

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

Determinación de metabolitos secundarios de plantas como posibles inhibidores para la glucoproteína spike del SARS-CoV-2

Camilo Andrés Ruiz Hernández

Trabajo de grado para optar el título de Químico

Directora

Stelia Carolina Méndez Sánchez

Grupo de investigación en bioquímica y microbiología (GIBIM)

Doctora en Bioquímica

Codirector

Luis Carlos Vesga Gamboa

Grupo de investigación en bioquímica y microbiología (GIBIM)

Doctor en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Química

Bucaramanga

2023

Dedicatoria

A DIOS Y A MI FAMILIA

Agradecimientos

Agradecer a las personas que constantemente apoyaron mi formación académica, mi familia. A mi madre, Sandra Jimena, por su apoyo, consejo y sacrificio; a mi padre, Fernando José, por su apoyo y dedicación; a mis abuelos, Luis María y Miryan Inés, por ser mentores llenos de sabiduría y fortaleza.

Agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Stelia Méndez, por su recibimiento en el grupo de investigación (GIBIM), por su visión para asignar las tareas más adecuadas para mí, por su apoyo durante el desarrollo del proyecto de grado y sus consejos para mi formación como investigador. Agradecer a mi codirector de tesis, el Dr. Luis Carlos Vesga, por su paciencia, conocimiento, disponibilidad y guía durante cada una de las etapas del desarrollo del proyecto de grado. Agradecer a mi compañera dentro del grupo de investigación, Jeimmy Álvarez, por su apoyo a lo largo del tiempo para desarrollar los resultados de nuestro proyecto de grado.

Tabla de contenido

Resumen.....	8
Abstract.....	9
Introducción	10
1. Cuerpo del trabajo.....	11
1.1 Marco referencial.....	11
<i>1.1.1 Acerca del SARS-CoV-2</i>	<i>11</i>
<i>1.1.2 Taxonomía del SARS-CoV-2.....</i>	<i>12</i>
<i>1.1.3 Propiedades estructurales de la glucoproteína spike del SARS-CoV-2</i>	<i>13</i>
<i>1.1.4 Mecanismo de infección del SARS-CoV-2 mediado por glucoproteína spike</i> 17	
<i>1.1.5 Plantas medicinales como tratamiento del SARS-CoV-2.....</i>	<i>20</i>
<i>1.1.6 Uso de métodos computacionales como mecanismo para la identificación de</i> <i>potenciales inhibidores de la glucoproteína spike</i>	<i>22</i>
1.1.6.1 Concepto de docking molecular y sus propiedades.....	22
1.1.6.2 Importancia de la dinámica molecular como método computacional y sus propiedades.	24
2. Objetivos.....	26
2.1 Objetivo general	26
2.2 Objetivos específicos	26
3. Metodología	26
3.1 Diseño de base de datos de metabolitos	27
3.2 Cálculo de propiedades ADME	27
3.3 Preparación de la estructura cristalina de la glucoproteína spike	28
3.4 Estudios de screening virtual	28
3.5 Análisis de MM-GBSA.....	29
3.6 Simulaciones de dinámica molecular	30
3.7 Diseño de figuras	31
4. Resultados y discusión.....	31
4.1 Análisis biológico y de interacción de los metabolitos seleccionados a partir del screening virtual.....	31

4.2	Análisis de estabilidad molecular de la interfaz proteína ligado a partir de dinámica molecular	35
4.3	Análisis de interacción aminoacídica a partir de dinámica molecular	39
5.	Conclusiones	45
6.	Recomendaciones	46
	Agradecimientos	46
	Presentación de resultados en eventos	46
	Referencias bibliográficas	47

Lista de tablas

Tabla 1. Perfil biológico y de interacción de los metabolitos seleccionados a través del screening virtual. 33

Lista de figuras

Figura 1. Extensión de la glucoproteína spike.	14
Figura 2. Conformaciones presentes en los RBD de la glucoproteína spike del SARS-CoV-2.....	16
Figura 3. Regiones de contacto entre la interfaz de la glucoproteína Spike-ACE2.....	19
Figura 4. Diseño metodológico del proyecto de investigación.	27
Figura 5. Representación gráfica de las poses del docking molecular de los metabolitos seleccionados.....	35
Figura 6. Representación del RMSD para la glucoproteína spike y el sesquipinsapol B.....	37
Figura 7. Representación de los cambios conformacionales en el ligando durante la réplica 2.....	38
Figura 8. Representación gráfica de los cambios conformacionales durante la réplica 3. ...	39
Figura 9. Porcentaje de interacción frecuencia del sesquipinsapol con residuos relevantes de la glucoproteína spike a lo largo de la simulación de 200ns.	43

Resumen

Título: Determinación de metabolitos secundarios de plantas como posibles inhibidores para la glucoproteína spike del SARS-CoV-2

Autor: Camilo A. Ruiz-Hernández, Luís C. Vesga, Stelia C. Mendez-Sanchez

Palabras clave: glucoproteína spike, SARS-CoV-2, sesquipinsapol B.

El SARS-CoV-2 es un virus surgido a finales del año 2019 el cual genera una enfermedad en los humanos denominada COVID-19. Al día de hoy, esta enfermedad ha causado más de 360 millones de contagios alrededor del mundo y continúa siendo un problema de salud global a medida que nuevas cepas del virus aparecen con el paso del tiempo. A pesar del descubrimiento de las vacunas y algunos fármacos con respuesta frente al virus, aún no se ha establecido ningún tratamiento terapéutico para el manejo de la enfermedad. En consecuencia, se estableció este proyecto de investigación con el que se buscó la identificación de metabolitos secundarios como posibles inhibidores de la glucoproteína spike del virus del SARS-CoV-2. Para alcanzar este objetivo, se realizó un estudio de screening virtual a una base de datos de metabolitos para analizar sus interacciones aminoacídicas, docking score y cálculo de energía libre. Se seleccionaron los mejores resultados en base a los criterios previamente mencionados para evaluar su estabilidad y su perfil de interacción con aminoácidos relevantes mediante el uso de dinámica molecular en simulaciones de 200 nanosegundos. Los resultados obtenidos sugieren que el sesquipinsapol B contiene el mejor perfil de interacción aminoacídico en los sitios de unión propuestos. Además, interactuó con los residuos aminoacídicos críticos como E484, N487, Y489 en el sitio de unión propuesto entre la glucoproteína spike con la enzima ACE2. Finalmente, su análisis mediante dinámica molecular se puede concluir que el sesquipinsapol B se mantuvo dentro del sitio de unión generando cambios conformacionales en el ligando que contribuyen a la inhibición de la actividad del virus.

Abstract

Title: Determination of secondary metabolites from plants as possible inhibitors for the spike glycoprotein of the SARS-CoV-2.

Authors: Camilo A. Ruiz-Hernandez, Luis C. Vesga, Stelia C. Mendez-Sanchez.

Keywords: spike glycoprotein, SARS-CoV-2, sesquipinsapol B.

SARS-CoV-2 is a virus that appeared at the end of 2019 which generates a disease called COVID-19 which only affects humans. Nowadays, COVID-19 has caused more than 360 million of cases around the world and continues to be a global health concern due to the appearance of new mutations with the pass of the time. In consequence, our investigation Project was established whose objective is to identify secondary metabolites as possible inhibitors of the spike glycoprotein of the SARS-CoV-2 virus. To reach the goal, a screening virtual process was made into a database full of metabolites to analyze their aminoacidic interactions, docking score and its free energy calculation. The best results were selected to evaluate their stability and their aminoacidic interaction profile using molecular dynamics in 200 nanoseconds simulations. The results obtained suggest the sesquipinsapol B contains the best interaction profile within the proposed sites into the interface protein ligand site. Besides, sesquipinsapol B interacts with critical amino acid residues such as E484, N487, Y489 in charge of the binding process with the ACE2 enzyme. Finally, its analysis using molecular dynamics concluded that sesquipinsapol B maintained itself inside the proposed site of interaction causing conformational changes on the ligand that massively contributes to the inhibition process of the virus activity.

Introducción

En diciembre de 2019 la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei, China, se convirtió en el centro de un brote de neumonía de causa desconocida levantando una intensa atención dentro de China y a nivel internacional (C. Wang et al., 2020). No obstante, por medio del uso de secuencias en muestras de pacientes con neumonía fue identificado subsecuentemente como el patógeno causante y provisionalmente llamado 2019-nCoV que pasó a llamarse SARS-CoV-2 (R. Lu et al., 2020).

