se une a Q314 (en el dominio D), S982 se une a T547K (en el dominio C de protómeros con RBD cerrados) y N856K se une a D568 y T572 (en el dominio C, D568 está más cercano a N856K en protómeros con RBD cerrados).<sup>125</sup> Además, N969K forma contactos electrostáticos interprotómeros con Q755, y L981F, la hipótesis de la razón de estas mutaciones es que mejoran el empaquetamiento hidrofóbico intraprotómero en la conformación de profusión.<sup>112,117</sup> (Figura 22). La presencia de los compuestos entre la subunidad S1 y S2 supondría que podrían interferir en el empaquetamiento de la conformación de profusión, además presenta interacciones zonas del NTD que estaría interfiriendo probablemente en el movimiento.

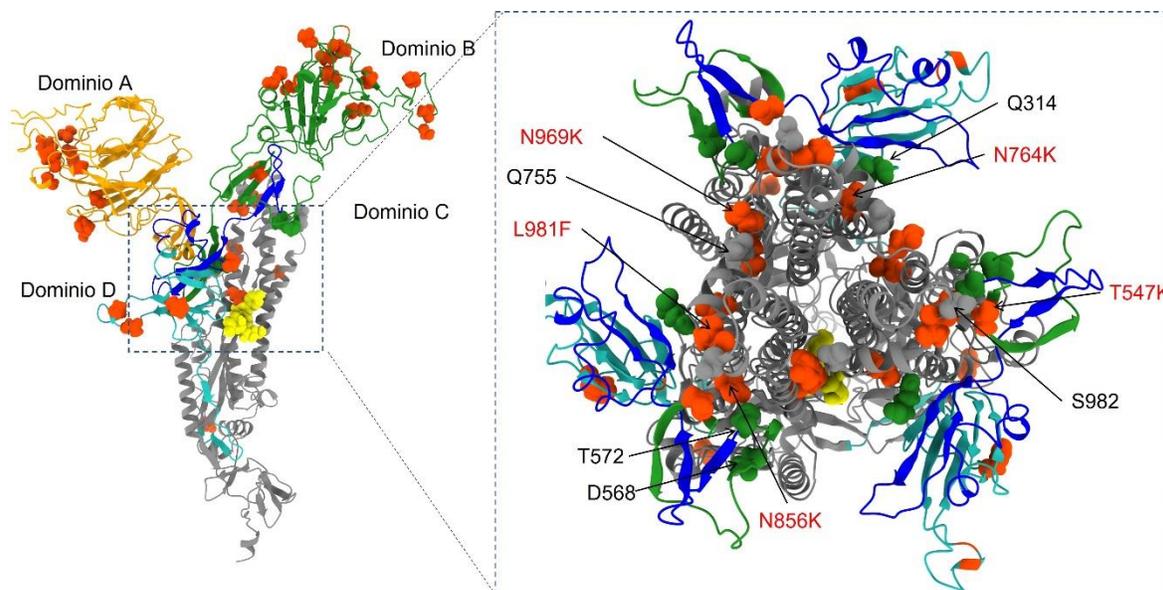
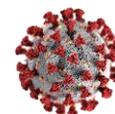
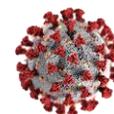


Figura 22 Interacciones interprotómeros en el centro de la proteína S-Ómicron

La gran cantidad de mutaciones de Ómicron en el motivo de unión al receptor (RBM) inmunodominante probablemente explica una proporción sustancial de la pérdida de neutralización por anticuerpos policlonales convalescientes y provocados por la vacuna, y la coincidencia con la plasticidad conocida del subdominio (RBD).

Finalmente tanto la Hesperetin-7-Rutinosido(H7R) como la Flavonona-7-O-glucosido (F7G) son flavonoides abundantes en los productos cítricos<sup>128</sup>, tanto a la Flavonona-7-O-glucosido (F7G) como a Hesperetin-7-Rutinosido(H7R) se le atribuye un potencial para aliviar los síntomas respiratorios causados por Covid-19 debido a sus propiedades como antitusígeno, tiene efecto en la regulación de la mucosidad, mejora de la función pulmonar y la regulación de la secreción pulmonar e inhibición de la secreción de factores inflamatorios pulmonares y mejora la respuesta inmunitaria antiviral.<sup>129</sup>

Lo realmente interesante es que según Francesco Maneguzzo *et al.*(2020) la Hesperetin-7-Rutinosido(H7R) mostró una notable afinidad de unión a los tres principales receptores proteicos del SARS-CoV-2, es decir, el dominio de la proteasa del SARS-CoV-2, el dominio de unión al receptor de la glicoproteína Spike (RBD) y el dominio de unión al receptor del ACE2 en el sitio de interacción que se tiene al comienzo de la infección (RBD-ACE2) y que además la Hesperetin-7-Rutinosido(H7R) superó a lopinavir, un fármaco de reutilización involucrado en ensayos clínicos para COVID-19<sup>130</sup>. Por tanto, nosotros con base a los resultados mostramos otro sitio de unión tanto de la Hesperetin-7-Rutinosido(H7R) como la Flavonona-7-O-glucosido (F7G) que se localiza entre el dominio N-Terminal (NTD) y el dominio de unión a Receptor (RBD), Que podrían estar inhibiendo el movimiento de la glicoproteína S debido a que esas interacciones se localizaron en las tres conformaciones de estudio (cerrada, semicerrada y abierta).



Pero además las recientes mutaciones en la variante ómicron no han sido impedimento para el acoplamiento los ligandos N7R y H7R en las estructuras conformacionales de Spike, al contrario, podrían estar impidiendo las interacciones interprotómeros de las 3 cadenas de Spike, modificando el empaquetamiento de profusión.

## 8. Conclusiones

Los compuestos F7G Y H7R tienen la capacidad de unirse a las conformaciones activas de la proteína Spike, con principal afinidad a la cabeza globular de la proteína en los 3 protómeros.

La unión que se dan entre la proteína Spike con los ligandos son en dos cadenas adyacentes que tienen conformación V y están empaquetadas entre ellas.

Las interacciones que muestra la proteína Spike de Wuhan con los ligandos F7G y H7R se localizan entre el dominio de unión a receptor (RBD) y el dominio N-Terminal (NTD), además se encuentran interacciones cercanas al dominio S2.

Las interacciones de unión entre proteína y compuestos son principalmente de Van der Waals, de tipo convencional de Hidrogeno y de tipo Alkil.

El acoplamiento molecular de la conformación cerrada de Spike con H7R tiene una energía más negativa en los dos grupos de interacción en comparación con N7G.

En la interacción de los ligandos con las conformaciones activas semicerrada y abierta, la energía de interacción es mejor en la parte central de la estructura, pero existe una preferencia por la zona NTD Y RBD.

La interacción de H7R es mucho más negativa que con F7G, aunque en general F7G presenta mayor dispersión de acoplamiento en toda la estructura de la proteína.

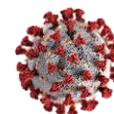
El análisis de las energías de afinidad entre los ligandos y la proteína Spike, señalan que hay mayor afinidad en las estructuras de Ómicron en comparación con la proteína Spike de Wuhan.

De las variantes estudiadas, algunas de las mutaciones de Ómicron muestran interacciones con los ligandos F7G Y H7R de tipo Hidrogeno convencional y de tipo hidrofóbicas, mostrando una mayor afinidad por algunas de las mutaciones.

## 9. Posibles Implicaciones

El acoplamiento de los compuestos F7G y H7R en Spike- Ómicron en la parte central de la proteína cercana al péptido de fusión podrían estar interfiriendo el empaquetamiento hidrofóbico de la conformación de profusión.

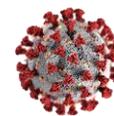
El conjunto de interacciones de los ligandos F7G y H7R en conformación cerrada, semicerrada y abierta podría interferir en el movimiento de la proteína Spike; es decir, en el levantamiento del dominio de unión a ACE2.



