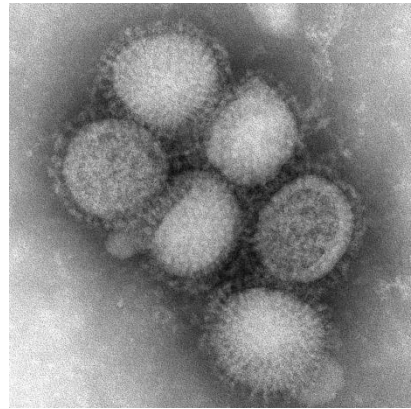


# DOCKING MOLECULAR EN LAS PROTEÍNAS PB1, PB2 Y PA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A (H1N1) A PARTIR DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS REPORTADAS EN SURAMÉRICA DURANTE EL PERIODO 2000 A 2017.



Presentado por:

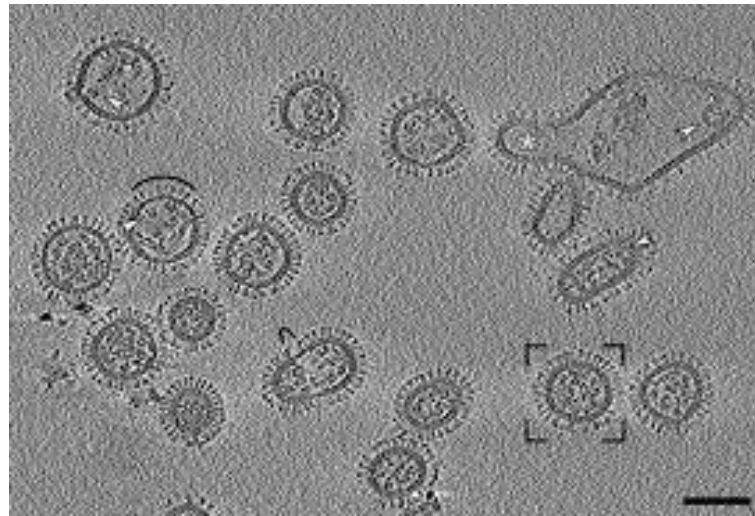
Jairo Andrés Ayala García

Paula Andrea Malagón Osorio

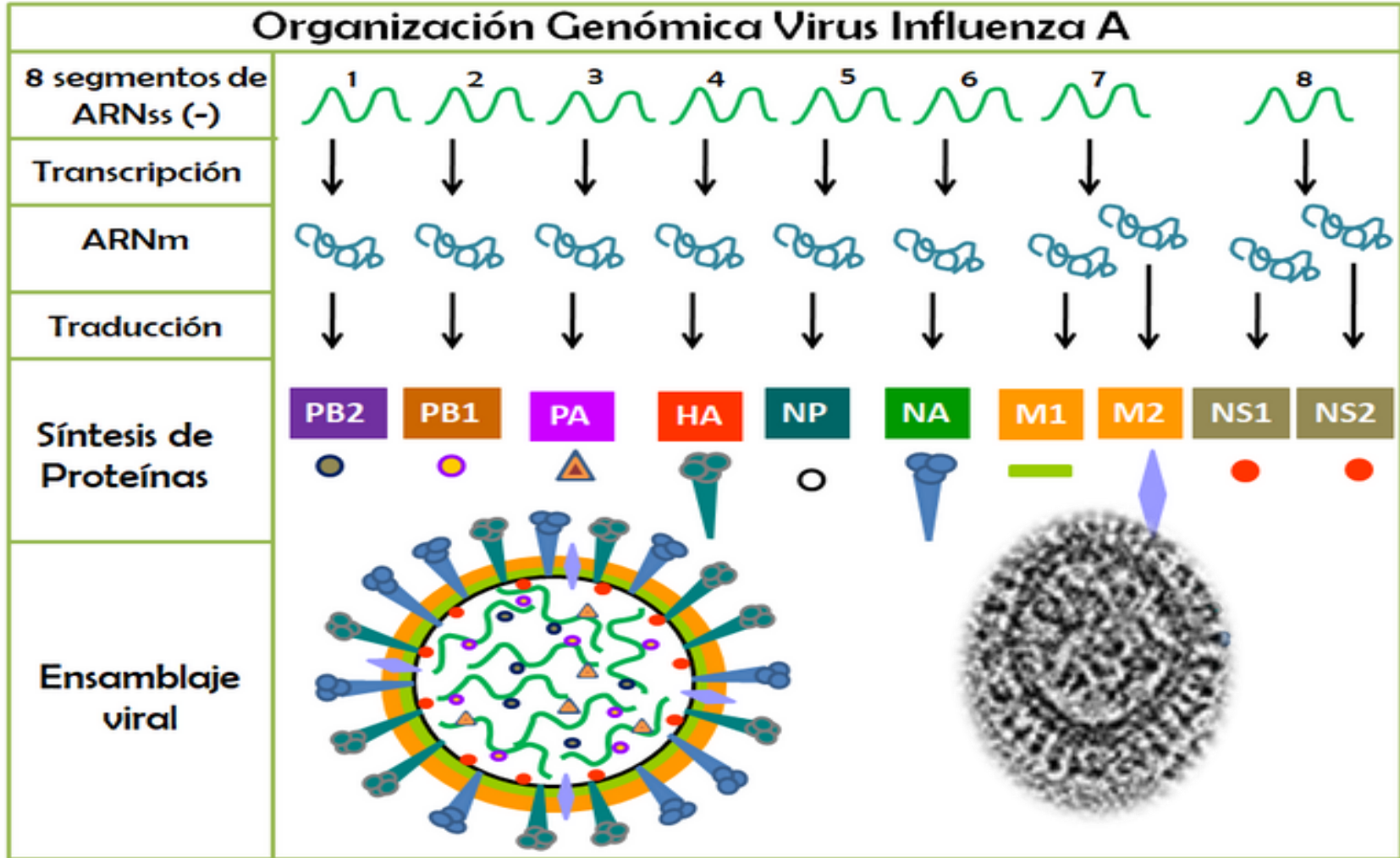


# VIRUS DE LA INFLUENZA A (H1N1)

- Grupo Baltimore: V
- Orden: Mononegavirales
- Familia: *Orthomyxoviridae*
- Género: Influenza virus A
- Presenta nucleocápside y membrana lipídica



# VIRUS DE LA INFLUENZA A



# EPIDEMIOLOGIA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A (H1N1) EN SURAMERICA EN 2018



La circulación se define como: número de casos con resultados del laboratorio positivos para los agentes respiratorios vigilados dividido por el Total de casos de ESI – IRAG notificados en un periodo epidemiológico.



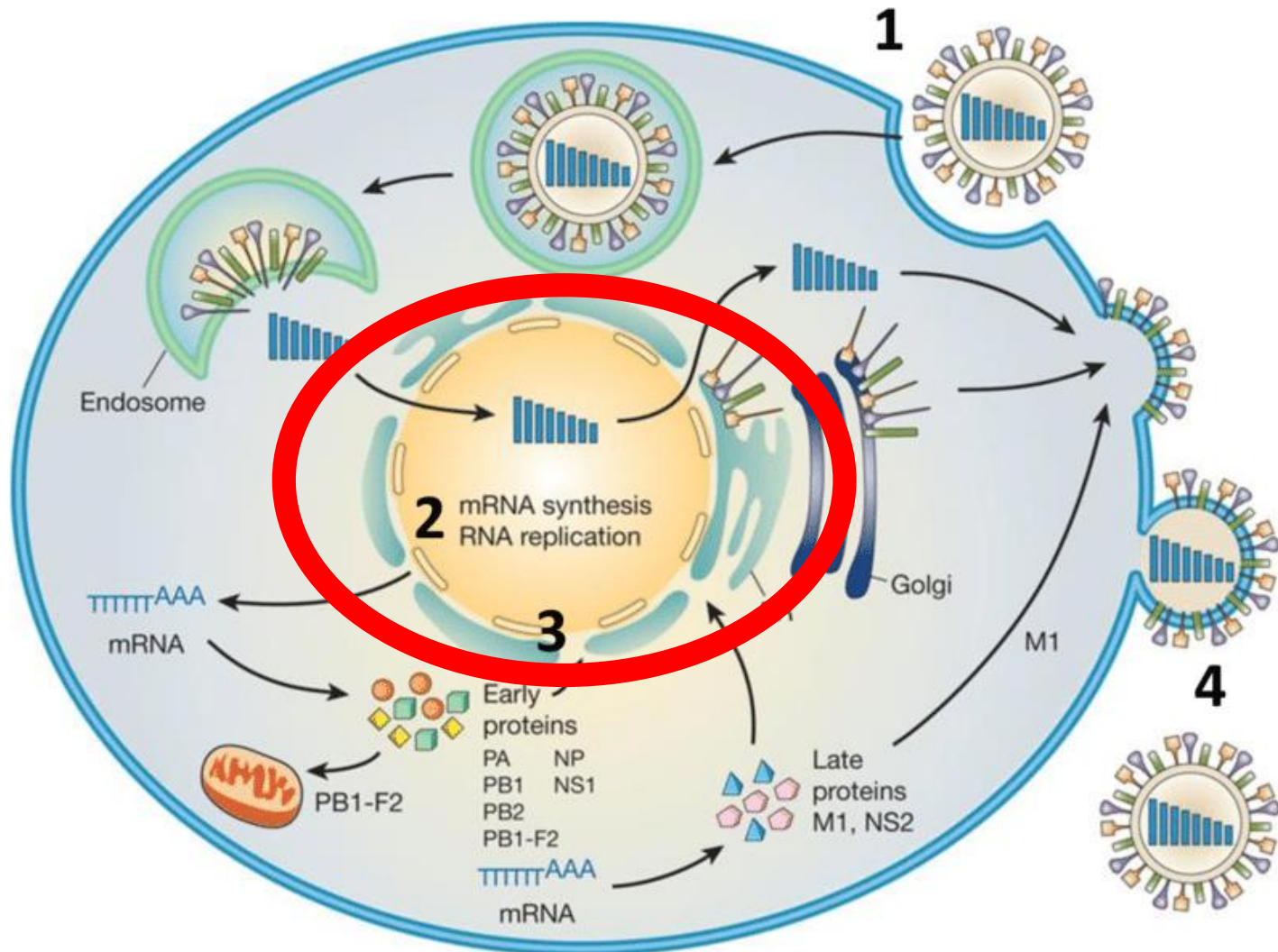
# VIRUS DE LA INFLUENZA A H1N1 EN COLOMBIA EN 2018

Casos de infección respiratoria aguda con resultado positivo para influenza A(H1N1) según grupo de edad y condición final, Colombia, semanas epidemiológicas 01 a 24, 2018