Los coronavirus (CoVs) son genéticamente diversos con un ARN viral de sentido positivo que circula en animales y humanos (Pruijssers et al., 2020). El genoma del SARS-CoV-2 contiene 14 marcos de lectura abierta (ORF – del inglés, open reading frame), dos tercios de los cuales codifican 16 proteínas no estructurales (nsp 1-16) que constituyen el complejo replicasa. El tercio restante codifica nueve proteínas de accesorios (ORF) y cuatro proteínas estructurales: la glucoproteína spike (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N).

La glucoproteína spike es la encargada de mediar la entrada del SARS-CoV-2 a las células hospederas, convirtiéndola en una proteína importante para el desarrollo del virus en los humanos mediando su entrada al cuerpo (Harrison et al., 2020). Estudios corroboran que la entrada a la célula hospedera del SARS-CoV-2 depende de la interacción entre la glucoproteína spike y la enzima convertidora de angiotensina ACE2 (Hoffmann, Kleine-Weber, Schroeder, et al., 2020; Shang et al., 2020; Yan et al., 2020).

En este proyecto, se identificaron metabolitos secundarios de plantas como posibles inhibidores de la glucoproteína spike, perteneciente al SARS-CoV-2. Se llevo a cabo un proceso de screening virtual a partir de una base de metabolitos de la cual se seleccionaron

compuestos con el mejor perfil de propiedades biológicas, interacciones y energía. Posteriormente se analizaron estos compuestos mediante simulaciones de dinámica molecular para evaluar su perfil de estabilidad molecular en la interfaz proteína ligando y sus interacciones en ella.

1. Cuerpo del trabajo

1.1 Marco referencial

1.1.1 *Acerca del SARS-CoV-2*

El SARS-CoV-2 es un virus que fue diagnosticado por primera vez en diciembre del 2019 en un mercado de comida marina en el centro de Wuhan, China como un cuadro sintomático de neumonía, fiebre, tos seca, dolor en el pecho e infiltraciones en los pulmones (Gralinski & Menachery, 2020). El pico más alto del brote de COVID-19 en China, enfermedad provocada por el SARS-CoV-2, se alcanzó en el mes de febrero del año 2020 con un número de casos confirmados de 3,000 casos por día (Hu et al., 2020). A partir de ese punto, la propagación del COVID-19 se incrementó exponencialmente a nivel internacional debido a su alta eficiencia de transmisibilidad entre los seres humanos (Fisher & Heymann, 2020). Debido al gran volumen de vuelos internacionales como uno de los grandes vectores para multiplicar el COVID-19, la Organización Mundial de la Salud (en inglés – WHO) declaró oficialmente el estado de pandemia en marzo del año 2020 (World Health Organization, 2020). Con el paso del tiempo, el virus del SARS-CoV-2 comenzó a evolucionar como consecuencia del desarrollo de nuevas variantes con características diferentes a las del virus original (Casella et al., 2020).

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

A partir de la importancia que tiene el conocimiento previo y la evolución sobre el virus del SARS-CoV-2, es relevante destacar cuál es su taxonomía.

1.1.2 Taxonomía del SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 tiene un origen taxonómico en la familia de *nidovirales* que se divide en dos familias, *orthocoronavirinae* (contiene cuatro genes: *alphacoronavirus*, *betacoronavirus*, *gammacoronavirus*, *deltacoronavirus*) y *letovirinae* (contiene el gen monotípico *alphaletovirus*). El SARS-CoV-2 hace parte de uno de los cuatro genes no monotípicos de la subfamilia *orthocoronavirinae*, el gen *betacoronavirus* el cual contiene el grupo de los *sarbecovirus* (Mavrodiev et al., 2020). Los primeros coronavirus descubiertos son HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, y HCoV-HKU los cuales se expresan como un resfriado normal causando bronquitis y neumonía (Kanwar et al., 2017). No obstante, los virus del SARS-CoV, MERS-CoV y el SARS-CoV-2 son los más recientes y considerados pandémicos, los cuales pertenecen a una clase nueva de betacoronavirus conocidos como *sarbecovirus* y *merbecovirus*, respectivamente (de Groot et al., 2013; Gorbalenya et al., 2004; van Boheemen et al., 2012). Mediante los estudios y el número de pacientes cada virus surgido se vuelve mucho más infeccioso que su predecesor (de Wit et al., 2016). En consecuencia, el cuerpo humano no está diseñado para combatir una nueva cepa y es susceptible a sufrir la sintomatología que produce el SARS-CoV-2 (Kirtipal et al., 2020). En relación con el genoma del SARS-CoV-2 se tiene un porcentaje de semejanza del 96% con respecto al SARS (RaTG13) mostrando que su origen más probable proviene de los murciélagos (Hilmi et al., 2020). Algunas características de los virus pertenecientes a la familia de los *nidovirales* son: la forma de un sobre cubierto de membrana con un genoma RNA con dirección positiva y la transcripción de diferentes péptidos con RNA subgenómico simultáneamente en forma de nido el cuál es el origen del nombre de la familia viral (Zhou

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

et al., 2021). Los *coronaviridae* reciben su nombre gracias a la forma que compone la glucoproteína spike y la proteína de envoltura para formar una especie de corona en la membrana periférica del virus, además de sus huéspedes para infección, los alphacoronavirus y betacoronavirus infectan los mamíferos, mientras que los gammacoronavirus y deltacoronavirus infectan las aves (Helmy et al., 2020).

A continuación, se exhiben las propiedades estructurales de la glucoproteína spike del SARS-CoV-2.

1.1.3 Propiedades estructurales de la glucoproteína spike del SARS-CoV-2

La proteína estructural spike (S) es una proteína de fusión viral clase I cuya característica es la división del precursor a partir de la proteasa de la célula hospedera en dos subunidades membranales para su posterior fusión (Bosch et al., 2003). Esta constituye una glucoproteína homotrimérica transmembranal de 180 kDa que está dividida en dos: la subunidad S1 y la subunidad S2 (Figura 1) (Sternberg & Naujokat, 2020). La subunidad S1 está constituida por 672 aminoácidos y organizada en cuatro dominios: un dominio N-terminal (en inglés: NTD), un dominio receptor de enlace (en inglés: RBD) y dos subdominios (SD1 y SD2) (Wrapp et al., 2020).

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

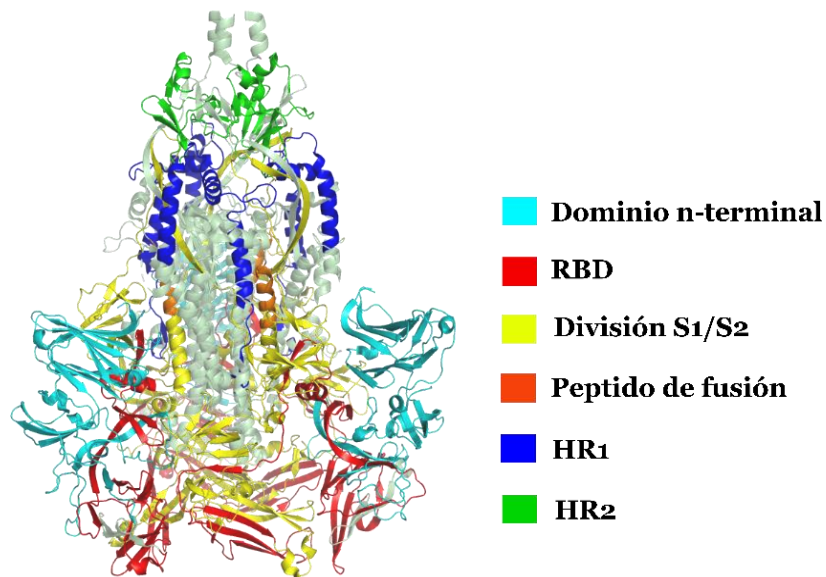


Figura 1. *Extensión de la glucoproteína spike.*

Los dominios n-terminal (color celeste) y los RBD (color rojo) pertenecen a la subsección S1. La división S1/S2 (color amarillo) marca la división secuencial entre dos subsecciones: S1 y S2. Las regiones de los péptidos de fusión (color naranja) y las regiones HR1 – HR2 (color azul, verde) pertenecen a la subsección S2.

La subunidad S2 está constituida por 587 aminoácidos y organizada en cinco dominios: un péptido de fusión hidrofóbico (en inglés: FP), dos grupos de siete secuencias de repetición (en inglés: HR1 y HR2), un dominio transmembranal (en inglés: TM) y una cola citoplasmática (en inglés: CT) (Y. Huang et al., 2020).