Además, los ligandos bloquean el empaquetamiento de la proteína Spike y la subsecuente proyección del péptido de fusión a membrana.

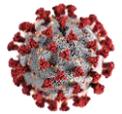
## 10. Perspectivas

- Usar dinámica molecular para simular la interacción en un tiempo determinado, en condiciones de solvatación, de la proteína, esperando que algunas interacciones se mantengan en a través del tiempo.
- Expresión heteróloga en *Pichia pastoris* y *Neurospora crassa* de la proteína Spike glicosilada del virus SARS-CoV-2. Para posteriores análisis *in vitro* de los compuestos frente a la proteína Spike
- Hacer pruebas *in vitro* de los compuestos seleccionados para determinar el efecto que tienen sobre el proceso de acoplamiento con proteínas heterólogas de virus artificiales (Spike y ACE-2).
- Análisis por resonancia de plasmones superficiales (SPR) para determinar la afinidad y la cinética de unión de los ligandos con la proteína S.
- Un ensayo de Fluorimetría de barrido diferencial mediante un equipo de PCR en tiempo real para la identificación de los ligandos unidos a la proteína Spike a través de la temperatura de fusión como dato de la afinidad de unión.
- Cristalografía de Rayos X para la obtención de la estructura del complejo Proteína-Ligando.
- Determinar el efecto *in vitro* de las moléculas seleccionadas frente al proceso infeccioso de SARS-CoV-2 en células VERO E6.

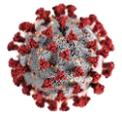


## 11. Referencias Bibliográficas

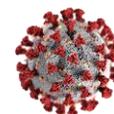
1. Our World in Data. Daily new confirmed COVID-19 deaths per million people. University of Oxford. Published 2022. <https://ourworldindata.org/explorers/coronavirus-data-explorer>
2. Zhou Y, Hou Y, Shen J, Huang Y, Martin W, Cheng F. Network-based drug repurposing for novel coronavirus 2019-nCoV/SARS-CoV-2. *Cell Discov.* 2020;6(1). doi:10.1038/s41421-020-0153-3
3. Jaiswal G, Kumar V. In-silico design of a potential inhibitor of SARS-CoV-2 S protein. *PLoS One.* 2020;15(10 October):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0240004
4. Wan Y, Shang J, Graham R, Baric RS, Li F. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *J Virol.* 2020;94(7). doi:10.1128/jvi.00127-20
5. Parks JM, Smith JC. How to Discover Antiviral Drugs Quickly. *N Engl J Med.* 2020;382(23):2261-2264. doi:10.1056/nejmcibr2007042
6. Woo H, Park SJ, Choi YK, *et al.* Developing a fully glycosylated full-length SARS-COV-2 spike protein model in a viral membrane. *J Phys Chem B.* 2020;124(33):7128-7137. doi:10.1021/acs.jpcc.0c04553
7. Organization WH. Coronavirus disease (COVID-19) outbreak. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
8. Lei J, Kusov Y, Hilgenfeld R. Nsp3. 2020;(January).
9. Helen M Berman, John Westbrook, Zukang Geng, Gary Gilliland, T. N. Bhat, Helge Weissing, Ilya N. Shindyalov PEB. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(1):235-242. doi:<https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
10. Chan JFW, Kok KH, Zhu Z, *et al.* Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):221-236. doi:10.1080/22221751.2020.1719902
11. Abramo JM, Reynolds A, Crisp GT, *et al.* Individuality in music performance. *Assess Eval High Educ.* 2012;37(October):435. doi:10.1007/82
12. Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol.* 2020;5(4):562-569. doi:10.1038/s41564-020-0688-y
13. Kesheh MM, Hosseini P, Soltani S, Zandi M. An overview on the seven pathogenic human coronaviruses. *Rev Med Virol.* 2022;32(2). doi:10.1002/rmv.2282
14. Mulabbi EN, Tweyongyere R, Byarugaba DK. The history of the emergence and transmission of human Coronaviruses. *Onderstepoort J Vet Res.* 2021;88(1):1-8. doi:10.4102/ojvr.v88i1.1872



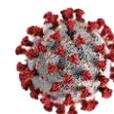
15. Cong Y, Ren X. Coronavirus entry and release in polarized epithelial cells : a review. 2014;(April):308-315. doi:10.1002/rmv
16. Hamre D, Procknow JJ. A New Virus Isolated from the Human Respiratory Tract. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1966;121(1):190-193. doi:10.3181/00379727-121-30734
17. Van Der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, *et al.* Identification of a new human coronavirus. *Nat Med.* 2004;10(4):368-373. doi:10.1038/nm1024
18. Baric RS, Sims AC. Humanized mice develop coronavirus respiratory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(23):8073-8074. doi:10.1073/pnas.0503091102
19. Owczarek K, Szczepanski A, Milewska A, *et al.* Early events during human coronavirus OC43 entry to the cell. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-12. doi:10.1038/s41598-018-25640-0
20. Beidas M, Chehadeh W. Effect of Human Coronavirus OC43 Structural and Accessory Proteins on the Transcriptional Activation of Antiviral Response Elements. *Intervirology.* 2018;61(1):30-35. doi:10.1159/000490566
21. Hasöksüz M, Kiliç S, Saraç F. Coronaviruses and sars-cov-2. *Turkish J Med Sci.* 2020;50(SI-1):549-556. doi:10.3906/sag-2004-127
22. Millet JK, Goldstein ME, Labitt RN, Hsu HL, Daniel S, Whittaker GR. A camel-derived MERS-CoV with a variant spike protein cleavage site and distinct fusion activation properties. *Emerg Microbes Infect.* 2016;5(12):e126-9. doi:10.1038/emi.2016.125
23. Matsuyama S, Shirato K, Kawase M, *et al.* Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein Is Not Activated Directly by Cellular Furin during Viral Entry into Target Cells. *J Virol.* 2018;92(19):1-12. doi:10.1128/jvi.00683-18
24. van Doremalen N, Miazgowicz KL, Milne-Price S, *et al.* Host Species Restriction of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus through Its Receptor, Dipeptidyl Peptidase 4. *J Virol.* 2014;88(16):9220-9232. doi:10.1128/jvi.00676-14
25. Park M, Thwaites RS, Openshaw PJM. COVID-19: Lessons from SARS and MERS. *Eur J Immunol.* 2020;50(3):308-311. doi:10.1002/eji.202070035
26. Song Z, Xu Y, Bao L, *et al.* From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight. *Viruses.* 2019;11(1). doi:10.3390/v11010059
27. Ren LL, Wang YM, Wu ZQ, *et al.* Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. *Chin Med J (Engl).* 2020;133(9):1015-1024. doi:10.1097/CM9.0000000000000722
28. Satarker S, Nampoothiri M. Structural Proteins in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2. *Arch Med Res.* 2020;51(6):482-491. doi:10.1016/j.arcmed.2020.05.012
29. Mahato RK, Mahanty AK, Kotakonda M, Prasad S, Bhattacharyya S, Biswas B. A hydrated 2,3-diaminophenazinium chloride as a promising building block against SARS-CoV-2. *Sci Rep.* 2021;11(1):1-17. doi:10.1038/s41598-021-02280-5