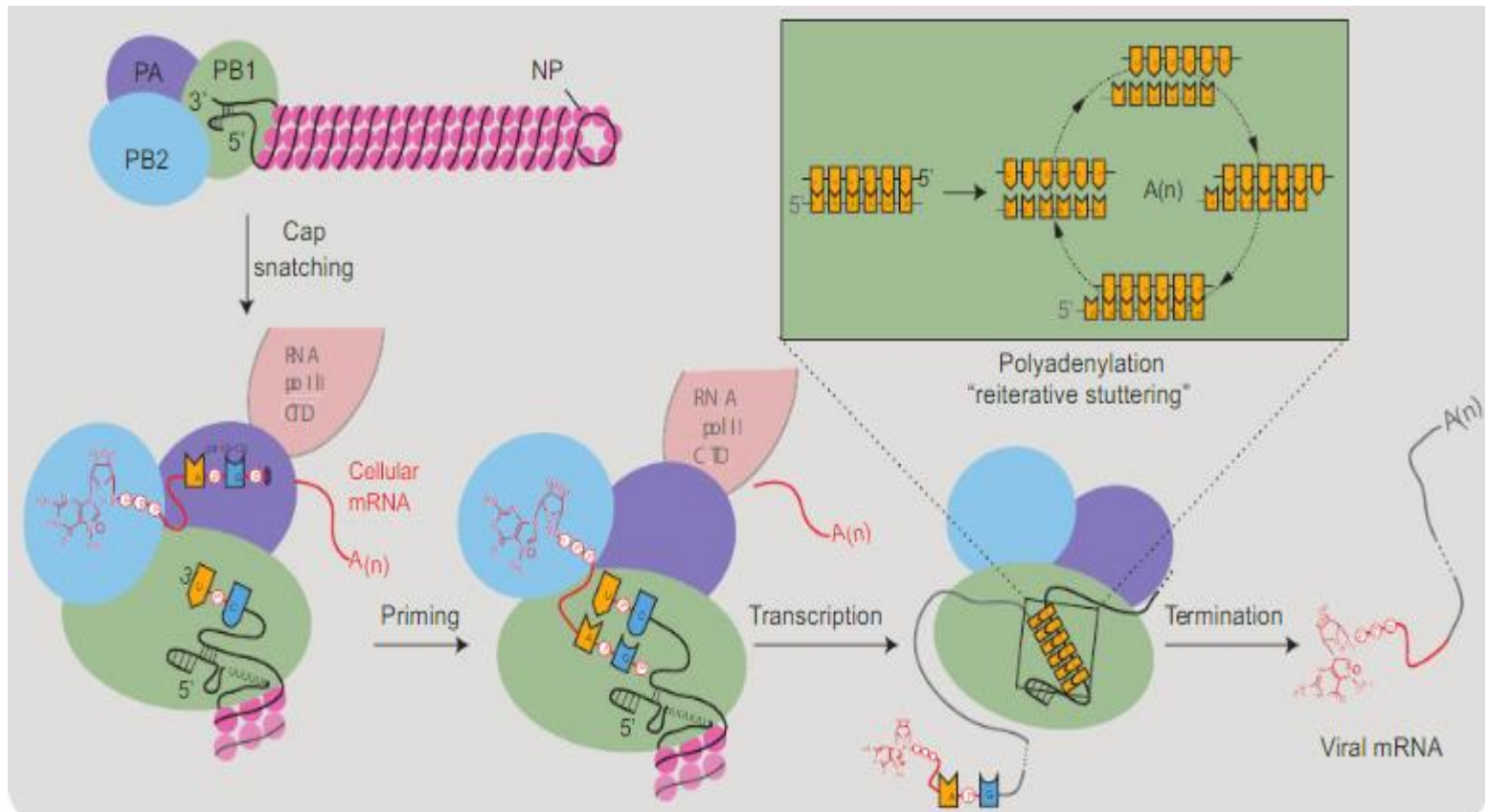


- Grupos de riesgo: Adultos mayores, niños y personas con inmunosupresión o con enfermedades crónicas.
- 48 defunciones con resultado positivo para influenza A (H1N1), de las cuales el 73 % pertenecían a población de riesgo

# REPLICACIÓN DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A



# ENZIMA ARN POLIMERASA DEPENDIENTE DE ARN (RdRp)



Proteínas PB1, PB2 y PA. Img tomada de:

[https://www.researchgate.net/publication/326508891\\_Influenza\\_A\\_Virus\\_Cell\\_Entry\\_Replication\\_Virion\\_Assembly\\_and\\_Movement](https://www.researchgate.net/publication/326508891_Influenza_A_Virus_Cell_Entry_Replication_Virion_Assembly_and_Movement)

# OBJETIVOS

- **OBJETIVO GENERAL :** Generar un acoplamiento molecular en la enzima RdRp del virus de la Influenza A (H1N1) a partir del análisis bioinformático de secuencias de aminoácidos de las proteínas PB1, PB2 y PA, reportadas en la base de datos del NCBI en Suramérica entre el periodo 2000 a 2017.





# OBJETIVOS

- **Objetivos específicos**

**1**

Identificar las regiones genómicas conservadas de las proteínas PBI, PB2 y PA del virus de la Influenza A (H1N1) por medio de herramientas bioinformáticas.

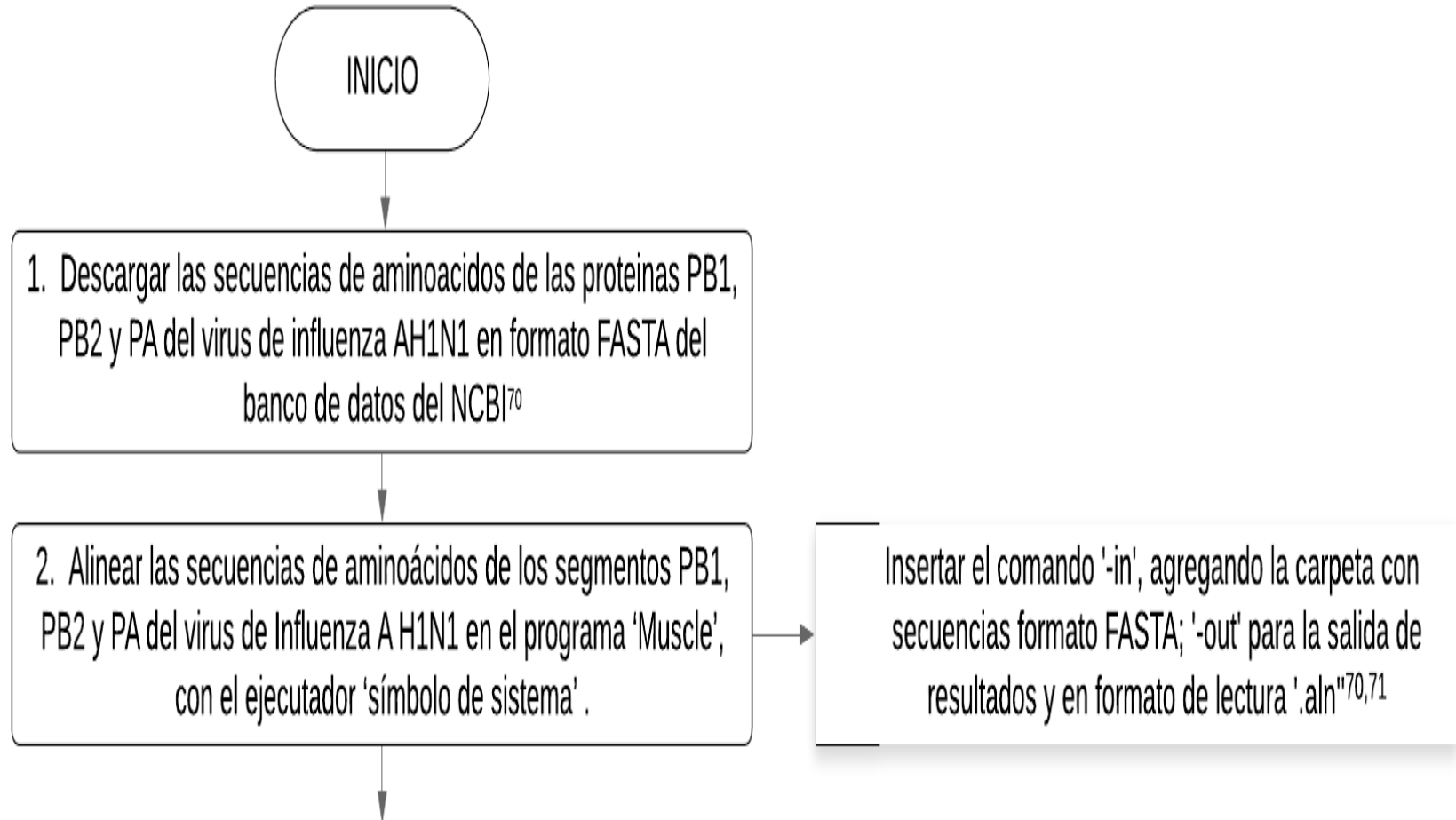
**2**

Determinar ligandos que permitan la interacción en las secuencias de aminoácidos conservadas de las proteínas PBI, PB2 y PA del virus de la influenza A (H1N1).

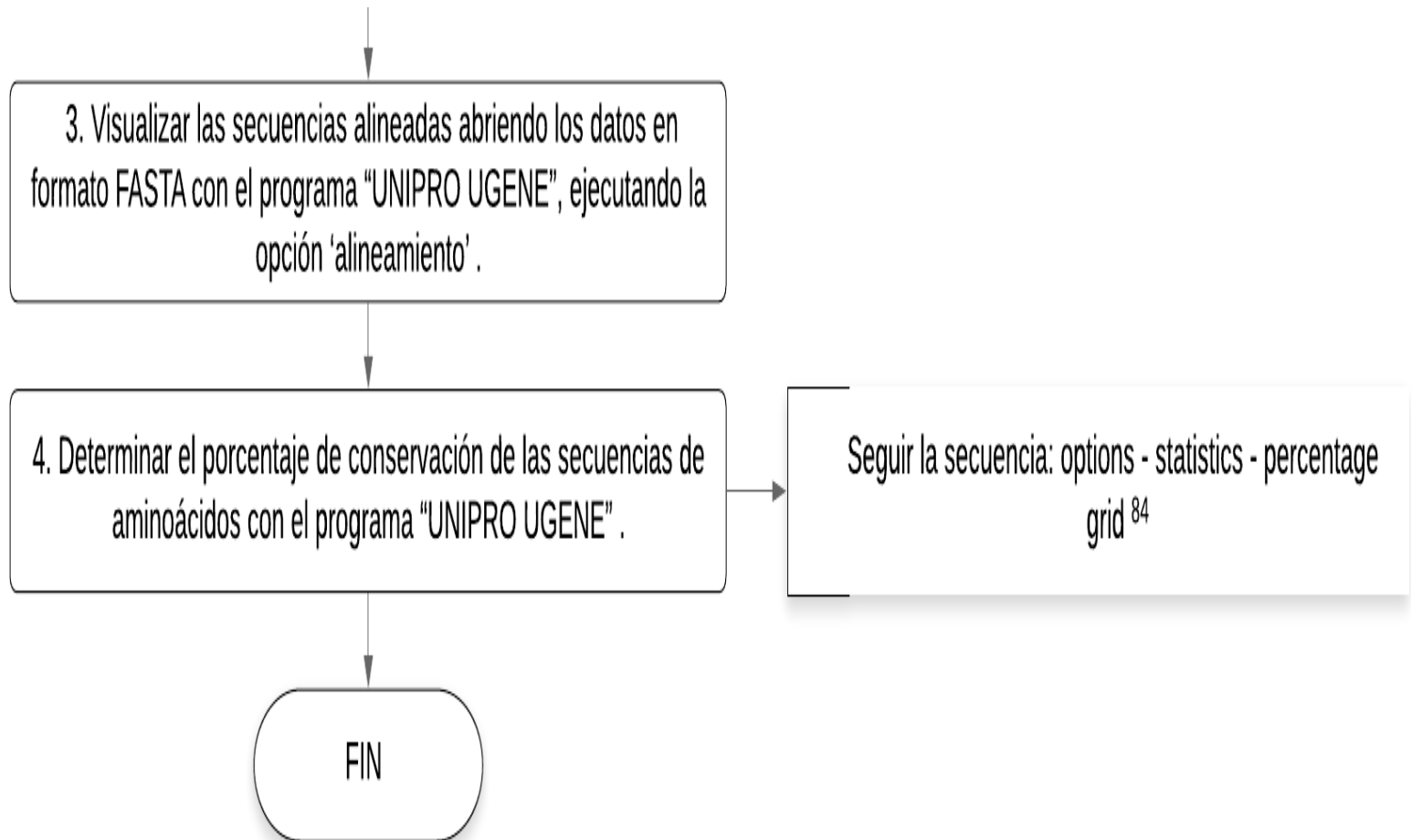
**3**

Establecer las interacciones entre las moléculas ligando y los residuos de aminoácidos de las proteínas PBI, PB2 y PA del virus de la Influenza A (H1N1).

# PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A (H1N1)

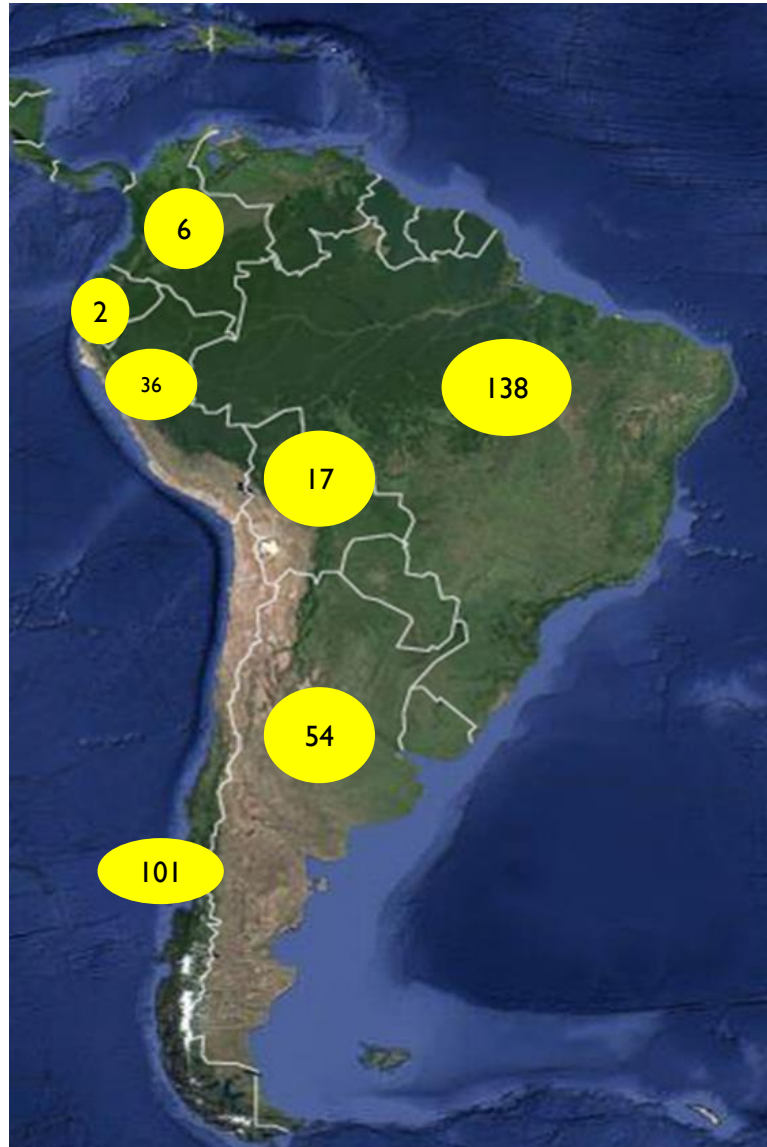


# PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A (H1N1)



# RESULTADOS

- 354 secuencias de obtenidas de 7 países.





# RESULTADOS

## I. Alineación múltiple de aminoácidos



## 2. Porcentaje de conservación de aminoácidos

	1	2	3	4	5	6
M	D	V	N	P	T	
M	D	V	N	P	T	
M	D	V	N	P	T	
M	D	V	N	P	T	
M	D	V	N	P	T	

100%

	1	2	3	4	5	6
M	D	V	N	N	T	
M	D	P	N	N	T	
M	D	P	N	P	T	
M	D	P	N	P	T	
M	D	P	N	P	T	

85%

55%

# RESULTADOS

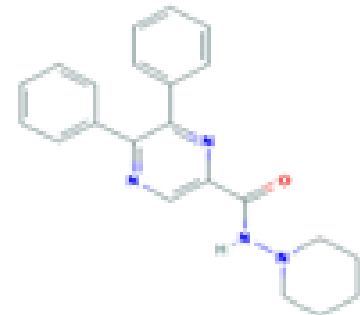
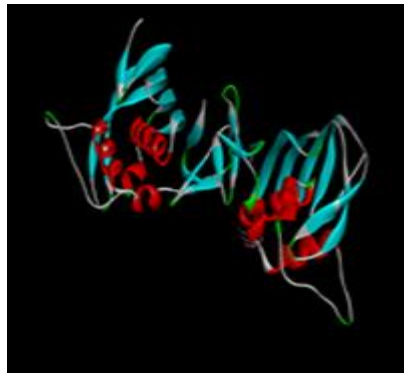
- Porcentaje total de conservación y variabilidad de las proteínas PB1, PB2 y PA del virus de la Influenza A (H1N1)

PROTEÍNA	NUMERO DE SECUENCIAS ANALIZADAS	LONGITUD	NÚMERO Y PORCENTAJE DE SECUENCIAS ALTAMENTE CONSERVADAS	NUMERO Y PORCENTAJE DE SECUENCIAS CONSERVADAS	NÚMERO Y PORCENTAJE DE SECUENCIAS VARIABLES	NÚMERO Y PORCENTAJE DE SECUENCIAS ALTAMENTE VARIABLES
PB1	354	757 aminoácidos	723 (95,5%)	30 (3,96%)	4 (0,69%)	0 (0%)
PB2	355	759 aminoácidos	713 (93,9%)	39 (5,13%)	5 (0,65%)	2 (0,26%)
PA	361	716 aminoácidos	688 (96,0%)	25 (3,49%)	3 (0,41%)	0 (0%)

# BIONFORMATICA ESTRUCTURAL

La bioinformática estructural la cual permite el análisis, la caracterización y la visualización de estructuras proteicas y químicas además de poder identificar y estudiar de sus interacciones mediante técnicas computacionales

El docking es una búsqueda virtual de moléculas capaces de unirse a la estructura receptora o proteína blanco, esperando que esta unión tenga un efecto de inhibición o bloqueo



# PROCEDIMIENTOS DOCKING MOLECULAR EN LA PROTEINA RdRp DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A (H1N1)

Se realiza la búsqueda de ligandos con el filtro de “derivado de pirazinacarboxamida” y “derivado de ribofuranosiltrifosfato”

PubChem

Acerca de

Blog

Enviar

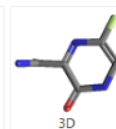
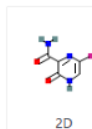
Contacto

RESUMEN COMPUESTO

## Favipiravir

PubChem CID : 492405

Estructura:



[Encontrar estructuras similares](#)

Fórmula Molecular :  $C_5H_4FN_3O_2$

Nombres químicos :

Favipiravir  
259793-96-9  
6-FLUORO-3-HIDROXIPIRAZINA-2-CARBOXAMIDA  
T-705  
6-fluoro-3-oxo-3,4-dihidropirazina-2-carboxamida

[Más...](#)



# SELECCIÓN DE LIGANDO PARA LA ENZIMA RdRp DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A (H1N1)

Los estudios experimentales indican que este fármaco actúa en las primeras fases de la replicación viral, inhibiendo la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp)

**FAVIPIRAVIR: Derivado de pirazinacarboxamida**

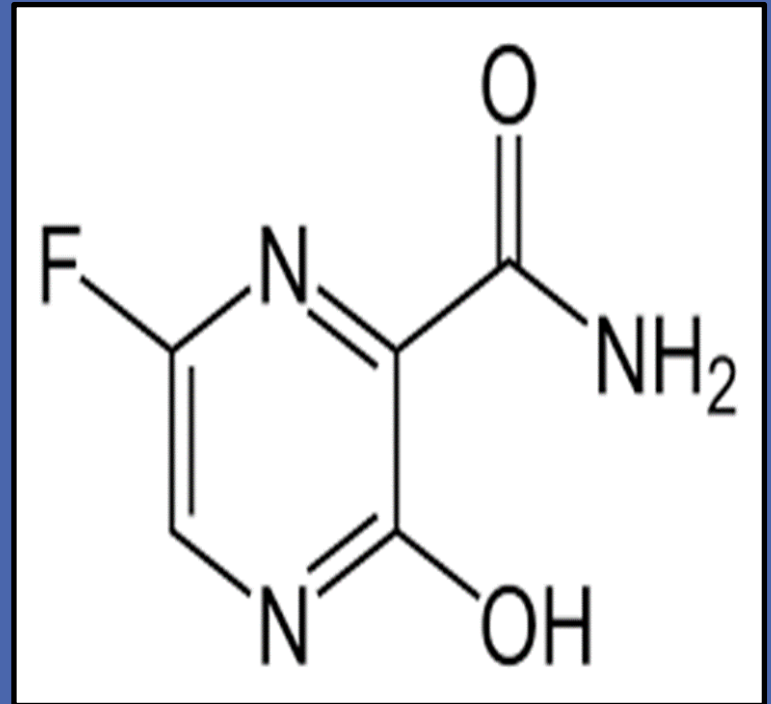
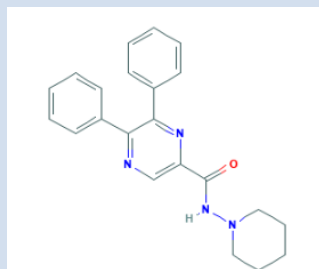


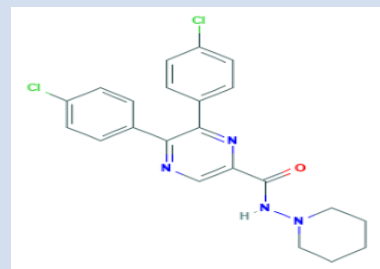
Imagen pirazina carboxamida tomada de Favipiravir, un nuevo concepto de fármaco antiviral frente a los virus gripales, Rev Quimioter

# RESULTADOS

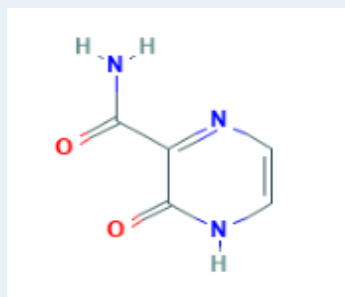
## MOLÉCULAS LIGANDO



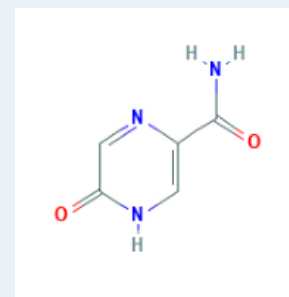
5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida



5,6-bis (4-clorofenil) - N -piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida



2-oxo- 1H -pirazina-3-carboxamida



6-oxo- 1H -pirazina-3-carboxamida

# SELECCIÓN DE LIGANDO PARA LA ENZIMA RdRp DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A (H1N1)

Se debe considerar las modificaciones moleculares intracelulares que se conocen del antiviral.