El dominio N-terminal genera la producción de una secuencia señal para obtener acceso al retículo endoplasmático de la célula hospedera a través de una glucosilación altamente fuerte por todo el dominio (Malik, 2020). Los dominios receptores de enlace son áreas repletas de aminoácidos que permiten la interacción de agentes receptores como la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) cuyo rol facilita la entrada viral hacia la célula hospedera (Premkumar et al., 2020). Las interacciones entre enzimas con el dominio receptor de enlace son producidas a través de divisiones generadas a través de las proteasas hospederas tales como la TMPRSS2 (En inglés – transmembrane serine protease 2), la catepsina L o la

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

furina en la división entre subunidades S1/S2 (Bestle et al., 2020; Hoffmann, Kleine-Weber, & Pöhlmann, 2020; Koch et al., 2021).

La glucoproteína spike está sometida a grandes cambios conformacionales en la estructura de la subunidad S1 alrededor de los RBD durante los procesos de fusión virales (Figura 2). La función del cambio conformacional es la prevención del desorden estructural de la glucoproteína spike mediante rotaciones de las hélices conectadas a los dominios receptores de enlace (Khare et al., 2021). Este movimiento genera conformaciones abiertas (con los RBD ubicados en la parte superior del complejo) y conformaciones cerradas (con los RBD ubicados en la parte inferior del complejo). Estas conformaciones “abiertas” son vulnerables a la interacción con otros compuestos mientras conformaciones “cerradas” obstruyen dicho contacto (Henderson et al., 2020). Al presentar la conformación hacia “arriba” el dominio receptor de enlace aborta cualquier contacto con el subdominio II de la glucoproteína spike (S2) separando el subdominio I de la glucoproteína spike (S1). Esto facilita el proceso de entrada del virus a la célula hospedera (Duan et al., 2020). En la conformación “cerrada” se presenta un mecanismo de defensa a través de los glucanos presentes en las posiciones N165, N234 y N343 próximos a los RBD como protección afectando la transición de conformación “abierta” a “cerrada” y viceversa (Watanabe et al., 2020); por lo tanto, es necesario que la RBD obtenga una conformación “abierta” para la interacción entre la proteína y la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) (Walls et al., 2016).

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

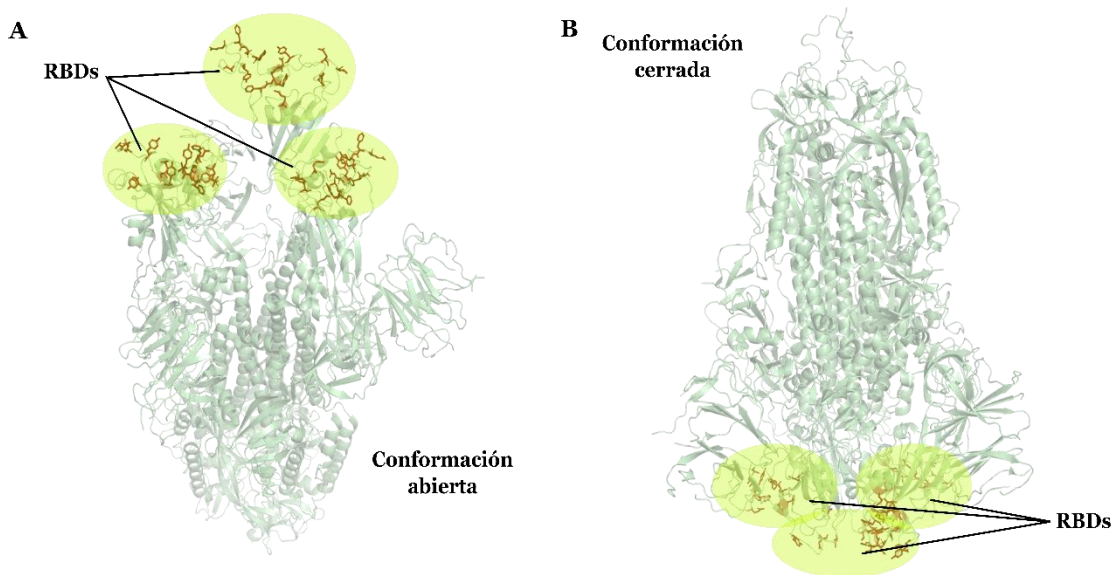


Figura 2. Conformaciones presentes en los RBD de la glucoproteína spike del SARS-CoV-2. Código PDB: 6LZG. Resolución: 2.50 Å. Color de la glucoproteína spike: verde pálido. Dominios receptores de enlace: zonas coloreadas de amarillo. Residuos N165, N242 y N343 pertenecientes a los glucanos circundantes a las RBD: color rojo. (A) Conformación abierta – las regiones RBD se encuentran en la parte superior del complejo homotrimérico. (B) Conformación cerrada – las regiones RBD se encuentran en la parte inferior del complejo homotrimérico.

Los n-glucanos presentes en la glucoproteína spike son heterogéneos y son los encargados de extender la flexibilidad conformacional y diversidad epitelial de la proteína (Sun et al., 2021). En la subunidad S2 existe el péptido de fusión hidrofóbico que permite el incremento de la rigidez de las regiones glicosídicas presentes en la bicapa lipídica separando los lípidos hacia afuera generando un desorden estructural (Koppiseti et al., 2021) lo que traza el camino del virus hacia dentro de la célula hospedera (Gorgun et al., 2021). Las regiones HR-1 y HR-2 son secuencias de aminoácidos repetidas que son vitales para adoptar estados de conformación intermedio en forma de cola una vez el proceso de fusión ha acabado (Y. Xu et al., 2004). Estas regiones también pueden ser inhibidas para mediar el proceso de fusión viral (Zheng et al., 2021). Por último, la función de la cola citoplasmática de la subunidad S2 mejora la incorporación del virus dentro de la célula hospedera a través

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

de la expresión de vectores sensibles a la neutralización (Chen et al., 2021). Una vez el péptido de fusión cae dentro de la membrana se genera la formación de un empaquetamiento antiparalelo de seis hélices que resulta en la fusión y se inserta dentro del citoplasma (Malik, 2020).

Una vez mencionadas las propiedades estructurales de la glucoproteína spike, en el siguiente apartado se explica el mecanismo de infección del SARS-CoV-2 a través de la glucoproteína spike.

1.1.4 Mecanismo de infección del SARS-CoV-2 mediado por glucoproteína spike

El punto de inicio en el mecanismo de virulencia del SARS-CoV-2 comienza a partir de su glucoproteína spike (S). Esto es debido a su función como mediador de fusión de membrana y forma parte de la entrada viral a la célula hospedera (Ou et al., 2020). La fusión de membrana es un proceso energéticamente favorable a pesar de la presencia de barreras cinéticas intermembranales generadas por el producto de las fuerzas repulsivas de hidratación (Cai et al., 2020). Dichas barreras se superan con la energía libre que resulta de su estado de prefusión inestable y se va transformando hacia un estado de post-fusión estable. El estado de prefusión presenta un reto para la producción de antígenos para la glucoproteína que pueden dirigir respuestas neutralizadoras debido a su alta inestabilidad (Kirchdoerfer et al., 2018). La secuencia aminoacídica que define la glucoproteína spike presenta una glucosilación cuya atribución defiende las regiones donde el receptor se enlaza mejorando el sistema inmunológico y reconocimiento de la entrada viral presentes en la célula hospedera (Saxena et al., 2020). De la misma manera la glucoproteína spike contiene las propiedades de alta flexibilidad y altos niveles de dinamismo molecular debido a sus cambios conformacionales (Henderson et al., 2020). La glucoproteína spike contiene un total de 1273 residuos aminoacídicos divididos en dos partes: S1 y S2, donde la S1 contiene una pequeña

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

superficie de dominio receptor mientras que la S2 contiene una fusión membranal para permitir el paso del virus a la célula hospedera (Zhang et al., 2021). Cuando S1 y S2 entran en contacto con la furina, catalizan una partición en la estructura de la glucoproteína spike (Pawłowski, 2021). De esa manera la glucoproteína spike lleva a cabo el anclaje en la periferia del virus para promover una fusión membranal entre la célula hospedera y el virus por medio del contacto con la enzima ACE2 o enzima convertidora de angiotensina 2 (Walls et al., 2020). Adicionalmente, el aumento en las interacciones aminoacídicas entre la enzima ACE2 y la glucoproteína spike se produce a causa de la distribución de cargas en los aminoácidos presentes en la RBD (Pawłowski, 2021). A causa de esto, la toxicidad y la virulencia del SARS-CoV-2 se incrementa. Durante la interfaz de enlace se presentan entre 17 a 20 interacciones aminoacídicas a través de la enzima ACE2 y el dominio receptor de enlace (Papageorgiou & Mohsin, 2020). La intervención de cualquier agente en medio de la RBD y el receptor ACE2 indica la ruta para intervenir en los procesos de entrada y fusión del SARS-CoV-2 a la célula hospedera (Wlodawer et al., 2020). Además de la enzima ACE2, también está demostrado que la proteína transmembranal de serina 2 (TMPRSS2) cumple un papel fundamental en la aceleración de la infección en las células debido al contacto con el virus realizando una rápida inserción del virus a la célula hospedera para comenzar el ciclo de replicación viral (Baby et al., 2021). Como resultado de los procesos mencionados, se destacan tres regiones de contacto formadas por los siguientes aminoácidos (Figura 3):