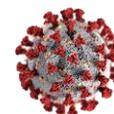
30. Huang Q, Yu L, Petros AM, *et al.* Structure of the N-terminal RNA-binding domain of the SARS CoV nucleocapsid protein. *Biochemistry*. 2004;43(20):6059-6063. doi:10.1021/bi036155b
31. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol*. 2020;92(4):418-423. doi:10.1002/jmv.25681
32. Neuman BW, Kiss G, Kunding AH, *et al.* A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *J Struct Biol*. 2011;174(1):11-22. doi:10.1016/j.jsb.2010.11.021
33. Schoeman D, Fielding BC, Arias-Reyes C, *et al.* Journal Pre-proof Does the pathogenesis of SAR-CoV-2 virus decrease at high-altitude? Does the pathogenesis of SAR-CoV-2 virus decrease at high-altitude? Corresponding authors. *Cell Res*. 2020;9(1):278-280. doi:10.3390/ijerph17082932
34. Coutard B, Valle C, de Lamballerie X, Canard B, Seidah NG, Decroly E. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res*. 2020;176(February):104742. doi:10.1016/j.antiviral.2020.104742
35. (OMS) O mundial de la saalud. Seguimiento de las variantes del SARS-CoV-2. <https://www.who.int/es/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>
36. Khare S, Gurry C, Freitas L, *et al.* GISAID's Role in Pandemic Response. *China CDC Wkly*. 2021;3(49):1049-1051. doi:10.46234/ccdcw2021.255
37. Centers for Disease Control and Prevention. Coronavirus disease 2019 (COVID-2019). Centers for Disease Control and Prevention. Accessed May 13, 2022. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/index.html>
38. Ou J, Lan W, Wu X, *et al.* Tracking SARS-CoV-2 Omicron diverse spike gene mutations identifies multiple inter-variant recombination events. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1). doi:10.1038/s41392-022-00992-2
39. Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Sah R, *et al.* SARS-CoV-2/COVID-19 and advances in developing potential therapeutics and vaccines to counter this emerging pandemic. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2020;19(1):1-46. doi:10.1186/s12941-020-00384-w
40. Solnier J, Fladerer JP. Flavonoids: A complementary approach to conventional therapy of COVID-19? *Phytochem Rev*. 2020;6. doi:10.1007/s11101-020-09720-6
41. Lai CC, Liu YH, Wang CY, *et al.* Asymptomatic carrier state, acute respiratory disease, and pneumonia due to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Facts and myths. *J Microbiol Immunol Infect*. 2020;53(3):404-412. doi:10.1016/j.jmii.2020.02.012
42. McKee DL, Sternberg A, Stange U, Laufer S, Naujokat C. Candidate drugs against SARS-CoV-2 and COVID-19. *Pharmacol Res*. 2020;157(March):104859. doi:10.1016/j.phrs.2020.104859
43. Liskova A, Samec M, Koklesova L, *et al.* Flavonoids against the SARS-CoV-2



- induced inflammatory storm. *Biomed Pharmacother.* 2021;138:111430. doi:10.1016/j.biopha.2021.111430
44. Yang Y, Islam MS, Wang J, Li Y, Chen X. Traditional Chinese medicine in the treatment of patients infected with 2019-new coronavirus (SARS-CoV-2): A review and perspective. *Int J Biol Sci.* 2020;16(10):1708-1717. doi:10.7150/ijbs.45538
  45. Guerrero L, Castillo J, Quiñones M, *et al.* Inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme Activity by Flavonoids: Structure-Activity Relationship Studies. *PLoS One.* 2012;7(11):1-11. doi:10.1371/journal.pone.0049493
  46. B B, H R. Plant flavonoids as angiotensin converting enzyme inhibitors in regulation of hypertension. *Funct Foods Heal Dis.* 2011;1(5):172-188. <http://www.functionalfoodscenter.net/files/43940078.pdf>
  47. Srinivas N. Structurally Modified Dietary Flavonoids: Are these Viable Drug Candidates for Chemoprevention? *Curr Clin Pharmacol.* 2009;4(1):67-70. doi:10.2174/157488409787236065
  48. Cattolico R, Jacobs MA, Zhou Y, *et al.* Chloroplast genome sequencing analysis of *Heterosigma akashiwo* CCMP452 (West Atlantic) and NIES293 (West Pacific) strains. *BMC Genomics.* 2008;9(1):211. doi:10.1186/1471-2164-9-211
  49. Arora S, Lohiya G, Moharir K, Shah S, Yende S. Identification of Potential Flavonoid Inhibitors of the SARS-CoV-2 Main Protease 6YNQ: A Molecular Docking Study. *Digit Chinese Med.* 2020;3(4):239-248. doi:10.1016/j.dcm.2020.12.003
  50. García ASR. Naturalis. *Boletín La Coord Física Y Química.* 2018;(29):1-8.
  51. Krishna R, Van Baten JM. Comment on “modeling adsorption and self-diffusion of methane in LTA zeolites: The influence of framework flexibility.” *J Phys Chem C.* 2010;114(41):18017-18021. doi:10.1021/jp107956z
  52. Combariza Montañez AF. Difusión Selectiva de Hidrocarburos en Zeolitas de Poro Pequeño a Partir de Técnicas de Simulación Molecular. Published online 2011. <http://www.tesisenred.net/handle/10803/52201>
  53. Medina-Franco JL, Fernán-Dezde Gortari E, Jesús Naveja J. Avances en el diseño de fármacos asistido por computadora. *Educ Quim.* 2015;26(3):180-186. doi:10.1016/j.eq.2015.05.002
  54. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2009;31(2):NA-NA. doi:10.1002/jcc.21334
  55. Li J, Fu A, Zhang L. An Overview of Scoring Functions Used for Protein-Ligand Interactions in Molecular Docking. *Interdiscip Sci Comput Life Sci.* 2019;11(2):320-328. doi:10.1007/s12539-019-00327-w
  56. Paquet E, Viktor HL. Molecular dynamics, monte carlo simulations, and langevin dynamics: A computational review. *Biomed Res Int.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/183918

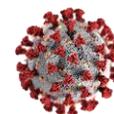


57. Yuriev E, Holien J, Ramsland PA. Improvements, trends, and new ideas in molecular docking: 2012-2013 in review. *J Mol Recognit.* 2015;28(10):581-604. doi:10.1002/jmr.2471
58. Österberg F, Morris GM, Sanner MF, Olson AJ, Goodsell DS. Automated docking to multiple target structures: Incorporation of protein mobility and structural water heterogeneity in autodock. *Proteins Struct Funct Genet.* 2002;46(1):34-40. doi:10.1002/prot.10028
59. Allen WJ, Balias TE, Mukherjee S, *et al.* DOCK 6: Impact of new features and current docking performance. *J Comput Chem.* 2015;36(15):1132-1156. doi:10.1002/jcc.23905
60. Koes DR, Baumgartner MP, Camacho CJ. Lessons learned in empirical scoring with smina from the CSAR 2011 benchmarking exercise. *J Chem Inf Model.* 2013;53(8):1893-1904. doi:10.1021/ci300604z
61. Booker LB, Goldberg DE, Holland JH. Classifier systems and genetic algorithms. *Artif Intell.* 1989;40(1-3):235-282. doi:10.1016/0004-3702(89)90050-7
62. Venkatachalam CM, Jiang X, Oldfield T, Waldman M. LigandFit: A novel method for the shape-directed rapid docking of ligands to protein active sites. *J Mol Graph Model.* 2003;21(4):289-307. doi:10.1016/S1093-3263(02)00164-X
63. Morris GM, Ruth H, Lindstrom W, *et al.* Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* 2009;30(16):2785-2791. doi:10.1002/jcc.21256
64. Rarey M, Kramer B, Lengauer T, Klebe G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J Mol Biol.* 1996;261(3):470-489. doi:10.1006/jmbi.1996.0477
65. Jain AN. Surfex: Fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine. *J Med Chem.* 2003;46(4):499-511. doi:10.1021/jm020406h
66. Gareth Jones, Peter Willett, Robert C. Glen, Andrew R. Leach RT. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *J Mol Biol.* 1997;267(3):727-748. doi:https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897
67. Schapira M, Abagyan R, Totrov M. Nuclear hormone receptor targeted virtual screening. *J Med Chem.* 2003;46(14):3045-3059. doi:10.1021/jm0300173
68. Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, *et al.* Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J Med Chem.* 2004;47(7):1739-1749. doi:10.1021/jm0306430
69. McGann MR, Almond HR, Nicholls A, Grant JA, Brown FK. Gaussian docking functions. *Biopolymers.* 2003;68(1):76-90. doi:10.1002/bip.10207
70. Corbeil CR, Williams CI, Labute P. Variability in docking success rates due to dataset preparation. *J Comput Aided Mol Des.* 2012;26(6):775-786. doi:10.1007/s10822-012-