**Conversión del pirazinacarboxamida por las quinasas celulares a ribofuranosiltrifosfato**

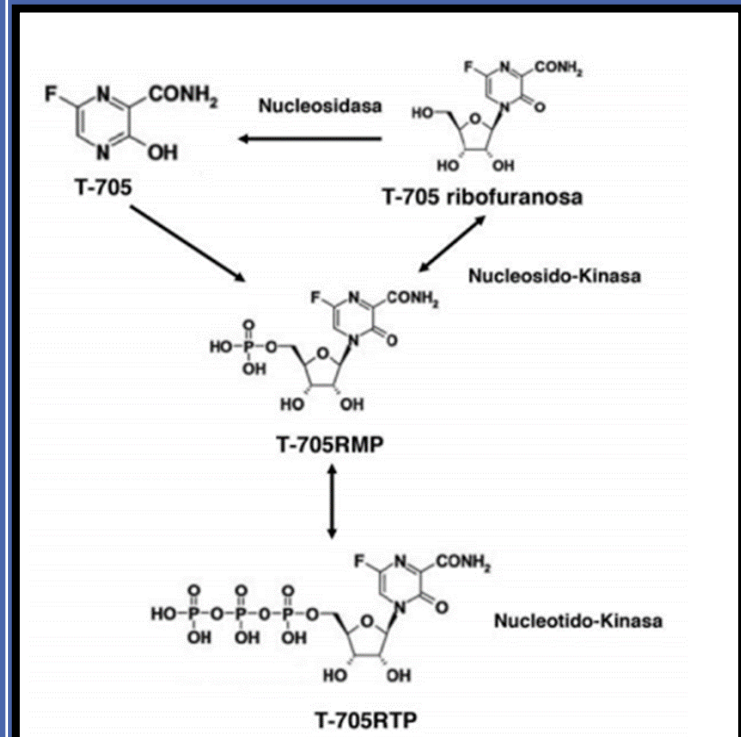
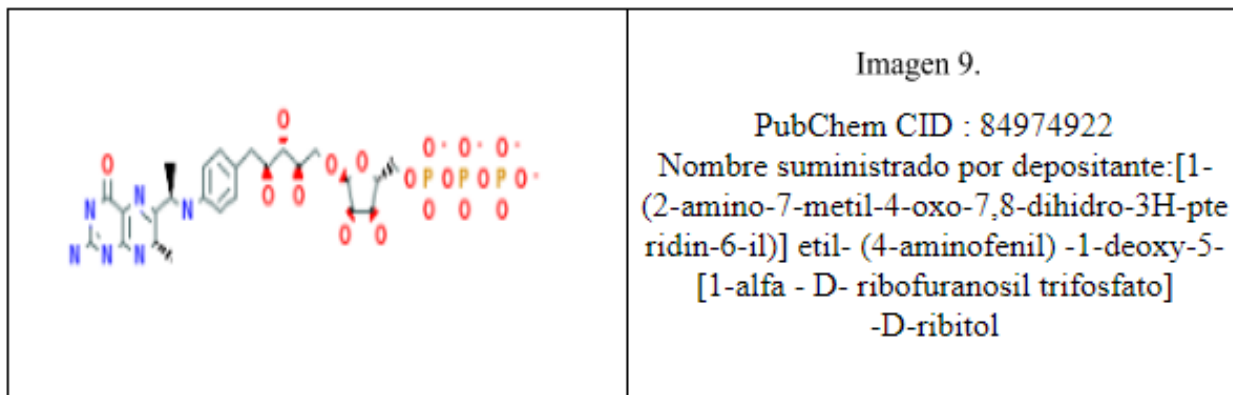


Imagen Ribofuranosiltrifosfato tomada de: Favipiravir, un nuevo concepto de fármaco antiviral frente a los virus gripales, Rev Quimioter

# SELECCIÓN DE MOLECULAS LIGANDO EN LA BASE DE DATOS PUBCHEM

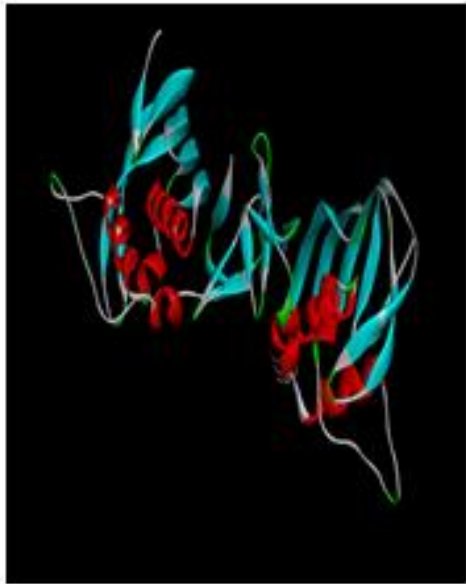
Potencia molécula ligando posterior a la búsqueda con el filtro de « derivado de ribofuranosiltrifosfato »





# PROCEDIMIENTO PARA DOCKING MOLECULAR EN LA ENZIMA RdRp DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A (H1N1)

I. Descargar las proteínas '4J2R' , '5DES' y '2ZTT' del banco de datos de proteínas del portal de investigación colaborativa para bioinformática estructural (RCSB).



**4J2R / PB2**



**5DES / PA**



**2ZTT / PBI-PB2**

\*A estas proteínas se les realizó un alineamiento múltiple para demostrar su conservación

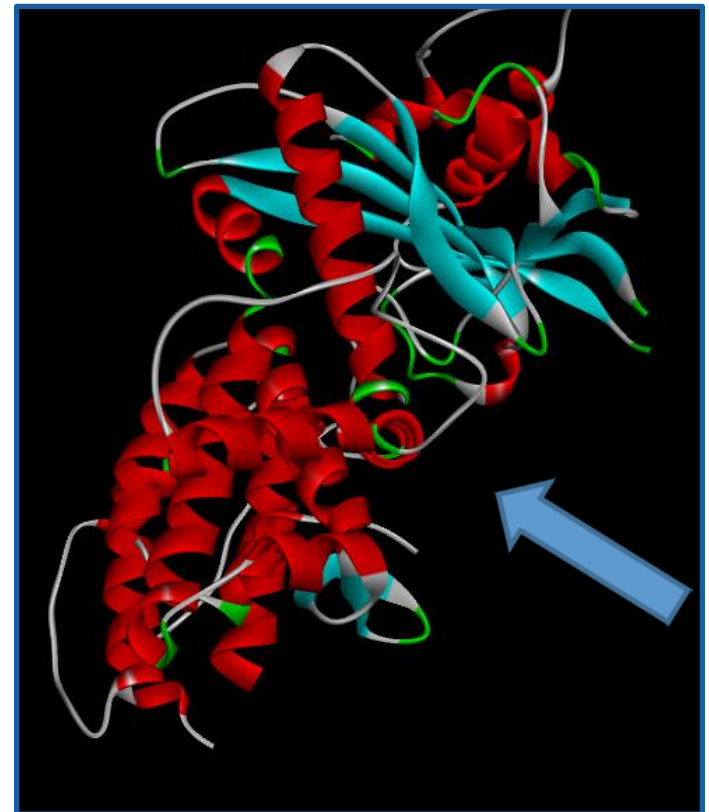
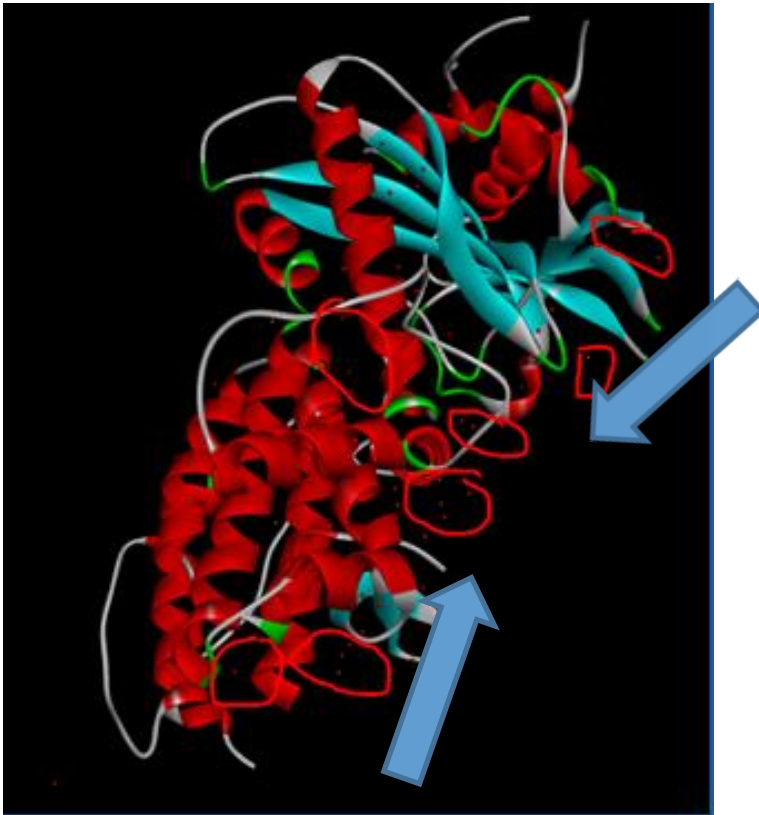
# RESULTADOS

I. Porcentaje total de conservación y variabilidad de las proteínas 2ZTT / PB1-PB2, 4J2R / PB2 y 5des / PA.

PROTEÍNA CRISTALIZADA	NUMERO DE SECUENCIAS ANALIZADAS	NUMERO Y PORCENTAJE DE SECUENCIAS ALTAMENTE CONSERVADAS	NÚMERO Y PORCENTAJE DE SECUENCIAS CONSERVADAS	NÚMERO Y PORCENTAJE DE SECUENCIAS VARIABLES
2ZTT / PB1-PB2	93	78 (93,6%)	5 (6,4%)	-
4J2R / PB2	186	173 (92,6%)	11 (6,3%)	2 (1,1%)
5des / PA	199	191 (96,0%)	8 (4,0%)	-

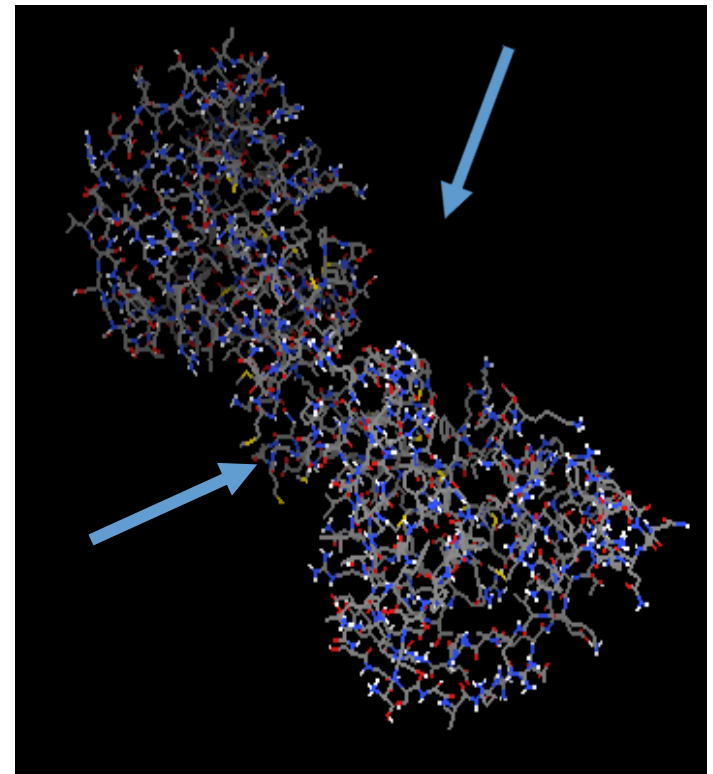
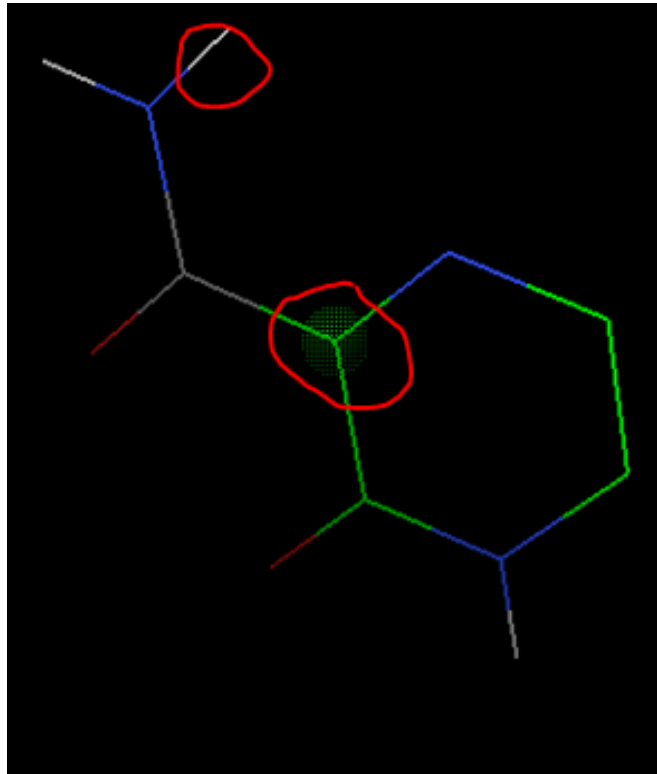
# PROCEDIMIENTOS DOCKING MOLECULAR EN LA PROTEINA RDRP DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A (H1N1)