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

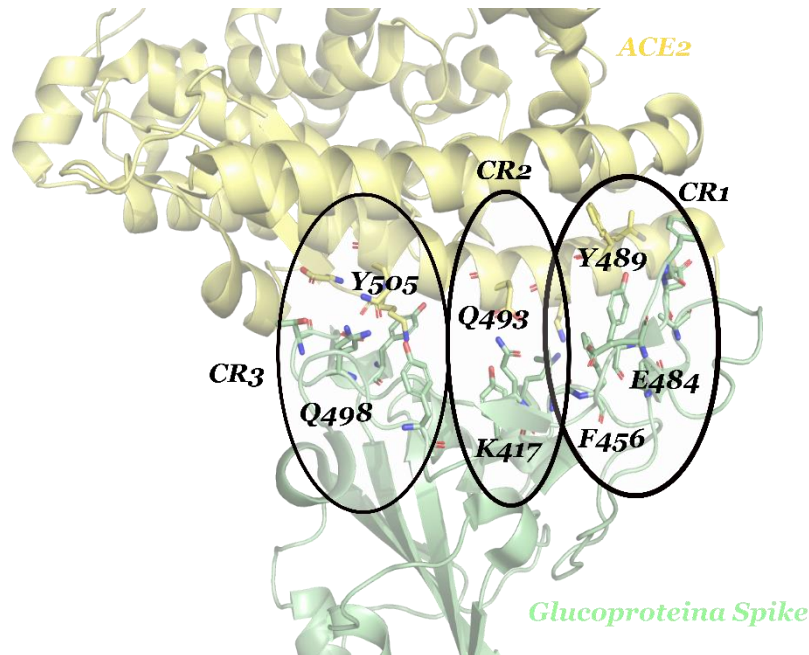


Figura 3. *Regiones de contacto entre la interfaz de la glucoproteína Spike-ACE2.*

La enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) (color amarillo) y la glucoproteína spike del SARS-CoV-2 (color verde) interactúan entre sí, donde se destacan las regiones de interés CR1, CR2, y CR3.

CR1 (en inglés – contact region 1) (F456, Y473, A475, E484, F486, N487, Y489), CR2 (en inglés – contact region 2) (K417, Y453, L455, Q493) y CR3 (en inglés – contact region 3) (Y449, Q498, T500, Y505). La CR1 es la principal zona de interés debido a que intervienen aminoácidos como F486 o Y489 que tienden a formar interacciones hidrofóbicas con el receptor ACE2 (Choudhary et al., 2020; Taka et al., 2021). Al igual que el aminoácido E484 ya que es el principal aminoácido que participa en la neutralización y escape inmune del virus aportando una significativa reducción de afinidad de enlace entre la glucoproteína y el receptor ACE2 (Harvey et al., 2021). Otra zona comprendida por la CR1 es el bucle conformado por los aminoácidos del T470 al F490 debido a que está activado durante la conformación “abierta” y oculta en la conformación “cerrada” proporcionando una mayor atracción hacia el receptor ACE2 (C. Xu et al., 2021).

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

En adición, la aparición de las nuevas variantes del SARS-CoV-2 surgen a causa de mutaciones en aminoácidos como K417, L452, T478, E484, Q493, G496, Q498 o N501. El proceso de mutación aumenta la infectividad dentro de la célula hospedera y disminuye la respuesta efectiva de anticuerpos expresados en las zonas de mayor vulnerabilidad (Deng et al., 2021; Hoffmann et al., 2021; Z. Liu et al., 2021; Mlcochova et al., 2021; Planas et al., 2021; Thomson et al., 2021; Weisblum et al., 2020). Basándose en lo anterior, las zonas de contacto involucran los aminoácidos envueltos en el proceso de mutación generando un doble interés en la interacción aminoacídica entre el ligando y la glucoproteína spike. Este concepto contribuye al descubrimiento de fármacos que interactúen con las regiones de contacto mencionadas para inhibir el ingreso de la partícula viral a la célula hospedera. Uno de estos ejemplos es la cloroquina ya que presenta interacciones de tipo π - π con aminoácidos como L452, L455 y Y473 reportando potenciales de inhibición contra el virus en líneas celulares Vero E6 (G. Li & de Clercq, 2020; Prashantha et al., 2021; M. Wang et al., 2020).

Tal como la presencia de este fármaco inhibe la entrada del virus a la célula hospedera, la presencia de metabolitos provenientes de plantas es una alternativa para el tratamiento de COVID-19. A continuación, se reportan los principales compuestos inhibitorios de la infección por el virus del SARS-CoV-2, reportados en la literatura.

1.1.5 Plantas medicinales como tratamiento del SARS-CoV-2

Como alternativa para el tratamiento de enfermedades, se ha impulsado el análisis de componentes en plantas para desarrollar nuevos tratamientos que contrarresten diferentes tipos de enfermedades producidas por diversos agentes, como los virus (Koparde et al., 2019). A través de este impulso, la necesidad de esta alternativa terapéutica muestra beneficios como la optimización del sistema inmunológico humano frente a una enfermedad,

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

otorgar una mejor respuesta ante inflamaciones y proporcionar propiedades antioxidantes al cuerpo (Ganjhu et al., 2015; Runfeng et al., 2020).

Frente al SARS-CoV-2, el tratamiento con componentes de plantas se ha investigado extensivamente donde se han identificado 76 metabolitos provenientes de plantas desde el inicio de la pandemia (Bhuiyan et al., 2020). A través de un estudio, se han investigado aproximadamente 1200 metabolitos provenientes de plantas medicinales (Mahmud et al., 2022). Además, los métodos de tratamiento actuales no poseen el 100% de la efectividad esperada haciendo que las propiedades metabólicas de las plantas se presenten como una alternativa más enriquecedora contra el SARS-CoV-2 (Bhar et al., 2022). Como ejemplo, el óxido de carlina, un constituyente biológico activo presente en la planta *C. acaulis*, inhibe la entrada del SARS-CoV-2 a la célula por medio de interacciones aminoacídicas mediadas por puentes de hidrógeno con K417, L452, Y453, L455 y Q493 en pruebas *in silico* e *in vitro* (Wnorowska et al., 2022). La curcumina tiene un potencial de inhibición frente a la entrada del SARS-CoV-2 a la célula hospedera a través de interacciones mediadas por puentes de hidrógeno como Y489, Q493, Q498 y Y505, así como en células Vero E6 (Marín-Palma et al., 2021; Shanmugarajan et al., 2020). La catequina posee la capacidad de inhibir la entrada del SARS-CoV-2 hacia la célula hospedera a través de interacciones hidrofóbicas con residuos aminoacídicos como K417, L452, Y453, L455 y Y505 en pruebas sobre líneas celulares como HEK293, A549, Calu-3 y HCT-8 (Jena et al., 2021; J. Liu et al., 2021).

Otros ejemplos están relacionados con los extractos de *Withania somnifera* (Chikhale et al., 2021), *Nicotiana benthamiana* (Mamedov et al., 2021), *Glycyrrhiza glabra* (Sinha et al., 2021), *Digitalis purpurea* (Zígolo et al., 2021), *Camellia sinensis*, *Syzygium aromaticum*, *Equisetum arvense* o *Linaria vulgaris* (Tallei et al., 2020) los cuales representan un potencial

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

de inhibición frente al SARS-CoV-2 a causa de interacciones aminoacídicas con los residuos K417, Y453, Q493 y N501.

Sin embargo, para el análisis aminoacídico de la glucoproteína se necesitan unas herramientas *in silico* las cuales están expresadas en el siguiente apartado.

1.1.6 Uso de métodos computacionales como mecanismo para la identificación de potenciales inhibidores de la glucoproteína spike

Los modelos y técnicas computacionales son herramientas utilizadas para identificar ligandos (por ejemplo, metabolitos) de acuerdo con sus propiedades biológicas y estructurales en relación con estructuras cristalinas de proteínas (Khater et al., 2016). Las proteínas asociadas a un ligando ubicado en su sitio activo es el mejor punto de partida para el desarrollo de modelos de virtual screening (Rollinger et al., 2008). Hoy día los métodos *in silico* son usados para la creación de modelos multivariantes y generar pruebas experimentales de la mano de los métodos *in vitro* (Ekins et al., 2007). De esta manera, se han establecido nuevos estándares a partir de métodos *in silico* como el caso del Alzheimer, la osteoartritis y el cáncer de seno (Lee & Hu, 2019).