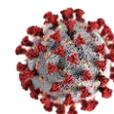


9570-1

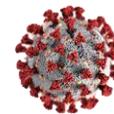
71. Zhao H, Caflisch A. Discovery of ZAP70 inhibitors by high-throughput docking into a conformation of its kinase domain generated by molecular dynamics. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2013;23(20):5721-5726. doi:10.1016/j.bmcl.2013.08.009
72. Ruiz-Carmona S, Alvarez-Garcia D, Foloppe N, *et al.* rDock: A Fast, Versatile and Open Source Program for Docking Ligands to Proteins and Nucleic Acids. *PLoS Comput Biol.* 2014;10(4):1-7. doi:10.1371/journal.pcbi.1003571
73. Pagadala NS, Syed K, Tuszynski J. Software for molecular docking: a review. *Biophys Rev.* 2017;9(2):91-102. doi:10.1007/s12551-016-0247-1
74. Whelan J, Editors MWM, Walker JM. *Coronaviruses Methods and Protocols.*; 2015.
75. Lung J, Lin YS, Yang YH, *et al.* The potential chemical structure of anti-SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase. *J Med Virol.* 2020;92(6):693-697. doi:10.1002/jmv.25761
76. Seley-Radtke KL, Yates MK. The evolution of nucleoside analogue antivirals: A review for chemists and non-chemists. Part 1: Early structural modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral Res.* 2018;154(January):66-86. doi:10.1016/j.antiviral.2018.04.004
77. Rocha-Pereira J, Jochmans D, Dallmeier K, Leyssen P, Nascimento MSJ, Neyts J. Favipiravir (T-705) inhibits in vitro norovirus replication. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;424(4):777-780. doi:10.1016/j.bbrc.2012.07.034
78. Gordon CJ, Tchesnokov EP, Feng JY, Porter DP, Götte M. The antiviral compound remdesivir potently inhibits RNA dependent RNA polymerase from Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Biol Chem.* 2020;295(15):4773-4779. doi:10.1074/jbc.AC120.013056
79. Wang M, Cao R, Zhang L, *et al.* Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res.* 2020;30(3):269-271. doi:10.1038/s41422-020-0282-0
80. Rando HM, Wellhausen N, Ghosh S, *et al.* Identification and Development of Therapeutics for COVID-19. *mSystems.* 2021;6(6):1-52. doi:10.1128/msystems.00233-21
81. Foubister N, Rodder R. A call to arms. *Midwives.* Published online 2010:32-33. doi:10.1080/10714839.1999.11722749
82. Couzin-Frankel J. Antiviral pills could change pandemic's course. *Science (80- ).* 2021;374(6569):799-800. doi:10.1126/science.acx9605
83. Khare S, Azevedo M, Parajuli P, Gokulan K. Conformational Changes of the Receptor Binding Domain of SARS-CoV-2 Spike Protein and Prediction of a B-Cell Antigenic Epitope Using Structural Data. *Front Artif Intell.* 2021;4(March):1-12. doi:10.3389/frai.2021.630955
84. Benton DJ, Wrobel AG, Xu P, *et al.* Receptor binding and priming of the spike protein



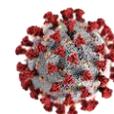
- of SARS-CoV-2 for membrane fusion. *Nature*. Published online 2020. doi:10.1038/s41586-020-2772-0
85. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020;181(2):281-292.e6. doi:10.1016/j.cell.2020.02.058
  86. Tian W, Li D, Zhang N, *et al.* O-glycosylation pattern of the SARS-CoV-2 spike protein reveals an “O-Follow-N” rule. *Cell Res*. 2021;31(10):1123-1125. doi:10.1038/s41422-021-00545-2
  87. Tai W, He L, Zhang X, *et al.* Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(6):613-620. doi:10.1038/s41423-020-0400-4
  88. Phan T. Novel coronavirus: From discovery to clinical diagnostics. *Infect Genet Evol*. 2020;79(January):104211. doi:10.1016/j.meegid.2020.104211
  89. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science (80- )*. 2020;367(6483):1260-1263. doi:10.1126/science.aax0902
  90. Hulswit RJG, Lang Y, Bakkers MJG, *et al.* Human coronaviruses OC43 and HKU1 bind to 9-O-acetylated sialic acids via a conserved receptor-binding site in spike protein domain A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(7):2681-2690. doi:10.1073/pnas.1809667116
  91. Alejandra Tortorici M, Walls AC, Lang Y, *et al.* Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors. *Nat Struct Mol Biol*. 2019;26(6):481-489. doi:10.1038/s41594-019-0233-y
  92. Li W, Hulswit RJG, Widjaja I, *et al.* Identification of sialic acid-binding function for the Middle East respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(40):E8508-E8517. doi:10.1073/pnas.1712592114
  93. Park YJ, Walls AC, Wang Z, *et al.* Structures of MERS-CoV spike glycoprotein in complex with sialoside attachment receptors. *Nat Struct Mol Biol*. 2019;26(12):1151-1157. doi:10.1038/s41594-019-0334-7
  94. Huang Y, Yang C, Xu X feng, Xu W, Liu S wen. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol Sin*. 2020;41(9):1141-1149. doi:10.1038/s41401-020-0485-4
  95. Wang T yang, Li Q, Bi K shun. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian J Pharm Sci*. 2018;13(1):12-23. doi:10.1016/j.ajps.2017.08.004
  96. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: An overview. *J Nutr Sci*. 2016;5. doi:10.1017/jns.2016.41
  97. D’Amelia V, Aversano R, Chiaiese P, Carputo D. The antioxidant properties of plant



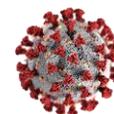
- flavonoids: their exploitation by molecular plant breeding. *Phytochem Rev.* 2018;17(3):611-625. doi:10.1007/s11101-018-9568-y
98. Solnier J, Martin L, Bhakta S, Bucar F. Flavonoids as novel efflux pump inhibitors and antimicrobials against both environmental and pathogenic intracellular mycobacterial species. *Molecules.* 2020;25(3):1-12. doi:10.3390/molecules25030734
  99. Wang X, Yang Z, Su F, *et al.* Study on structure activity relationship of natural flavonoids against thrombin by molecular docking virtual screening combined with activity evaluation in vitro. *Molecules.* 2020;25(2). doi:10.3390/molecules25020422
  100. Catarino MD, Talhi O, Rabahi A, Silva AMS, Cardoso SM. *The Antiinflammatory Potential of Flavonoids: Mechanistic Aspects.* Vol 48. 1st ed. Elsevier B.V.; 2016. doi:10.1016/B978-0-444-63602-7.00003-5
  101. Nijveldt RJ, Van Nood E, Van Hoorn DEC, Boelens PG, Van Norren K, Van Leeuwen PAM. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* 2001;74(4):418-425. doi:10.1093/ajcn/74.4.418
  102. Chen IY, Moriyama M, Chang MF, Ichinohe T. Severe acute respiratory syndrome coronavirus viroporin 3a activates the NLRP3 inflammasome. *Front Microbiol.* 2019;10(JAN):1-9. doi:10.3389/fmicb.2019.00050
  103. Shah A. Novel Coronavirus-Induced NLRP3 Inflammasome Activation: A Potential Drug Target in the Treatment of COVID-19. *Front Immunol.* 2020;11(May):1-5. doi:10.3389/fimmu.2020.01021
  104. Chen F, Chan KH, Jiang Y, *et al.* In vitro susceptibility of 10 clinical isolates of SARS coronavirus to selected antiviral compounds. *J Clin Virol.* 2004;31(1):69-75. doi:10.1016/j.jcv.2004.03.003
  105. Wu C, Liu Y, Yang Y, *et al.* Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharm Sin B.* 2020;10(5):766-788. doi:10.1016/j.apsb.2020.02.008
  106. Yi L, Li Z, Yuan K, *et al.* Small Molecules Blocking the Entry of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus into Host Cells. *J Virol.* 2004;78(20):11334-11339. doi:10.1128/jvi.78.20.11334-11339.2004
  107. Park JY, Ko JA, Kim DW, *et al.* Chalcones isolated from *Angelica keiskei* inhibit cysteine proteases of SARS-CoV. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2016;31(1):23-30. doi:10.3109/14756366.2014.1003215
  108. Haggag YA. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information. 2020;(January).
  109. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, *et al.* UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25(13):1605-1612. doi:10.1002/jcc.20084