2. Comprobar la calidad de las estructuras por medio del programa Discovery Studio Visualizer para la corrección de errores como átomos faltantes, moléculas de agua agregadas, ruptura de cadenas, ubicaciones alternativas o moléculas adicionales



# PROCEDIMIENTOS DOCKING MOLECULAR EN LA PROTEINA RDRP DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A (H1N1)

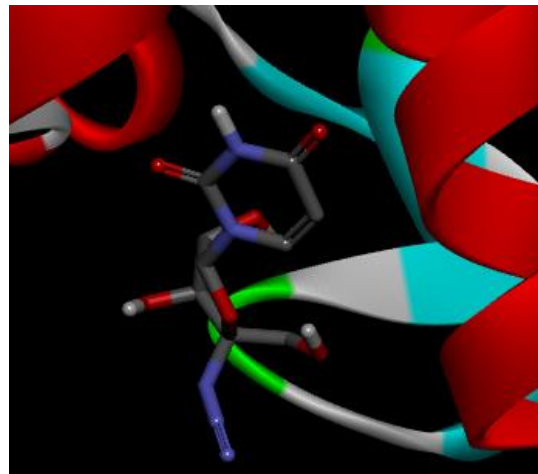
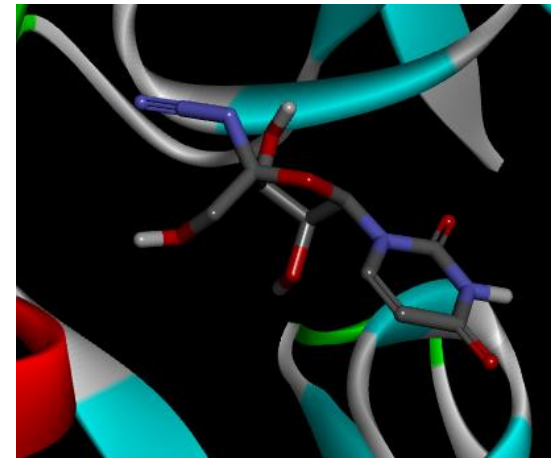
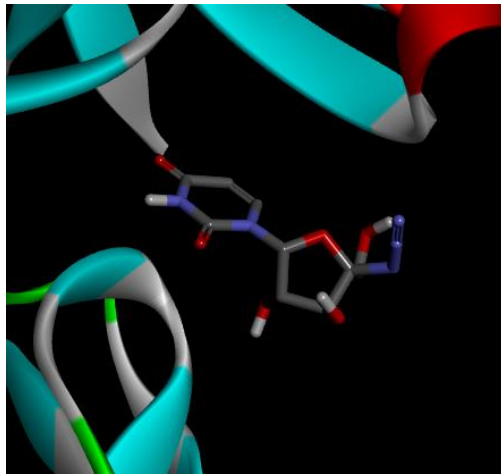
3. Adecuar el receptor por medio de la adhesión de hidrógenos con el programa AutoDock Tools; guardandolo en formato '.pdbqt'






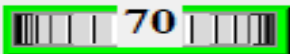
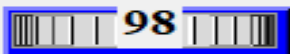
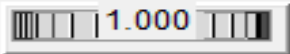
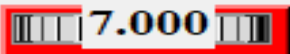
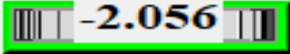

# RESULTADOS DEL DOCKING MOLECULAR

Representación de la torsión del ligando en el receptor



# PROCEDIMIENTOS DOCKING MOLECULAR EN LA PROTEINA RDRP DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A (H1N1)

4. Realizar la caja de cuadrícula, para conocer las dimensiones donde se realizara el acoplamiento

File	Center	View	Help
<b>Current Total Grid Pts per map: 653697</b>			
<b>number of points in x-dimension:</b>			
 92			
<b>number of points in y-dimension:</b>			
 70			
<b>number of points in z-dimension:</b>			
 98			
<b>Spacing (angstrom):</b>			
 1.000			
<b>Center Grid Box:</b>			
<offset>			
x center:	<input type="text" value="51.768"/>	 7.000	
y center:	<input type="text" value="-43.746"/>	 -2.056	
z center:	<input type="text" value="-18.611"/>		

# TIPOS DE ENLACE

## Enlace covalente

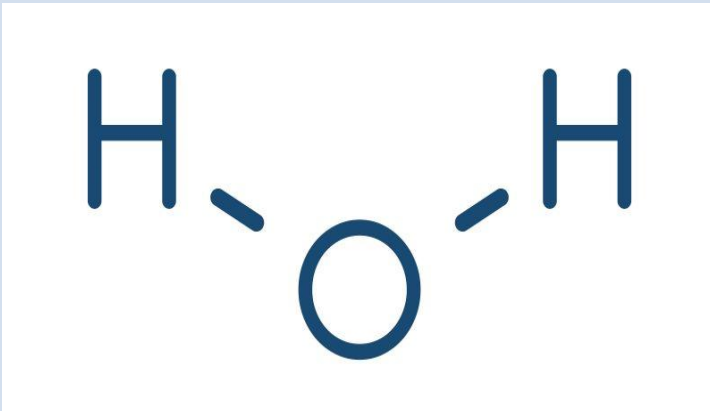


Imagen disponible en : [www.concepto.de/enlace-ionico](http://www.concepto.de/enlace-ionico)

## Enlace iónico

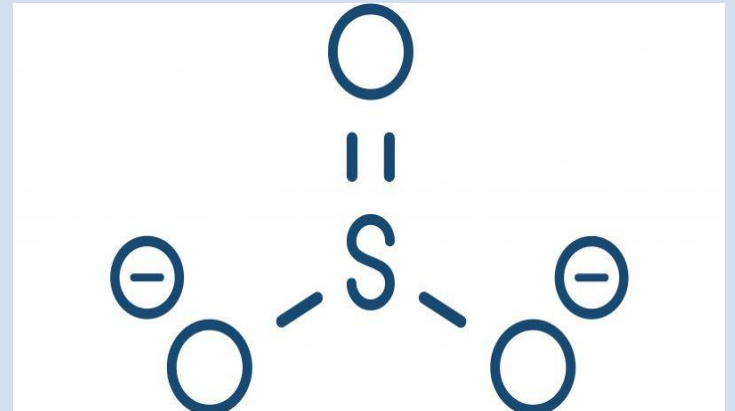


Imagen disponible en : <https://concepto.de/enlace-covalente/>

# TIPOS DE ENLACE

## Enlace metálico

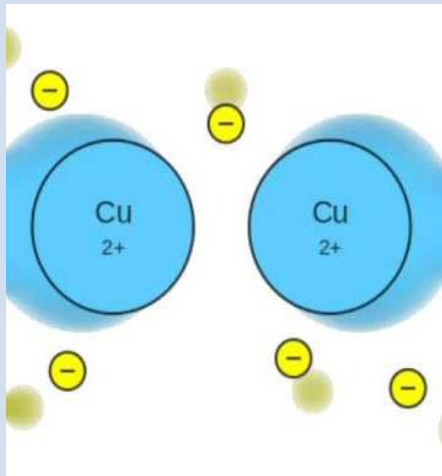


Imagen disponible en:  
[www.youtube.com/watch?v=VEisFrWc0G0](http://www.youtube.com/watch?v=VEisFrWc0G0)

## Enlace por fuerzas de Van der Waals

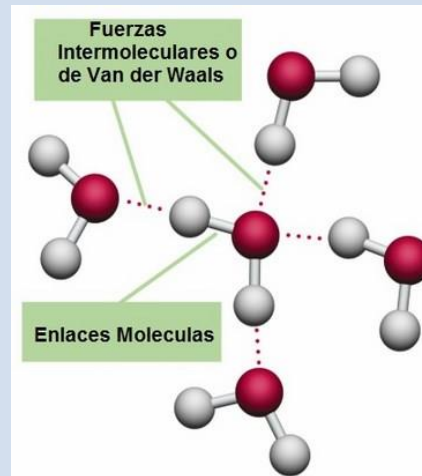


Imagen disponible en: [www.areaciencias.com](http://www.areaciencias.com)

## Enlace de hidrógeno o por puente de hidrógeno

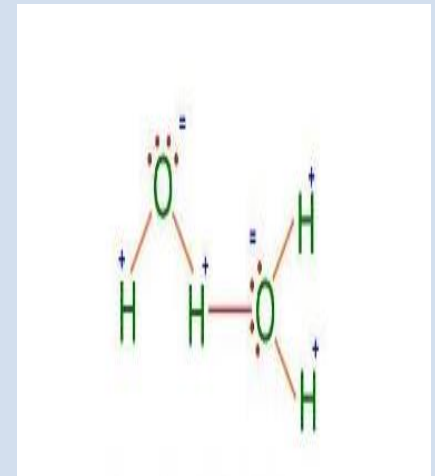
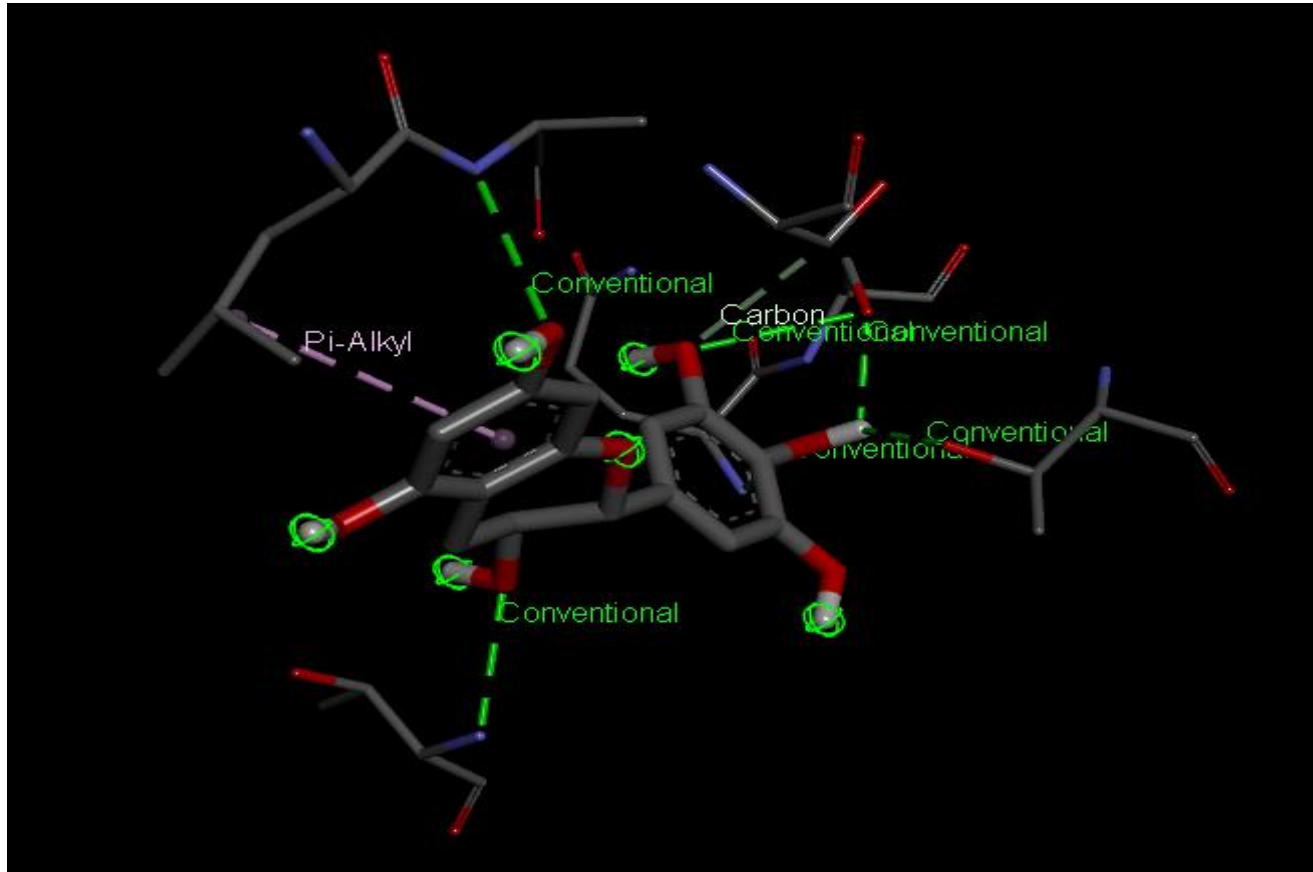