A continuación, se describen los conceptos de docking molecular junto a las propiedades del método.

1.1.6.1 Concepto de docking molecular y sus propiedades.

Las simulaciones de docking molecular generan una predicción de la estructura del complejo proteína – ligando mediante conformaciones activas del ligando en los sitios activos de la proteína (Meng et al., 2011). Los principios fundamentales del docking molecular complementan un número de conformaciones y poses de un ligando para su interacción dentro de las regiones de enlace proteicos (Salmaso & Moro, 2018). El docking

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

molecular está compuesto por un proceso de muestreo de conformaciones el cual busca espacios descritos a través de la energía libre en las zonas circundantes de la proteína, o su puntuación de docking (en inglés – docking score) (Abagyan et al., 1994). El docking score busca relacionar la energía libre de la conformación de un ligando en contraste con la energía superficial que emite la proteína (Aldeghi et al., 2015; Cournia et al., 2017; Heinzelmann & Gilson, 2021).

La puntuación del docking score se clasifica en tres tipos: funciones de puntaje por campos de fuerza, como AutoDock Vina, definidos por interacciones mediadas van der Waals (Guedes et al., 2018; Huey et al., 2007) . Funciones de puntaje empíricas, como GlideScore, definidas por la sumatoria entre la entropía, la hidrofobicidad, las interacciones mediadas por puentes de hidrógeno, van der Waals y electrostáticas en términos de potencial de enlace (Halgren et al., 2004; S. Y. Huang & Zou, 2010).

La función empírica de Glide se describe de la siguiente manera en la ecuación 1:

$$\Delta G_{bind} = C_0 + C_{lipo} \sum f(r_{lr}) + C_{hbond} \sum g(\Delta r)h(\Delta \alpha) + C_{metal} \sum f(r_{lm}) + C_{rotb}H_{rotb} \quad (1)$$

La sumatoria perteneciente al segundo término hace parte de los pares ligando/receptor definidos como lipofílicos. El tercer término representa las interacciones mediadas por puentes de hidrógeno. Las funciones f, g y h calculan una puntuación completa para distancias de enlace dentro de los límites nominales, así como una puntuación parcial para distancias de enlace fuera de los límites (Eldridge et al., 1997; Friesner et al., 2004). De esa forma, Glide muestra que es una herramienta fundamental para la predicción de puntuaciones de docking dentro de la interfaz proteína – ligando al tener en cuenta las

propiedades termodinámicas, las interacciones involucradas y las distancias de enlace generadas.

En relación con el docking molecular, a continuación, se define el concepto y la importancia de la dinámica molecular como método *in silico*.

1.1.6.2 Importancia de la dinámica molecular como método computacional y sus propiedades.

Otra de las herramientas computacionales más relevantes en el diseño e identificación de nuevos fármacos es la dinámica molecular. La dinámica molecular es una técnica que simula el movimiento de átomos en función del tiempo transcurrido de una biomolécula por la integración de las leyes de Newton (ecuación 2) (Leach, 2001).

$$\frac{d^2r_i(t)}{dt^2} = \frac{F_i(t)}{m_i} \quad (2)$$

$F_i(t)$ pertenece a la fuerza ejercida de un átomo i a un tiempo t determinado, $r_i(t)$ relacionada la posición vectorial de un átomo i a un tiempo t y m_i hace alusión a la masa del átomo. Luego, se involucra la aceleración a partir de las fuerzas que actúan sobre un átomo i y se calculan estas fuerzas a partir del campo de fuerza ejercido sobre el átomo (ecuación 3).

$$a_i(t) = \frac{d^2r_i(t)}{dt^2} = \frac{F_i(t)}{m_i} = -\frac{dV(r(t))}{m_i dr_i(t)} \quad (3)$$

Donde $dV(r(t))$ representa la función de energía potencial ejercida por el campo de fuerza sobre los átomos de la caja. Los campos de fuerza son los responsables de una buena simulación en la dinámica molecular cuyo ejemplo es el campo de fuerza OPLS (Jorgensen & Tirado-Rives, 1988). La relevancia de los estudios de dinámica molecular reincide en la

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

confirmación de sitios alostéricos o activos dentro de una estructura proteica previamente planteados por el docking molecular (Durrant & McCammon, 2011).

Con base en lo anterior, este trabajo de investigación tuvo los siguientes objetivos:

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

✓ Identificar metabolitos secundarios de plantas medicinales con potencial capacidad de inhibición de la actividad viral de la glucoproteína spike del SARS-CoV-2.

2.2 Objetivos específicos

✓ Identificar metabolitos secundarios de plantas medicinales como posibles inhibidores de la entrada del SARS-CoV-2 por medio de la glucoproteína spike a través de screening virtual.

✓ Proponer un modo de unión de los potenciales inhibidores frente al target seleccionado basado en sus interacciones con residuos aminoacídicos relevantes, así como su posible afinidad al receptor de dominio.

✓ Evaluar la estabilidad dentro del sitio de unión propuesto por el screening virtual de los metabolitos seleccionados como potenciales inhibidores de la glucoproteína spike a lo largo del tiempo mediante dinámica molecular.

Con el fin de cumplir los objetivos anteriormente mencionados, se realizó la siguiente metodología.

3. Metodología

Se creó una base de datos de metabolitos secundarios de plantas a las cuales se les ha reportado en la literatura con actividad antiviral. Luego, se realizó un análisis del acoplamiento por medio de un screening virtual en diferentes precisiones (HTVS, SP, XP) para determinar los mejores metabolitos secundarios a partir de sus interacciones aminoacídicas con la glucoproteína spike. Por último, se llevó a cabo una serie de

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

simulaciones por medio de dinámica molecular para estudiar la estabilidad de la interface proteína-ligando (RMSD) y sus respectivos contactos proteína-ligando a lo largo de cada una de las réplicas (**ver figura 4**).

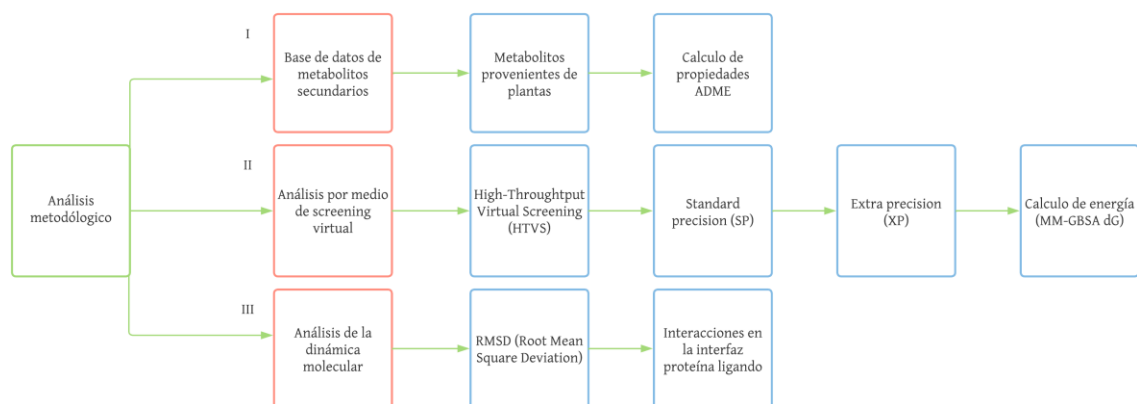


Figura 4. *Diseño metodológico del proyecto de investigación.*

Fase I. Diseño de base de datos de metabolitos y cálculo de propiedades ADME. Fase II. Análisis por medio del screening virtual y cálculo de energía libre. Fase III. Análisis por medio de dinámica molecular.

3.1 Diseño de base de datos de metabolitos

En el primer paso se creó una base de datos que contiene 4233 metabolitos de plantas reportados en la literatura con actividad antiviral. Teniendo en cuenta información cómo, la enfermedad que podría tratar, tipo de planta y procedencia del metabolito.

3.2 Cálculo de propiedades ADME

Con el fin de conocer el perfil citotóxico de los compuestos en la base de datos, se realizó el cálculo de las propiedades de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADMET) para los metabolitos recolectados en la base de datos a través del módulo QikProp en la interfaz de Schrödinger 2021-1 (Ioakimidis et al., 2008). QikProp identificó compuestos químicos cuyas propiedades no están dentro del rango de acción de un fármaco optimizando su clasificación mediante análisis y datos experimentales previamente

reportados (Jorgensen et al., 2006). A través del módulo QikProp, se generó una clasificación de las propiedades ADMET para los compuestos presentes en la base de metabolitos. Los criterios a destacar en esta fase comprenden la biodisponibilidad de un compuesto químico para desarrollar funciones farmacológicas, la absorción en células gastrointestinales (células *Caco-2*), el peso molecular, el número de protones aceptores y donadores y el valor del logP que indica la posible permeabilidad del compuesto para penetrar tejidos.