110. Wang Q, Zhang Y, Wu L, *et al.* Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell.* 2020;181(4):894-904.e9. doi:10.1016/j.cell.2020.03.045
111. Amicone M, Borges V, Alves MJ, *et al.* Mutation rate of SARS-CoV-2 and emergence of mutators during experimental evolution. *Evol Med Public Heal.* 2022;10(1):142-155. doi:10.1093/emph/eoac010
112. Li Q, Wu J, Nie J, *et al.* The Impact of Mutations in SARS-CoV-2 Spike on Viral Infectivity and Antigenicity. *Cell.* 2020;182(5):1284-1294.e9. doi:10.1016/j.cell.2020.07.012
113. Zhang S, Liang Q, He X, *et al.* Loss of Spike N370 glycosylation as an important evolutionary event for the enhanced infectivity of SARS-CoV-2. *Cell Res.* 2022;32(3):315-318. doi:10.1038/s41422-021-00600-y
114. Shajahan A, Pepi LE, Rouhani DS, Heiss C, Azadi P. Glycosylation of SARS-CoV-2: structural and functional insights. *Anal Bioanal Chem.* 2021;413(29):7179-7193. doi:10.1007/s00216-021-03499-x
115. Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science (80- ).* 2020;369(6501):330-333. doi:10.1126/science.abb9983
116. Tian D, Sun Y, Zhou J, Ye Q. The Global Epidemic of the SARS-CoV-2 Delta Variant, Key Spike Mutations and Immune Escape. *Front Immunol.* 2021;12(November):1-7. doi:10.3389/fimmu.2021.751778
117. Deng X, Garcia-Knight MA, Khalid M, Servellita V, Wang C, Morris MK *et al.* . Transmission, infectivity, and antibody neutralization of an emerging SARS-CoV-2 variant in California carrying a L452R spike protein mutation. *medRxiv Prepr.* Published online 2021:1-47. doi:10.1101/2021.03.07.2125264
118. Di Giacomo S, Mercatelli D, Rakhimov A, Giorgi FM. Preliminary report on severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Spike mutation T478K. *J Med Virol.* 2021;93(9):5638-5643. doi:10.1002/jmv.27062
119. Shang J, Wan Y, Luo C, *et al.* Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(21). doi:10.1073/pnas.2003138117
120. Harvey WT, Carabelli AM, Jackson B, *et al.* SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(7):409-424. doi:10.1038/s41579-021-00573-0
121. Starr TN, Greaney AJ, Hilton SK, *et al.* Deep Mutational Scanning of SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Reveals Constraints on Folding and ACE2 Binding. *Cell.* 2020;182(5):1295-1310.e20. doi:10.1016/j.cell.2020.08.012
122. Starr TN, Greaney AJ, Addetia A, *et al.* Prospective mapping of viral mutations that escape antibodies used to treat COVID-19. *Science (80- ).* 2021;371(6531):850-854. doi:10.1126/science.abf9302



123. Liu L, Iketani S, Guo Y, *et al.* Striking antibody evasion manifested by the Omicron variant of SARS-CoV-2. *Nature*. 2022;602(7898):676-681. doi:10.1038/s41586-021-04388-0
124. Camerani E, Bowen JE, Rosen LE, *et al.* Broadly neutralizing antibodies overcome SARS-CoV-2 Omicron antigenic shift. *Nature*. 2022;602(7898):664-670. doi:10.1038/s41586-021-04386-2
125. Mccallum M, Czudnochowski N, Rosen LE, *et al.* Structural basis of SARS-CoV-2 Omicron immune evasion and receptor engagement. 2022;868(February):864-868.
126. Walls AC, Tortorici MA, Bosch BJ, *et al.* Cryo-electron microscopy structure of a coronavirus spike glycoprotein trimer. *Nature*. 2016;531(7592):114-117. doi:10.1038/nature16988
127. Cherniaieva AA. Частота Асимптоматической Гиперурикемии Среди Взрослых Больных Сахарным Диабетом 1-Го И 2-Го Типа. *Int J Endocrinol*. 2021;16(4):327-332. doi:10.22141/2224-0721.16.4.2020.208486
128. Chen H, Du Q. Potential natural compounds for preventing SARS-CoV-2 (2019-nCoV) infection. *Preprints*. 2020;2(January):2020010358. doi:10.20944/preprints202001.0358.v3
129. Basu A, Sarkar A, Maulik U. Computational approach for the design of potential spike protein binding natural compounds in SARS- CoV2 Angiotensin converting enzyme 2 ( ACE2 ) ( EC : 3 . 4 . 17 . 23 ) is a transmembrane protein which is considered as receptor for spike protein binding.
130. Meneguzzo F, Ciriminna R, Zabini F, Pagliaro M. Review of evidence available on hesperidin-rich products as potential tools against COVID-19 and hydrodynamic cavitation-based extraction as a method of increasing their production. *Processes*. 2020;8(5):1-18. doi:10.3390/PR8050549



## Anexo1

Tabla 16 clasificación de las variantes de estudio

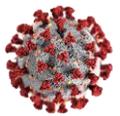
Numero de Variante de estudio	Variante con identificación de la OMS y el linaje Pango
V0	Silvestre
V1	B.1.1.7 Alpha
V2	P.1Gamma
V3	B.1.351 Beta
V4	B.1.427 Épsilon
V5	B.1.429 Épsilon
V6	B.1.526 Lota
V7	B.1.525 Eta
V8	B.1.526.1
V9	P.2 Zeta
V10	B.1.1.222 + 478 Renombrada como 1.1.519 (de la anterior incluye 681) aparecida en México.
V11	B.1.617
V12	B.1.617.1 Kappa
V13	B.1.617.2 Delta
V14	B.1.617.3
V15	B.1.1.529 Ómicron

### Interacciones del Acoplamiento Molecular de las 16 variantes de estudio.

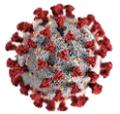
La Tabla 2 Señala todas las posibles interacciones que tiene H7R con todas las variantes que fueron estudiadas, es decir, los residuos aquí mencionados entraron en contacto con H7R, sin importar cuantas veces se posiciono en ese residuo durante las 100 repeticiones de acoplamiento de cada sistema. Hay interacciones que solo comparten ciertas variantes y cierta conformación

Tabla 17 Interacciones de ligando H7R con las 16 variantes de estudio, se enlista de acuerdo con los residuos que tienen en común.