Imagen disponible en: [quodo.wordpress.com](http://quodo.wordpress.com)

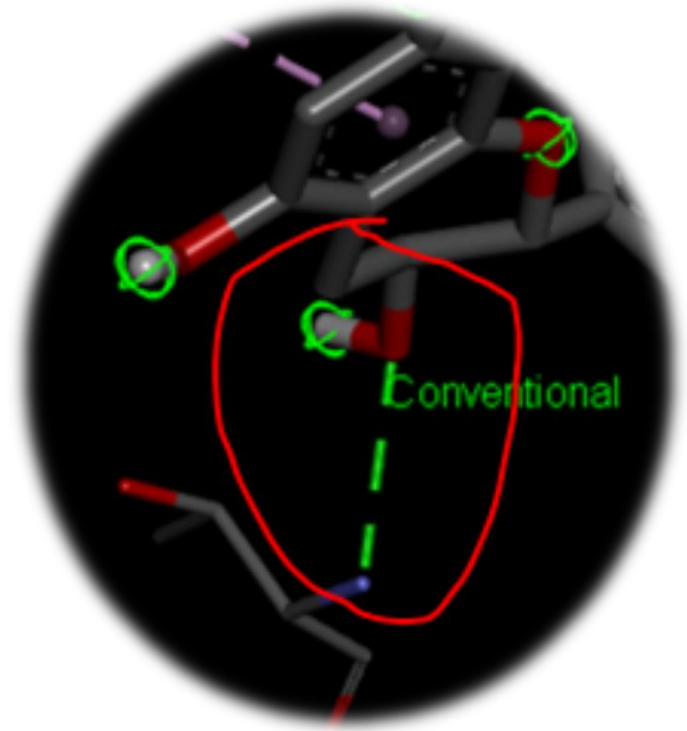
# RESULTADOS



Acercamiento de las interacciones entre ligando-Receptor en programa Unipro UGENE

# AFINIDAD

Esta es definida como la fuerza de la interacción entre dos moléculas que se unen de forma reversible, representada en la energía libre de Gibbs de un ligando con un receptor, que se representa proporcionalmente en números negativos y en las unidades kilocalorias/mol (kcal/mol).





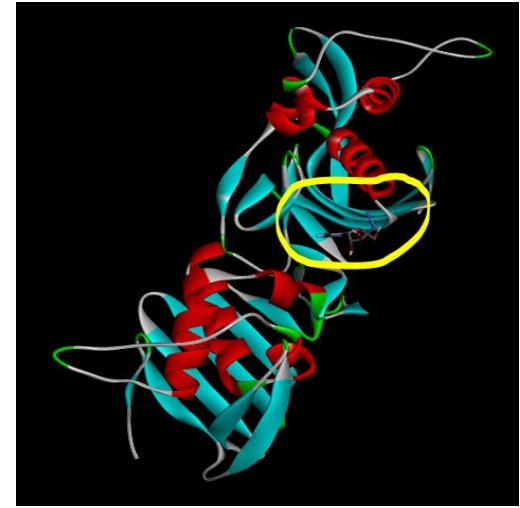
# RESULTADOS DEL ACOPLAMIENTO MOLECULAR

LIGANDO	AFINIDAD	RECEPTOR
 <p>5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida</p>	-8.0kcal/mol	PB2
 <p>5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida</p>	-7.9kcal/mol	PA
 <p>5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida</p>	-8.6kcal/mol	PB1-PB2

# RESULTADOS DEL ACOPLAMIENTO MOLECULAR

Posibles Nueve interacciones del Receptor PB2/4j2r con el ligando 5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida

C- TERMINAL



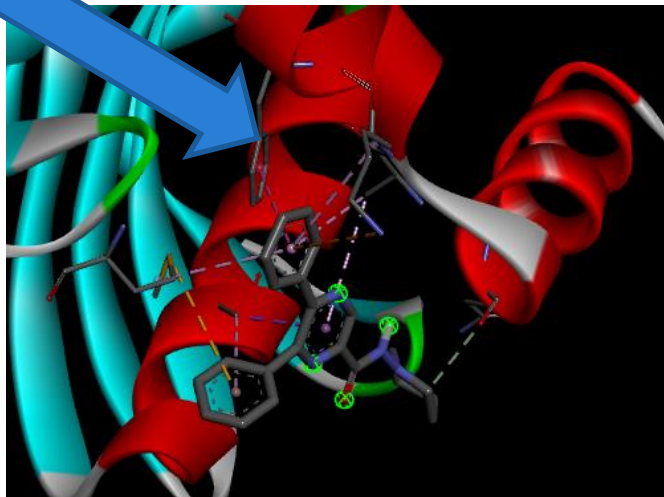
# RESULTADOS DEL ACOPLAMIENTO MOLECULAR

4J2R /PB2

5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida

Afinidad -8.0 kcal/mol

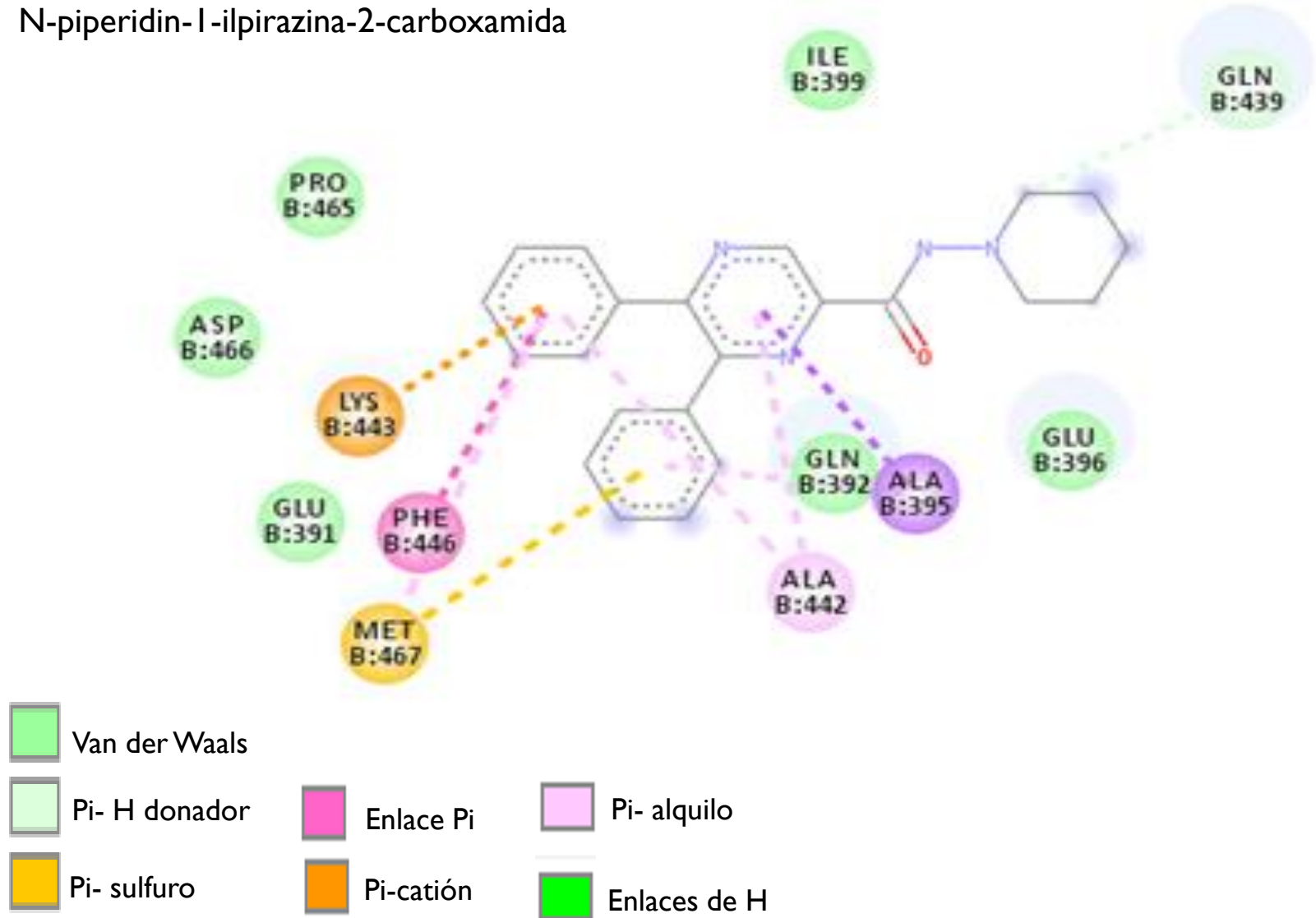
C-terminal



Interacciones  
3D 4J2R/PB2  
con el ligando

# RESULTADOS DEL DOCKING MOLECULAR

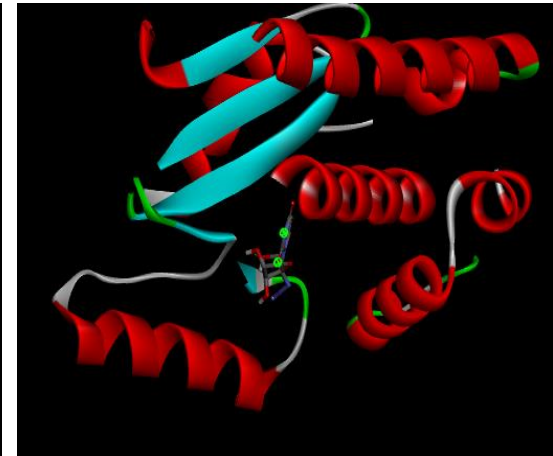
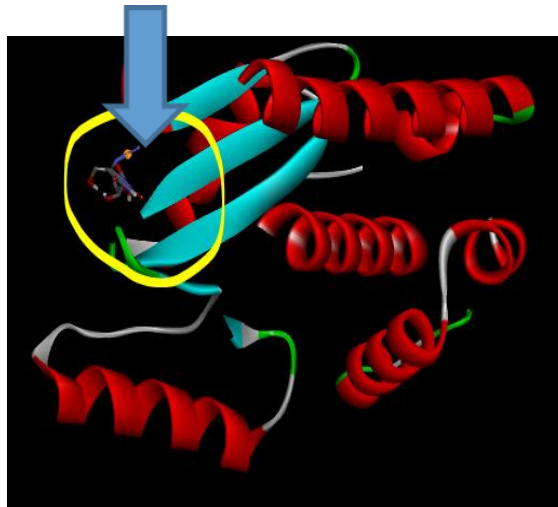
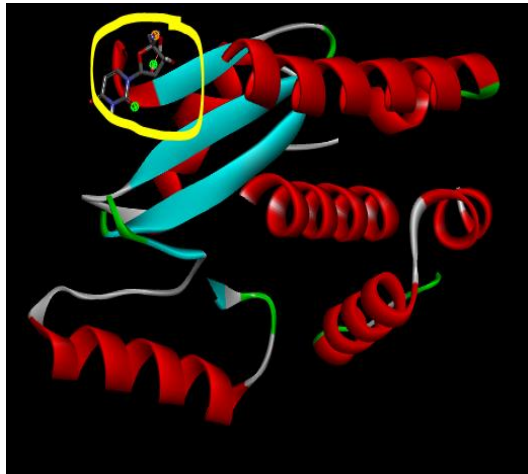
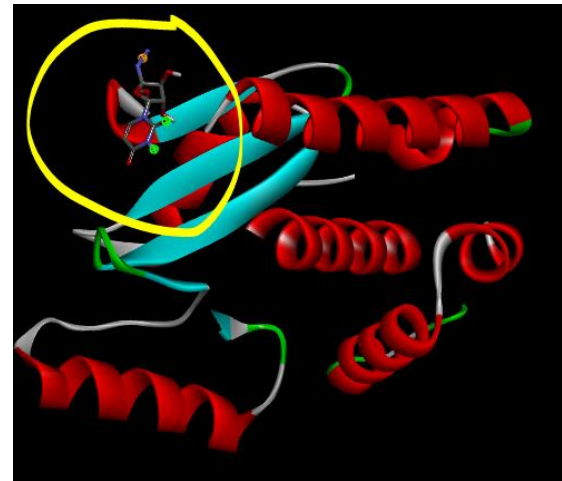
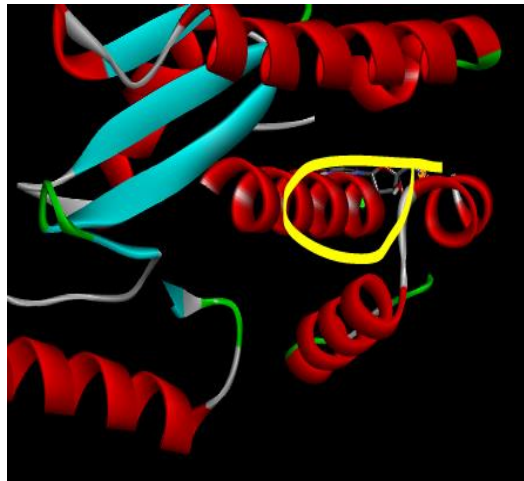
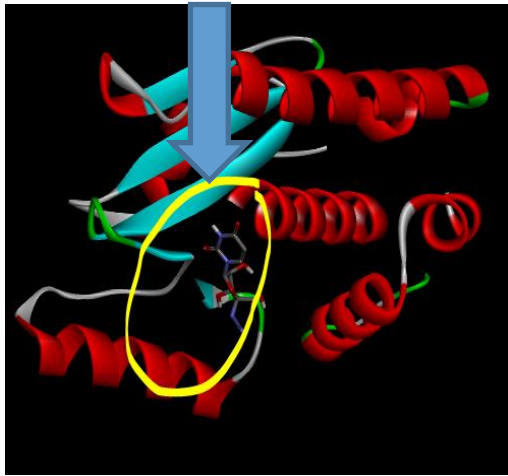
Representación 2D de las interacciones del Receptor PB2/4j2r con el ligando 5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida



# RESULTADOS DEL DOCKING MOLECULAR

Posibles Nueve interacciones del Receptor PA/ 5DES con el ligando 5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida

Zona media proteica





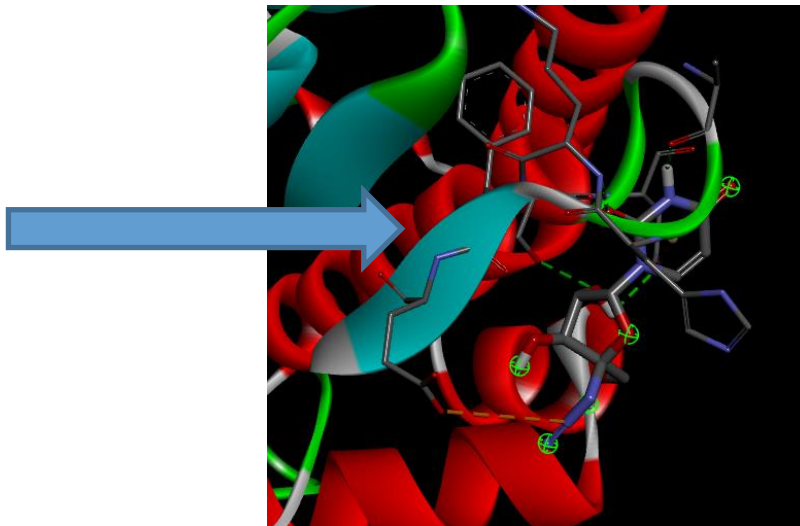
# RESULTADOS DEL DOCKING MOLECULAR

5DES/PA

5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida

Afinidad:

-7.9 kcal/mol

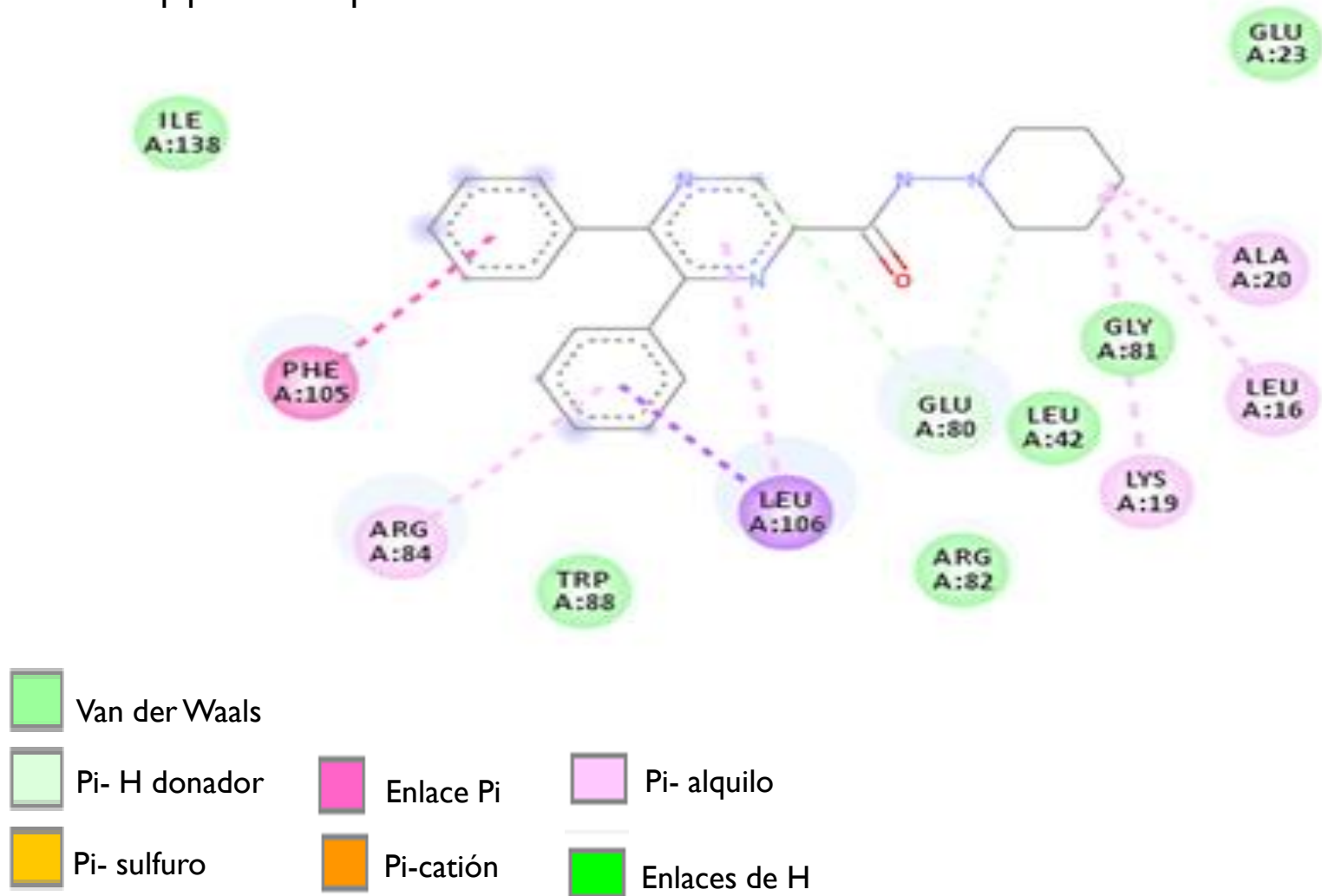


Interaccion 3D  
5DES/ PA y el  
ligando 5,6-difenil-  
N-piperidin-1-  
ilpirazina-2-  
carboxamida



# RESULTADOS DEL DOCKING MOLECULAR

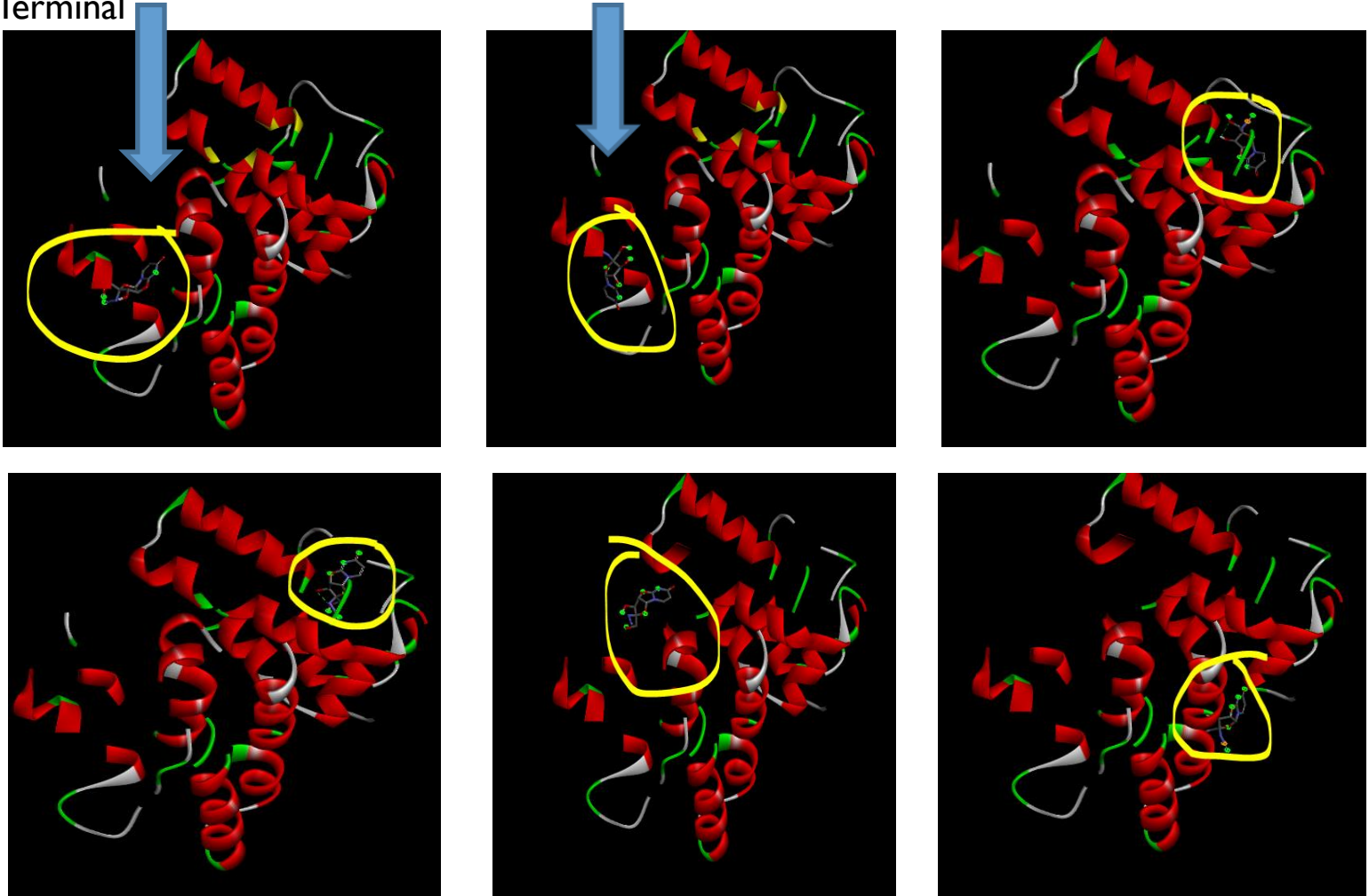
Interacciones en vista 2D del Receptor PA/ 5DES con el ligando con mejor afinidad 5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida



# RESULTADOS DEL DOCKING MOLECULAR

Posibles Nueve interacciones del Receptor PBI-PB2/ 2ZTT con el ligando 5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida

N- Terminal

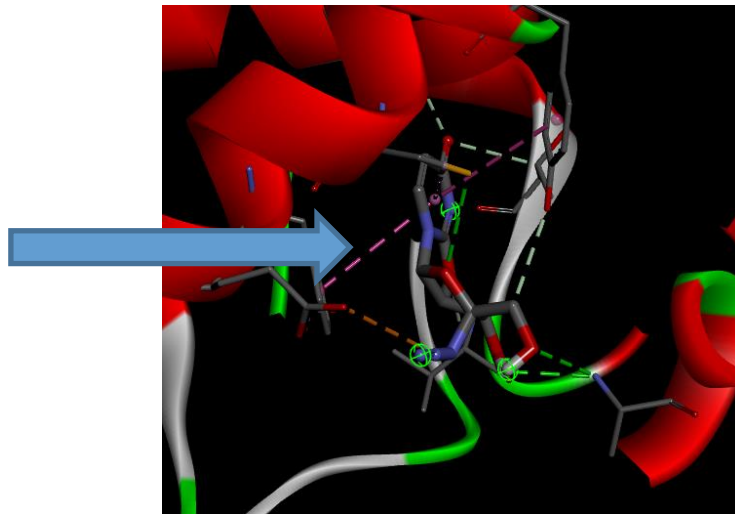


# RESULTADOS DEL DOCKING MOLECULAR

**2ZTT/PBI-PB2**

5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida

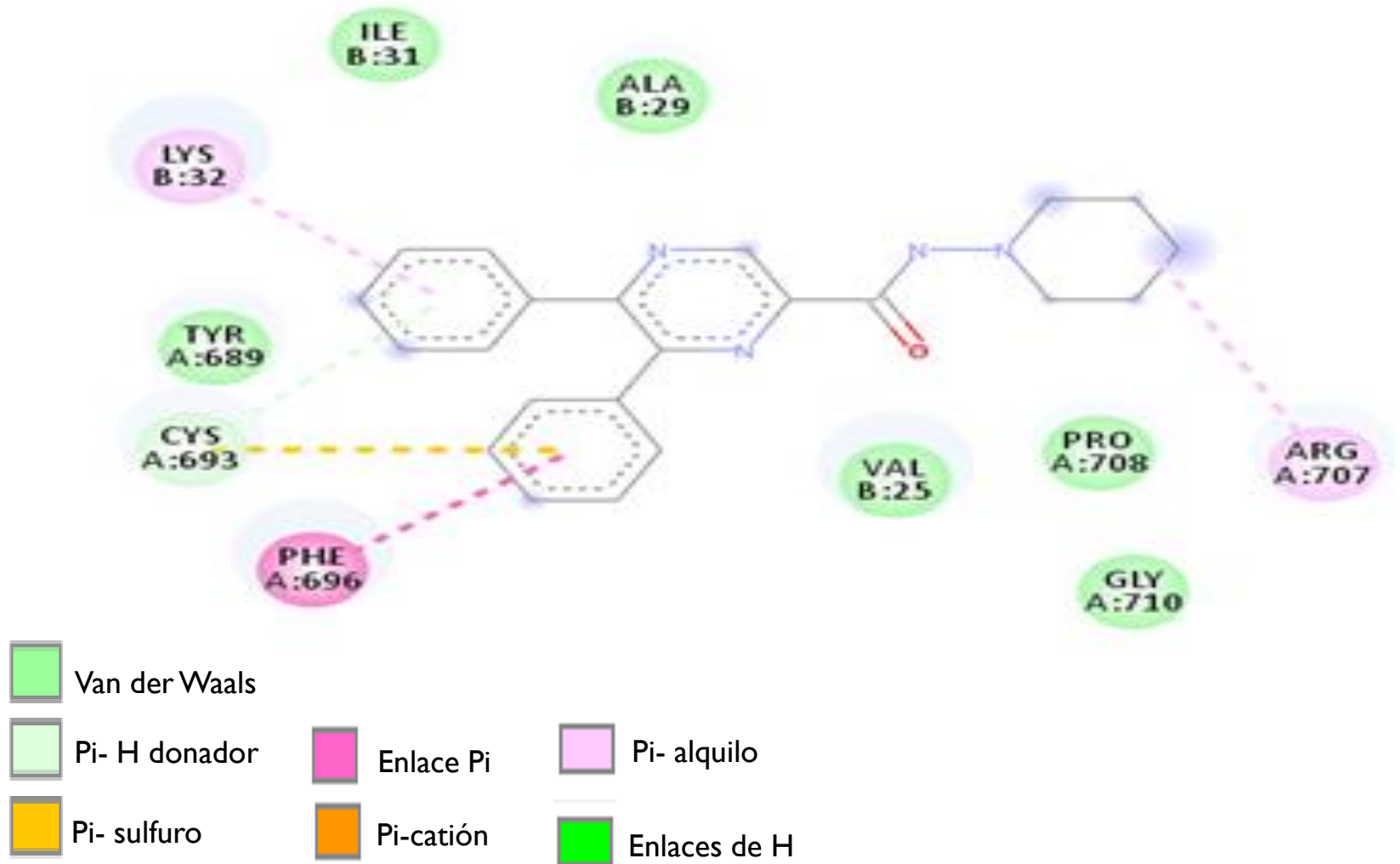
AFINIDAD: -8.6 kcal/mol



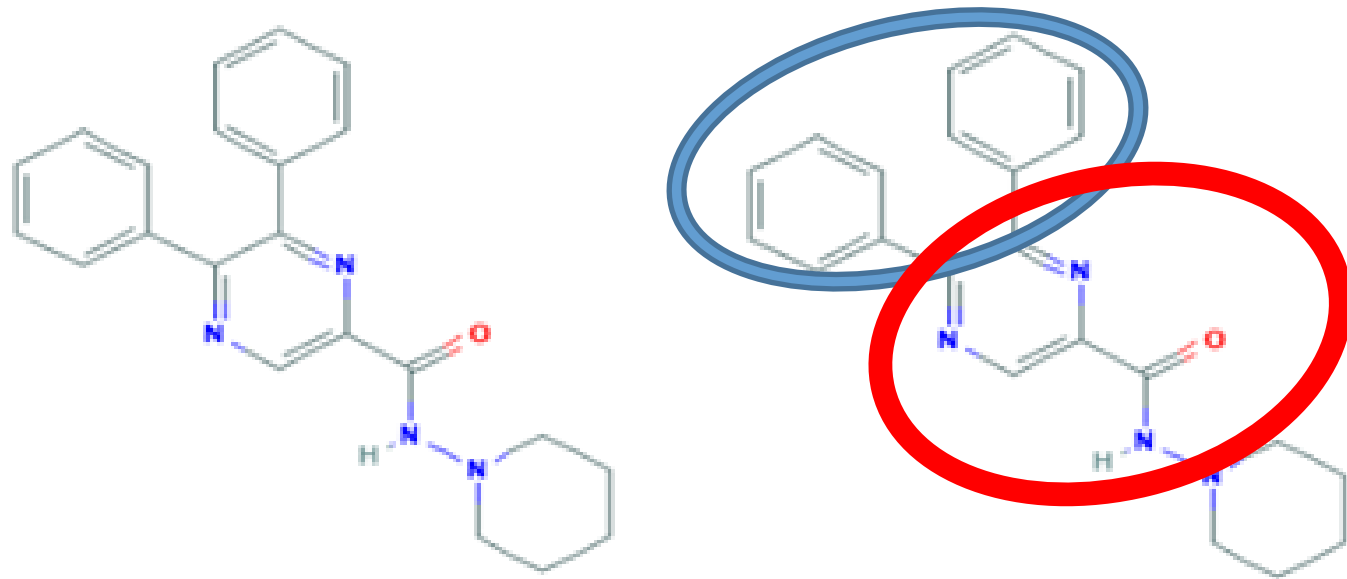
Interacción 3D  
2ZTT/ PBI-PB2 y el  
ligando 5,6-difenil-N-  
piperidin-1-ilpirazina-  
2-carboxamida

# RESULTADOS DEL DOCKING MOLECULAR

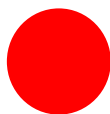
Interacciones en vista 2D del Receptor PBI-PB2/ 2ZTT con el ligando con mejor afinidad 5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida



# CONSIDERACIONES DEL MEJOR LIGANDO Y RECEPTOR



Zona de anillos para realizar interacción



Zona polar de alta solubilidad con porción amina

# CONCLUSIONES

- La enzima RdRp es altamente conservada, por lo que sería determinante dirigir la generación de nuevos fármacos antivirales hacia el bloqueo de esta enzima.
- El mejor ligando fue el “5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida”; lo que lo convierte en un buen candidato para realizar estudios exvivo y de esta manera confirmar que puede inhibir la replicación viral al unirse a segmento conservados de la enzima RdRp, promoviendo los estudios acerca de la investigación y el manejo para esta enfermedad



**MUCHAS GRACIAS  
POR SU ATENCIÓN**



Bogotá, Junio 2019

# Referencias

- Frey F. Virología. Virus de la gripe o Influenza parte I. Sabes por que se repite la gripe?— Steemit [Internet]. Steemit.com. 2018 [cited 11 June 2019]. Available from: <https://steemit.com/stem-espanol/@fran.frey/virologia-or-virus-de-la-gripe-o-influenza-parte-I-or-sabes-por-que-repite-la-gripe>
- Jordan P, Stevens S, Deval J. Nucleosides for the treatment of respiratory RNA virus infections. Antiviral Chemistry and Chemotherapy [Internet]. 2018 [cited 11 June 2019];26. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/323939234\\_Nucleosides\\_for\\_the\\_treatment\\_of\\_respiratory\\_RNA\\_virus\\_infections](https://www.researchgate.net/publication/323939234_Nucleosides_for_the_treatment_of_respiratory_RNA_virus_infections)
- Boivin S. Cusak S. Ruigrok RW. Darren J. Influenza A Virus Polymerase: Structural Insights into Replication and Host Adaptation Mechanisms. JBC [Internet].2010 [citado feb 2 2019]; 285(37): 28411–28417. Disponible en: <http://www.jbc.org/content/285/37/28411.full.pdf>
- Stubbs T. Aartjan JW. The RNA-dependent RNA polymerase of the influenza A virus. PMC (NCBI) [Internet].2014 [citado feb 05 2019]; 9(9): 1–21. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4243023/pdf/emss-61130.pdf>