3.3 Preparación de la estructura cristalina de la glucoproteína spike

Luego de seleccionar los metabolitos que cumplen con el perfil adecuado con respecto a la biodisponibilidad del compuesto y su absorción en células gastrointestinales, y demás propiedades ADME, se procedió a la preparación de la proteína. Esta se realizó por medio de la interfaz *Protein Preparation Wizard* Maestro, incluido en el paquete molecular de *Drug Design* Schrödinger, versión 2021-1. La estructura cristalina de la glucoproteína spike se extrajo de la Protein Data Bank (PDB) (ID: 6LZG, resolución: 2.50 Å) (Q. Wang et al., 2020). En su preparación se determinaron los estados de protonación a pH 7.2 con el uso del campo de fuerza OPLS4 (C. Lu et al., 2021), se optimizaron los átomos superpuestos, se adicionaron los protones faltantes y se refinó la estructura a través del *Protein Preparation Wizard* (Madhavi Sastry et al., 2013).

3.4 Estudios de screening virtual

El proceso de screening virtual se realizó por medio de la interfaz Maestro, incluido en el paquete molecular de *Drug Design* Schrödinger, versión 2021-1. Las estructuras químicas de los metabolitos se obtuvieron a través de la base de datos de la PubChem con su respectivo ID y fueron cargadas a la interfaz de Maestro 2021-1, Schrödinger, versión 2021-1 y se prepararon a través del módulo *LigPrep* (Madhavi Sastry et al., 2013) mediante el cual

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

se obtuvo la conformación de menor energía para cada metabolito, se estableció el pH (7.2) de los estados de protonación mediante el módulo PROPKA (Søndergaard et al., 2011) a través de un campo de fuerza denominado OPLS4 (*Optimized Potentials for Liquid Simulations*) al sistema (C. Lu et al., 2021). Se establecieron los parámetros del screening virtual a partir de los parámetros de la caja ($X = -36,652, Y = 29,8116, Z = 4,1656$; *longitud* = 20 Å). Los parámetros fueron elegidos según la metodología propuesta por (Petit et al., 2021) a través del módulo *Glide* (Friesner et al., 2004; Spitzer & Jain, 2012). El módulo *Glide* es proveniente de la interfaz de Maestro, Schrödinger versión 2021-1 con la herramienta del *Receptor Grid Generation* (Ban et al., 2018). Los ligandos fueron sometidos a los estudios de docking molecular con el módulo *Glide* a través de tres tipos de precisiones diferentes: HTVS (en inglés – High-Throughput Virtual Screening) donde se generaron tres poses por ligando y se descartó el 50% de los compuestos de la base de metabolitos; SP (en inglés – Standard Precision) donde se generaron tres poses por ligando y se descartó el 30% de los compuestos seleccionados en el paso previo; y XP (en inglés – Extra Precision) donde se generaron cinco poses por ligando y se seleccionaron veinte metabolitos (Prajapat et al., 2020) a través de parámetros como el docking score e inspección visual de las interacciones con aminoácidos como Y453, F456, E484, F486, N487, Y489, Q493, Q498 o Y505.

3.5 Análisis de MM-GBSA

Una vez fueron seleccionados los veinte mejores compuestos de acuerdo a su docking score y la inspección de las interacciones aminoacídicas, se llevó a cabo el análisis de energía libre por MM-GBSA (The Molecular Mechanics, the Generalized Born model and Solvent Accessibility). El análisis de energía libre se llevó a cabo con el módulo *Prime* de la interfaz

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

de Maestro, Schrödinger Drug Discover v. 2021-1 (Hayes & Archontis, 2012). Para la fase de cálculo se seleccionaron las cargas parciales para el ligando teniendo en cuenta el campo de fuerza OPLS4 (C. Lu et al., 2021) y se seleccionó el modelo de solvatación VSGB (J. Li et al., 2011). Se tuvo en cuenta la flexibilidad a una distancia de 5 Å de los ligandos hacia la proteína. Luego, para el proceso de minimización se seleccionó la minimización de todos los átomos para cada ligando. Por último, se insertó el número de trabajos (en inglés – jobs) que se realizará en el análisis y con su resultado se calculó la energía libre de doce metabolitos seleccionados a partir del screening virtual.

3.6 Simulaciones de dinámica molecular

A partir de los doce metabolitos seleccionados se seleccionó el ligando con el mejor perfil de acuerdo a su docking score, su energía libre, sus características biológicas y sus interacciones aminoacídicas. Se llevó a cabo un estudio de dinámica molecular al ligando seleccionado con el objetivo de evaluar la estabilidad de la unión proteína – ligando y sus contactos aminoacídicos. Para ello, se utilizó el módulo *Desmond System Builder* (Eid et al., 2013) cuyo modelo de solvatación empleado fue el TIP3P (Mark & Nilsson, 2001) donde se realizó la neutralización del sistema añadiendo iones sodio o cloro según el sistema proteína – ligando a evaluar por medio de un campo de fuerza OPLS4.

Se trabajó con una caja cubica con una distancia de 1 Å desde un átomo hasta una de las aristas para trabajar en la totalidad de la interface proteína-ligando. El proceso de equilibrio se llevó a cabo con el ensamblaje NPT (ensamblaje isotérmico-isobárico) (Uline & Corti, 2005) y con la implementación del termostato Berendsen (Lin et al., 2017). Para el proceso de minimización, se utilizaron condiciones de temperatura a 310 °K y de presión a 1.01325 bar teniendo en cuenta los algoritmos para el termostato de cadena Nose-Hoover

(Evans & Holian, 1998) y para el barómetro Martyna-Tobias-Klein (Rogge et al., 2015), respectivamente con un total de 800 frames. Todas las pruebas se simularon en un total de 200ns con un intervalo de simulación de 250 ps que se simuló por triplicado con trayectorias aleatorias de interacción de las moléculas dentro de la caja seleccionada. Las interacciones proteína-ligando y la estabilidad de la interface proteína-ligando fueron analizados mediante la herramienta *Simulations Interaction Diagram (SID)* para obtener los datos crudos de los contactos proteína-ligando, el RMSD de la proteína y del ligando.

3.7 Diseño de figuras

Las figuras fueron diseñadas con el uso del GraphPad Prism v. 8.0.1 a partir de los datos obtenidos por la herramienta *Simulations Interaction Diagram (SID)* de la interfaz Maestro Schrödinger Drug Discovery v. 2021-1.

A continuación, se analizarán los resultados obtenidos durante el proyecto de investigación.

4. Resultados y discusión

4.1 Análisis biológico y de interacción de los metabolitos seleccionados a partir del screening virtual

Como se observa en el Anexo 1, 4233 metabolitos de plantas medicinales se emplearon para la creación de la base de datos empleada en este proyecto de grado. A partir de la base de datos, se inició con el proceso de screening virtual a través de la precisión HTVS. En este paso, 2117 metabolitos, correspondiente al 50% de la base de datos, fueron seleccionados para la siguiente fase, los cuales obtuvieron resultados favorables con relación a su docking score e interacciones aminoacídicas. Luego, estos 2117 metabolitos continuaron su análisis por medio de un docking en precisión SP (en inglés – standard precision) donde

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

635 metabolitos obtuvieron un perfil más favorable a partir de sus interacciones aminoacídicas. Por último, estos 635 metabolitos obtenidos se analizaron a través de la precisión XP (en inglés – extra precision) donde doce metabolitos obtuvieron su mejor perfil de interacción en la interfaz proteína ligando, junto con su docking score (tabla 1). A partir de los doce metabolitos, se calculó la energía libre MM-GBSA proveniente de las interacciones aminoacídicas presentes en la interfaz glucoproteína spike – ligando.