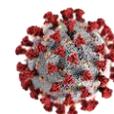
Variantes(v-)	6vxx			6vsb			6x2b		
<b>En todas las variantes</b>	108	113	114	40	42	44	108	109	110
	115	116	130	353	355	357	111	113	114
	131	132	165	396	398	423	115	116	117
	167	168	230	426	427	428	130	131	132
	231	232	233	429	430	431	165	166	167
	234	344	346	462	463	464	168	196	197
	347	348	349	465	466	468	198	199	200
	351	352	353	514	515	516	230	231	232
	354	355	356	517	518	519	233	234	235



	357	366	367	541	543	545	236	237	238
	368	369	370	546	547	548	319	353	354
	371	372	373	549	550	555	355	396	426
	374	375	376	556	557	565	427	428	429
	377	378	379	566	567	568	430	462	463
	380	381	382	569	570	571	464	465	514
	383	384	385	572	573	574	515	516	517
	403	405	406	575	576	586	518	540	541
	408	409	411	587	588	589	545	546	547
	412	413	414	590	591	592	548	549	550
	415	416	417	739	740	741	555	556	557
	418	419	420	742	743	744	565	567	568
	421	424	427	745	746	747	569	570	571
	436	437	438	749	839	847	572	573	574
	439	450	451	851	852	853	575	576	586
	452	453	455	855	856	857	587	588	589
	460	466	467	963	964	966	592	739	740
	468	469	470	967	968	969	741	742	743
	492	495	505	974	975	976	744	745	746
	508	984	985	977	978	979	749	847	851
	986	987	988	996	1000		852	853	855
							856	857	966
							967	975	976
							977	978	979
							981	996	1000
<b>0, 1, 2, 3, 5, 11, 12, 13, 14</b>	44	47	48						
	49	50	274						
	291	298	299						
	301	302	303						
	304	314	315						
	316	317	594						
	595	596	628						
	737	738	739						
	754	755	756						
	757	758	761						
	764	765	768						
	769	956	957						
	958	960	961						
	962	964	965						
	967	968	969						
	970	975							
<b>0,2, 3, 11, 12, 13, 14</b>	567	568	569						
	570	571							
<b>0, 1, 2, 3, 5, 6, 9, 10</b>				13	14	15			
				118	120	122			
				127	129	133			
				141	148	149			
				151	152	154			
				155	156	157			
				158	160	161			
				162	163				



<b>1, 4, 5, 12, 13</b>		727 947 951 957 1013 1016 1020	728 948 953 1010 1014 1017 1021	946 950 954 1011 1015 1018 1024	
<b>0,1, 2, 5, 15</b>		725 737 753 761 765 768 772 780 1012 1016	735 738 754 762 766 769 773 861 1013 1019	736 739 760 764 767 770 776 862 1015 1023	
<b>1, 2, 3, 4, 5,15</b>		108 116 132 168 198 200 233	114 130 165 196 199 231 234	115 131 167 197 230 232 235	
<b>1, 2, 3, 5,15</b>	,	353 463 466 469	457 464 467 471	458 465 468	
<b>1, 2, 3, 4</b>		320 323 538 553 590 614 618 623 836 839	321 536 539 588 591 615 619 834 837 854	322 537 551 589 592 616 622 835 838	
<b>0, 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14</b>				454 458 465 468 471 474	456 459 466 469 472 489
<b>0, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,15</b>				13 118 127 141 149 154 157	14 120 129 142 151 155 158
				457 461 470 473 491	15 122 133 148 152 156 159



			160 163	161	162
<b>0, 1, 3, 5, 8, 9, 10, 14</b>			357 393 519 523 516	359 394 520 358 517	360 396 521 393 518
<b>1, 2, 3, 7, 8, 9, 12, 13,</b>			765 768 772 780 1016 1023	766 769 773 1012 1019	767 770 776 1015 1020
<b>1, 2, 8, 9, 12, 13</b>			727 947 951 960 1013 1016 1020	728 948 954 958 1014 1017 1021	946 950 957 1010 1015 1018 1024
<b>2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 14,</b>			Cadena A 320 536 551 589 592	321 537 553 590 614	323 538 588 591 615
			Cadena B 835 838 847 854	836 839 851	837 840 852
				855	

Para el compuesto N7G también se tienen interacciones específicas además de los clústers ya mencionados, las interacciones son por cada variante y por cada conformación y se tiene algunas que comparten entre ellas (Tabla3)

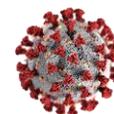
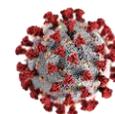
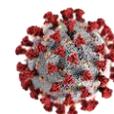


Tabla 18 Interacciones con N7G de las 16 variantes estudiadas, los residuos que se enlistan tienen contacto con el ligando las conformaciones mencionadas.

Variantes(v-)	6vxx			6vsb			6x2b		
<b>Interacciones en todas las variantes</b>	114	115	116	40	42	114	40	42	43
	130	131	132	115	116	130	44	319	353
	165	167	168	131	132	165	354	355	357
	231	232	233	166	167	168	396	426	428
	234	352	353	196	198	200	429	430	431
	354	355	468	199	231	232	458	459	461
	470			233	234	235	462	463	464
	344	346	347	319	352	353	465	466	467
	348	349	351	354	355	396	514	515	516
	356	369	370	398	426	429	517	518	519
	371	372	373	430	454	456	541	543	545
	374	375	376	457	458	459	546	547	548
	377	378	379	461	462	463	549	550	557
	380	381	382	464	465	466	565	567	568
	383	384	403	467	468	469	569	570	571
	405	406	408	470	471	472	572	573	574
	409	414	415	473	474	479	576	587	588
	416	417	418	481	491	514	589	739	740
	419	420	421	515	516	517	741	742	743
	449	450	451	518	519	541	744	745	746
	452	453	455	542	545	546	749	847	851
	460	466	490	547	548	549	852	855	856
	492	504	505	550	565	567	963	966	967
	985	986	987	570	571	572	975	976	977
	988			573	574	587	978	979	983
				588	589	739	996	1000	
				740	741	742			
				743	744	745			
				746	749	847			
				851	855	856			
				966	967	975			
				976	977	978			
				979	982	983			
			996	1000					
<b>Variantes 4,5,7,8,12,14,</b>			50	51	279				
			291	292	293				
			294	298	301				
			302	303	304				
			313	314	315				
			316	317	319				
			627	628	629				
			630	633	735				
			736	737	738				
			739	740	742				
			750	751	753				
		754	760	762					



		761 768	764	765	
<b>0,2,4,5,7,9,10,12,13,</b>		303 769 773 953 1010 1014 1018	765 770 776 954 1012 1016 1019	766 772 947 957 1013 1017	
<b>1, 2, 5, 7, 14</b>		835	836 838 840	837 839 841	
<b>0, 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13</b>					49 274 298 302 315 318 627 630 736 739 751 758 762 765 859
<b>0, 2,4,5,7,10,13</b>					50 291 299 304 316 319 628 633 737 740 753 760 763 766 957
					51 292 301 314 317 594 629 735 738 750 754 761 764 768
					727 765 769 773 780 948 952 957 1011 1014 1017 1020 1024



<b>2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 cadena A</b>			320	321	322
			323	537	538
			536	551	553
			586	588	589
			590	591	592
			614	615	616
			618	619	622
			623		
<b>2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 13, 14, cadena b</b>			835	836	837
			838	839	840
			834	841	854
<b>1 3 6 7 8 9 11 Cadena A</b>			108	114	115
			116	130	131
			132	167	196
			197	168	198
			199	200	231
			232	233	234
			235		
<b>1 3 4 7 8 9 12 cadena C</b>			454	456	457
			458	459	461
			462	465	466
			467	468	469
			470	471	472
			473	474	481
		482	491		

La Figura 1 Señala todas las interacciones que se tiene en 6X2B con el compuesto H7R, el mapa que se describe señala otro sitio de gran interés para el estudio de interacciones, en concreto, se encuentra en el dominio NTD la proteína Spike, cercano a dos sitios de glicosilación.

Pero además se muestran todas las interacciones que se tienen en la estructura abierta que fue la conformación con las interacciones más dispersas en los 100 acoplamiento independiente tanto para H7R(rojo) como para N7G(naranja)

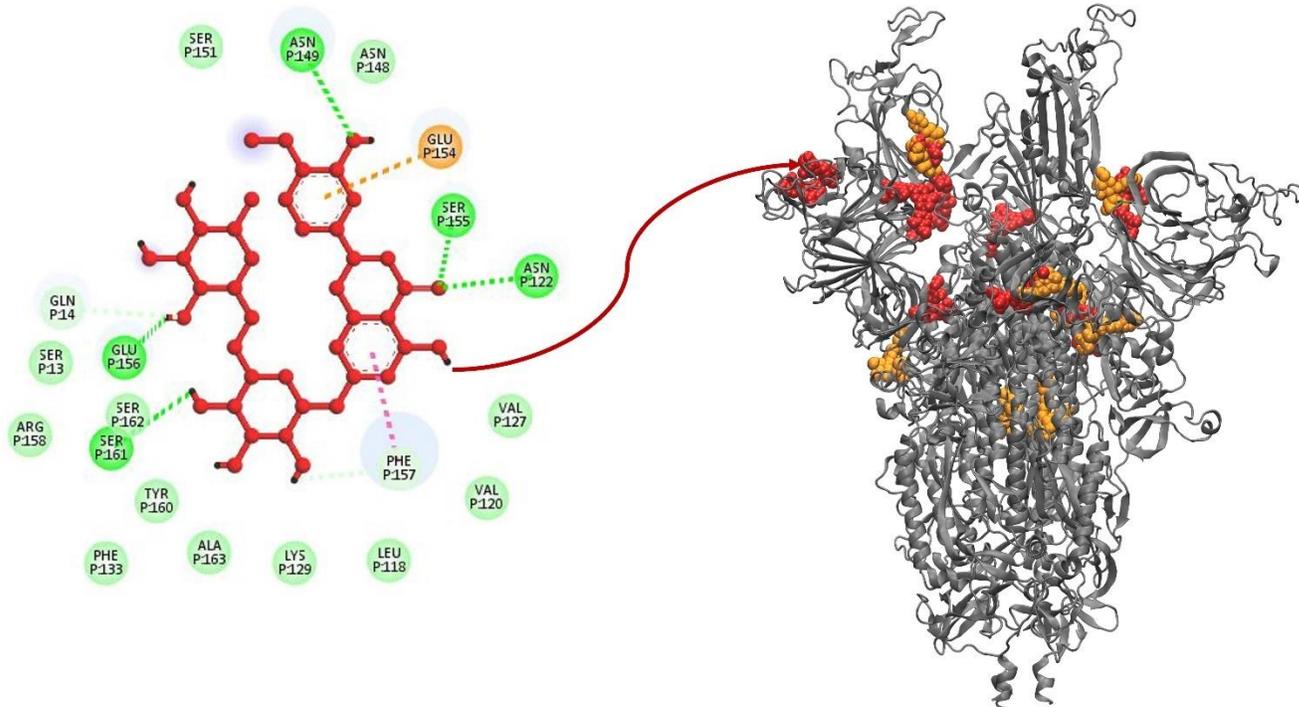
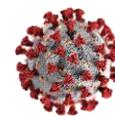


Figura 23 Todas las interacciones presentes en la estructura abierta de la proteína, interactuando con N7G(naranja) y H7R(rojo).

Existen interacciones como se les menciono anteriormente que podrían estar interfiriendo en el empaquetamiento de la conformación de profusión. La Figura 2 señala el alcance que tiene N7G para lograr penetrar a la estructura y poder establecer interacciones electroestáticas justo en el centro de la proteína, dentro de la subunidad S2

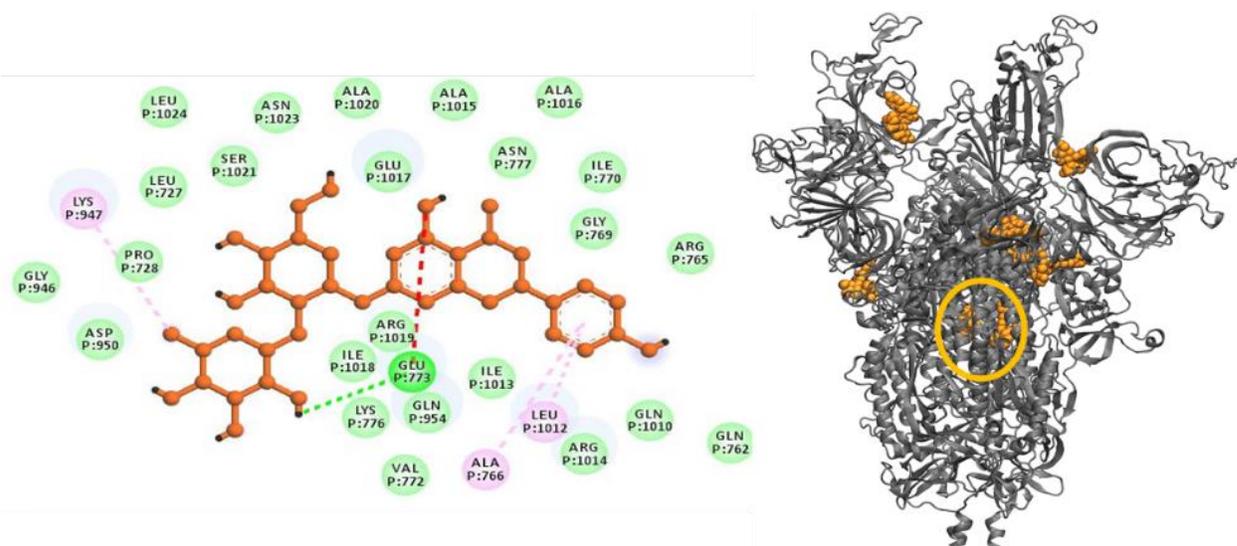
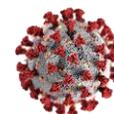


Figura 24 Interacciones de N7G en la subunidad S2



### Energías de finidas de los clústers más poblados

Si bien en la tesis se menciona y se analiza solo el de la proteína Spike silvestre en comparación con la proteína Spike de Ómicron. También se obtuvieron las energías de afinidad promedio de las 14 variantes restantes en las 3 conformaciones de estudio.

*Tabla 19 Energías de afinidad de la conformación cerrada en acoplamiento con H7R junto con el porcentaje de análisis y la desviación estándar.*

variante	$\delta v_{xx-H7R}$			
	%	Energía kcal mol <sup>-1</sup>	%	Energía kcal mol <sup>-1</sup>
v0	35	-10.057±0.224	35	-10.240±0.246
v1	48	-9.971±0.169	27	-10.315±0.479
v2	53	-10.060±0.28	22	-10.423±0.414
v3	58	-9.886±0.265	16	-10.169±0.372
v4	59	-10.124±0.222	24	-10.575±0.344
v5	46	-10.100±0.19	28	-10.361±0.485
v6	22	-9.923±0.22	50	-10.338±0.309
v7	47	-10.074±0.152	24	-10.246±0.236
v8	25	-9.956±0.112	50	-10.272±0.463
v9	38	-9.500±0.343	20	-10.300±0.765
v10	42	-10.171±0.212	28	-10.096±0.443
v11	27	-9.978±0.125	42	-10.429±0.442
v12	21	-9.905±0.25	43	-10.386±0.404
v13	47	-9.994±0.223	28	-10.464±0.26
v14	24	-10.104±0.1	42	-10.333±0.462
v15	44	-10.470±0.189	13	-10.669±0.214

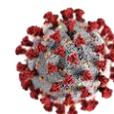
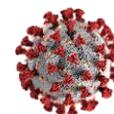


Tabla 20 Energías de afinidad de la conformación semiabierta en acoplamiento con H7R junto con el porcentaje de análisis y la desviación estándar.