De acuerdo con los perfiles biológicos presentados en la **tabla 1**, el shatavarin I y la protogracilina no cumplen con las reglas de Lipinski. Los parámetros de Lipinski que se violan en el caso del shatavarin I son los átomos donadores de H⁺ (14), los átomos aceptores de H⁺ (37,2) y su peso molecular (1067,227 g/mol). Mientras que, los parámetros de Lipinski que se violan en el caso de la protogracilina son los átomos donadores de H⁺ (14), los átomos aceptores de H⁺ (37,2) y su peso molecular (1065,211 g/mol). En relación a esto, los valores permitidos por las reglas de Lipinski no deben contener más de cinco donadores y diez aceptores de puentes de hidrógeno, junto a un peso molecular no superior a 500 uma (Benet et al., 2016). Dado que estos compuestos presentan violaciones a estas reglas de Lipinski, se descartaron como posibles compuestos a analizar con mayor profundidad. Por su parte, el sesquipinsapol B presenta el mejor porcentaje oral (69,924 %), una de las mejores absorciones en las células *Caco-2* (83,219) a pesar de tener un gran peso molecular (540,609 g/mol). De la misma manera, la D-galactosa, la tagatofuranosa y el leucopelargonidin poseen los porcentajes más altos de absorción oral (48,719%, 51,816%, y 62,553%, respectivamente) y en células *Caco-2* (83,532 nm/sec, 89,220 nm/sec, 76,723 nm/sec). Teniendo en cuenta estas propiedades, se examinó el perfil de interacción de la

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

tagatofuranosa, el leucopelargonidin, la D-galactosa y el sesquipinsapol B en la interfaz con la glucoproteína spike.

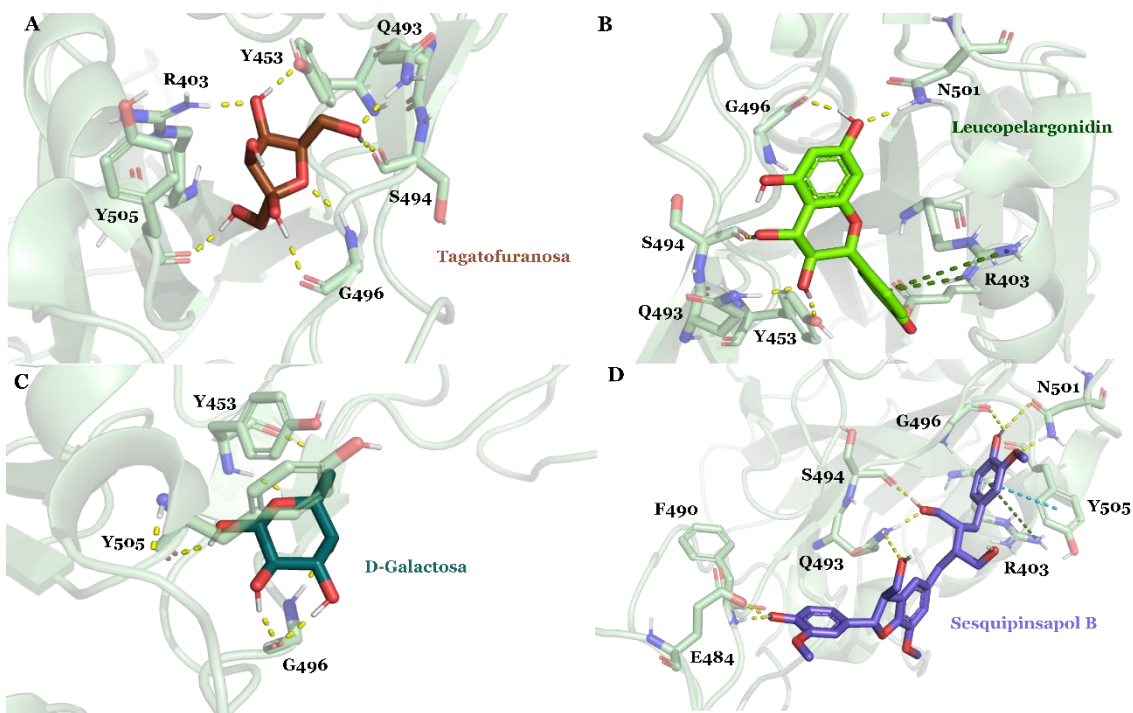
Tabla 1. *Perfil biológico y de interacción de los metabolitos seleccionados a través del screening virtual.*

Nombre	Log P	Caco-2 (nm/sec)	Donado r H+	Acept or H+	Peso molecular (g/mol)	Absorció n oral (%)	Regla de cinco	Docking score	Energía (kcal/mol)
Shatavarin I	-3,148	0,087	14	37,2	1067,227	0	3	-9,811	-68,48
Protogracil ina	-2,864	0,435	14	37,2	1065,211	0	3	-9,871	-58,59
Leucociani dol	-0,327	27,002	6	7,15	306,271	37,691	1	-9,163	-45,11
L- epicatequi na	0,469	53,201	5	5,45	290,272	60,584	0	-7,456	-53,57
Ehretiosid e B	-1,263	31,291	5	11,5	311,291	46,318	0	-7,269	-50,64
R- epicatequi na	0,470	53,974	5	5,45	290,272	60,702	0	-7,108	-52,05
Bergenina	-1,560	37,568	5	12,05	328,275	45,998	0	-6,835	-34,01
Tagatofura nosa	-1,715	89,220	5	8,3	180,157	51,816	0	-6,768	-48,15
Leucopelar gonidin	0,320	76,723	5	6,4	290,272	62,553	0	-6,705	-54,53
Robinetina	-0,177	15,811	5	6,25	302,240	47,366	0	-6,669	-48,31
D- Galactosa	-2,156	83,532	5	10,2	180,157	48,719	0	-6,650	-42,30
Sesquipins apol B	3,684	83,219	5	9,6	540,609	69,924	1	-6,639	-65,61

De igual forma, en la **tabla 1** se observan los resultados del docking score y la energía libre MM-GBSA de cada uno de los compuestos seleccionados como mejores posibles inhibidores de la glucoproteína spike. La tagatofuranosa (docking score: -6,768; energía libre: -48,15 kcal/mol) (**Tabla 1**) contiene interacciones relevantes con los residuos R403, Y453, Q496 y Y505 mediados por puentes de hidrógeno (**figura 5A**). Los resultados de docking sugieren que el metabolito se encuentra ubicado entre las zonas de contacto CR2 y CR3 (en inglés – contact region) conformadas por Y453, Q496 y Y505, respectivamente. Por su parte, el leucopelargonidin (docking score: -6,705; energía libre: -54,53 kcal/mol) (**Tabla 1**) presenta interacciones mediadas por puentes de hidrógeno en residuos importantes

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

como Q493, G496 y N501. Adicionalmente, el leucopelargonidin genera interacciones π -catión involucrando el residuo R403 (**figura 5B**). Los resultados de docking sugieren que el leucopelargonidin se encuentra ubicado en la zona de contacto CR2 (en inglés – contact region 2) conformada por los residuos Y453 - Q493. La D-galactosa (docking score: -6,650; energía libre: -42,30 kcal/mol) (**Tabla 1**) comprende interacciones relevantes mediadas por puentes de hidrógeno con los residuos Y453, G496 o Y505 (**Figura 5C**). Los resultados de docking sugieren que la D-galactosa se encuentra ubicado entre la zona de contacto CR1 y CR3 conformada por los residuos Y453 - Y505. El sesquipinsapol B (docking score -6,639; energía libre: -65,61 kcal/mol) (**Tabla 1**) comprende interacciones relevantes con puentes de hidrógeno con los residuos E484, Q493, G496, N501. Adicionalmente, se comprenden las interacciones π - π con el residuo Y505, y π -catión con el residuo R403 (**Figura 5D**). Los resultados de docking sugieren que el sesquipinsapol B se encuentra ubicado en las tres zonas de contacto (CR1, CR2, CR3) por los residuos E484- Q493, N501 - Y505.



GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

Figura 5. Representación gráfica de las poses del docking molecular de los metabolitos seleccionados.

Los residuos de la glucoproteína spike están coloreados de acuerdo con el tipo de átomo. (Color de la glucoproteína spike: verde pálido. Oxígeno: rojo. Nitrógeno: azul). Los ligandos están nombrados de A – D. (Tagatofuranosa (A - color siena). Leucopelargonidin (B - color verde amarillento). D-Galactosa (C – color cian oscuro). Sesquipinsapol B (D – color morado oscuro). Líneas punteadas representan las interacciones en la interfaz proteína ligando: interacciones por puentes de hidrógeno (color amarillo); interacciones π - π (color azul); interacciones π -catión (color verde).

Teniendo en cuenta la información anteriormente detallada, parámetros como las propiedades ADME, docking score, energía de afinidad, e interacciones con residuos importantes en la actividad de la proteína spike, se decidió continuar con el análisis de la estabilidad del sesquipinsapol B en el sitio de unión predicho por el docking a través de pruebas de dinámica molecular. A pesar de que no tiene el mejor docking score, su energía de afinidad es la segunda mejor dentro de los metabolitos evaluados. Además, su perfil biológico reúne características importantes como un gran porcentaje de absorción oral y en células Caco-2. Por último, el sesquipinsapol B es el único ligando involucrado en las tres zonas de contacto de la glucoproteína spike. De la misma manera, interacciones mediadas por puentes de hidrógeno con residuos como E484, F490, Q493, G496, N501, los cuales son relevantes en la formación de complejos en contacto con la enzima ACE2.