<i>6vsb-H7R</i>				
<i>variante</i>	%	Energía kcal mol <sup>-1</sup>	%	Energía kcal mol <sup>-1</sup>
<i>v0</i>	34	-9.565±0.267	14	-11.443±0.855
<i>v1</i>	32	-9.747±0.319	8	-10.538±0.614
<i>v2</i>	36	-9.878±0.372	19	-10.047±0.308
<i>v3</i>	22	-9.800±0.247	21	-10.071±0.416
<i>v4</i>	43	-9.714±0.314	8	-9.750±0.334
<i>v5</i>	23	-9.683±0.305	10	-10.120±0.374
<i>v6</i>	24	-9.654±0.232	4	-9.750±0.129
<i>v7</i>	29	-9.679±0.161	11	-9.755±0.093
<i>v8</i>	27	-9.496±0.255	6	-10.633±0.446
<i>v9</i>	33	-9.736±0.4	4	-10.725±0.35
<i>v10</i>	33	-9.673±0.271	7	-9.843±0.496
<i>v11</i>	27	-9.800±0.4	20	-9.925±0.428
<i>v12</i>	29	-9.762±0.311	13	-10.062±0.427
<i>v13</i>	40	-9.555±0.319	15	-10.233±0.358
<i>v14</i>	34	-9.585±0.226	23	-9.896±0.435
<i>v15</i>	28	-9.729±0.186	8	-11.163 ±0.637

Tabla 21 Energías de afinidad de la conformación abierta en acoplamiento con H7R junto con el porcentaje de análisis y la desviación estándar

<i>6x2b-H7R</i>				
<i>variante</i>	%	Energía kcal mol <sup>-1</sup>	%	Energía kcal mol <sup>-1</sup>
<i>v0</i>	16	-9.388±0.260	16	-10.494±0.423
<i>v1</i>	31	-9.619±0.277	14	-9.764±0.259
<i>v2</i>	28	-9.846±0.259	14	-10.036±0.405
<i>v3</i>	35	-9.854±0.321	9	-10.500±0.453
<i>v4</i>	22	-9.750±0.197	7	-9.800±0.321
<i>v5</i>	19	-9.732±0.192	21	-10.162±0.365
<i>v6</i>	17	-9.635±0.269	21	-9.971±0.463
<i>v7</i>	30	-9.650±0.348	7	-10.357±0.321
<i>v8</i>	24	-9.683±0.302	8	-11.038±0.521
<i>v9</i>	34	-9.694±0.209	12	-10.242±0.421
<i>v10</i>	31	-9.639±0.184	16	-9.994±0.493
<i>v11</i>	19	-9.811±0.423	13	-9.869±0.284



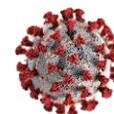
v12	45	-9.678±0.344	10	-10.110±0.264
v13	22	-9.459±0.189	20	-10.265±0.491
v14	41	-9.737±0.274	8	-10.213±0.155
v15	44	-9.664±0.191	9	-10.867± 0.973

Tabla 22 Energías de afinidad de la conformación cerrada en acoplamiento con N7G junto con el porcentaje de análisis y la desviación estándar.

<i>6vxx-N7G</i>				
<i>variante</i>	%	Energía kcal mol-1	%	Energía kcal mol-1
v0	9	-9.578±0.097	51	-9.794±0.325
v1	33	-9.527±0.199	24	-9.808±0.322
v2	72	-10.097±0.281	-	-
v3	71	-9.894±0.285	-	-
v4	27	-9.526±0.246	25	-10.060±0.459
v5	21	-9.581±0.0147	45	-9.984±0.499
v6	32	-9.709±0.178	32	-9.688±0.223
v7	18	-9.522±0.126	40	-9.768±0.292
v8	14	-9.643±0.29	48	-9.763±0.239
v9	23	-9.343±0.227	30	-9.243±0.307
v10	37	-9.519±0.161	20	-10.070±0.098
v11	29	-9.586±0.171	38	-9.766±0.302
v12	51	-9.657±0.203	25	-9.668±0.320
v13	27	-9.589±0.165	37	-9.859±0.328
v14	-	-	55	-9.755±0.267
v15	82	-10.1646±0.3105	-	-

Tabla 23 Energías de afinidad de la conformación semiabierta en acoplamiento con N7G junto con el porcentaje de análisis y la desviación estándar.

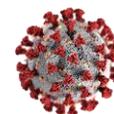
<i>6vsb-N7G</i>				
<i>variante</i>	%	Energía kcal mol-1	%	Energía kcal mol-1
v0	22	-8.995±0.15	25	-9.696±0.615
v1	11	-9.291±0.094	10	-10.400±0
v2	18	-9.117±0.151	12	-9.792±0.3
v3	40	-9.075±0.119	17	-10.182±0.326
v4	30	-9.033±0.183	14	-9.800±0.301
v5	22	-9.027±0.178	18	-10.128±0.244



v6	57	-9.156±0.182	12	-10.358±0.378
v7	29	-9.031±0.093	20	-9.975±0.34
v8	22	-9.009±0.316	11	-10.327±0.185
v9	23	-9.052±0.141	10	-9.650±0.357
v10	28	-9.075±0.192	20	-10.020±0.41
v11	37	-9.038±0.159	13	-10.100±0.443
v12	-	-	18	-9.978±0.286
v13	23	-9.030±0.155	16	-10.369±0.285
v14	7	-8.986±0.038	17	-10.347±0.4370
v15	8	-8.963±0.151	19	-9.684±0.263

Tabla 24 Energías de afinidad de la conformación abierta en acoplamiento con N7G junto con el porcentaje de análisis y la desviación estándar.

variante	6x2b-N7G			
	%	Energía kcal mol-1	%	Energía kcal mol-1
v0	10	-8.960±0.052	20	-10.190±0.148
v1	17	-9.047±0.224	8	-9.977±0.315
v2	14	-9.014±0.095	26	-10.035±0.123
v3	32	-9.000±0.122	17	-9.906±0.216
v4	13	-9.038±0.15	24	-10.104±0.168
v5	22	-9.068±0.117	22	-9.982±0.284
v6	28	-8.989±0.11	21	-10.010±0.212
v7	18	-9.100±0.188	19	-10.084±0.192
v8	13	-8.900±0.122	24	-9.963±0.262
v9	25	-9.056±0.136	20	-9.915±0.325
v10	21	-9.086±0.248	27	-9.996±0.189
v11	29	-9.021±0.161	23	-9.883±0.
v12	8	-9.038±0.27	25	-10.040±0.
v13	7	-8.914±0.069	20	-9.920±0.
v14	8	-8.900±0.076	31	-9.848±0.
v15	18	-8.961±0.05	25	-9.408±0.37



Casa abierta al tiempo  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

## ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00296  
Matrícula: 2202800479

Acoplamiento molecular de metabolitos secundarios que potencialmente inhiben las conformaciones activas de la proteína Spike del virus SARS-CoV-2.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 16 del mes de agosto del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ  
DR. CARLOS CABELLO GUTIERREZ  
DR. ULISES CARRASCO NAVARRO  
DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

DE: SUSANA REGINA CASTRO JIMENEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

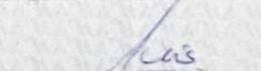


SUSANA REGINA CASTRO JIMENEZ  
ALUMNA

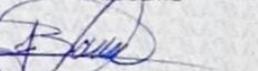
REVISÓ  


MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

  
DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

  
DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ

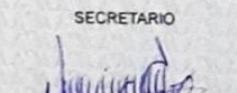
VOCAL

  
DR. CARLOS CABELLO GUTIERREZ

VOCAL

  
DR. ULISES CARRASCO NAVARRO

SECRETARIO

  
DR. OCTAVIO LOERA CORRAL