4.2 Análisis de estabilidad molecular de la interfaz proteína ligado a partir de dinámica molecular

A partir de la selección del sesquipinsapol B como posible mejor inhibidor de la proteína spike según resultados predichos por los ensayos de docking, surgió la necesidad de evaluar la estabilidad dentro de la interfaz proteína ligando. Por lo tanto, el sesquipinsapol B fue sometido a un triplicado de simulaciones por medio de dinámica molecular. Dentro de los parámetros estudiados en la dinámica molecular, se estudió el RMSD. El RMSD (en inglés – root mean square deviation) es la medida cuantitativa más utilizada para la comparación entre dos coordenadas atómicas (Kufareva & Abagyan, 2012). Las dos

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

coordenadas atómicas pueden ser interpretadas como dos hélices o dos estructuras proteicas de acuerdo a su tamaño estructural. La estabilidad de una proteína se fundamenta en las desviaciones presentes durante el curso de la simulación (Aier et al., 2016). Es decir, entre menos desviaciones existan, mayor estable es la proteína. Si el valor del RMSD es mucho mayor a 2.9 Å, la resolución y la estabilidad del complejo empiezan a decrecer (Carugo, 2003). En el estudio, el RMSD de la glucoproteína spike oscila entre 1 – 3 Å respondiendo a que la estabilidad de la estructura cristalina se mantiene a lo largo del tiempo (**ver figura 6A**). A comparación de la apoproteína, donde después de los 30 nano segundos se equilibra el sistema hasta el final del tiempo de simulación.

La oscilación de estos valores representa que los átomos de la proteína están en movimiento constante hasta alcanzar un equilibrio junto al ligando en el promedio de las réplicas (Verli, 2014). Para examinar el RMSD del sesquipinsapol B a lo largo del tiempo de simulación (**ver figura 6B**), se evaluó su concepto como el cambio estructural del ligando a partir de su estructura inicial (Verli, 2014).

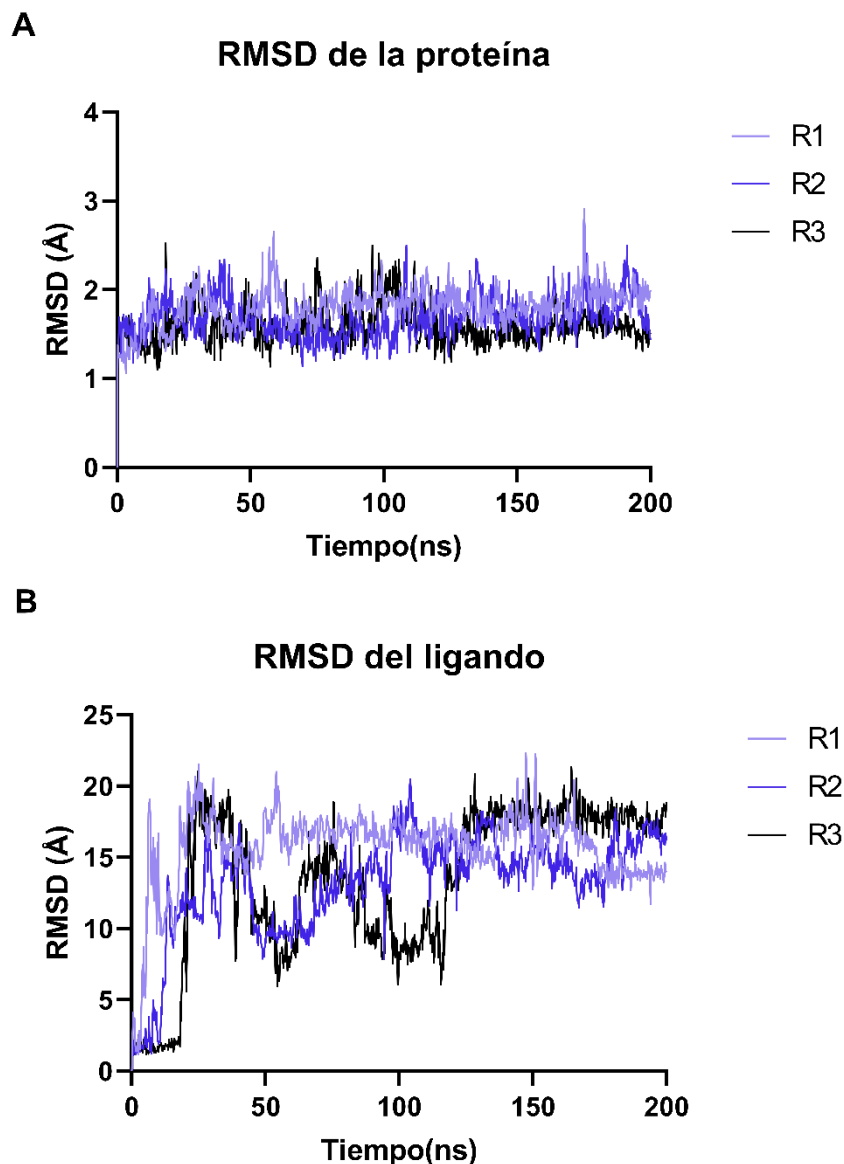


Figura 6. Representación del RMSD para la glucoproteína spike y el sesquipinsapol B (A) Simulación del RMSD para la estructura cristalina de la glucoproteína spike de 0 a 200ns. (B) Simulación del RMSD para el sesquipinsapol B de 0 a 200ns. Las líneas representadas por R1, R2 y R3 representan cada una de las réplicas realizadas en el proyecto de investigación.

En la R1 (replica 1), el ligando presenta la mayor estabilidad entre las réplicas propuestas en el estudio a partir del punto de partida cuyo valor oscila entre 0-20 Å. En la R2, el ligando presenta una fluctuación entre 50ns a 100ns sin alejarse del sitio de unión

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

propuesto a causa de un cambio conformacional (**ver figura 7A**) y se mantiene en la misma posición después de los 100ns (**ver figura 7B**).

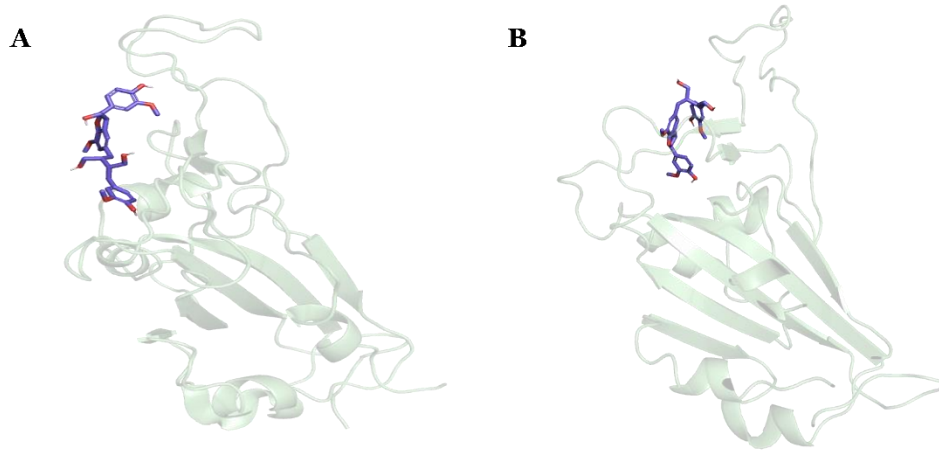


Figura 7. Representación de los cambios conformacionales en el ligando durante la réplica 2. Color de la glucoproteína spike: verde pálido. Color del sesquipinsapol B: morado oscuro. Oxígeno: rojo. (A) Representación de los cambios conformacionales del ligando a los 45ns de simulación. (B) Representación de los cambios conformacionales del ligando a los 80ns de simulación.

Por último, la R3 presenta fluctuaciones a los 30ns, 50ns y 120ns. Las fluctuaciones en 30ns sugieren un cambio en la ubicación del ligando sin salir de su sitio de interacción (**ver figura 8A**). Al llegar a los 50ns, el sesquipinsapol B continúa moviéndose a lo largo del sitio de unión sugerido y su tendencia permanece hasta los 100ns (**ver figura 8B**). Una vez la simulación supera los 100ns, el sesquipinsapol B permanece dentro del sitio de unión (**ver figura 8C**) y se convierte en la conformación más estable. Dicha conformación coincide con las dos replicas anteriores R1 y R2.

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

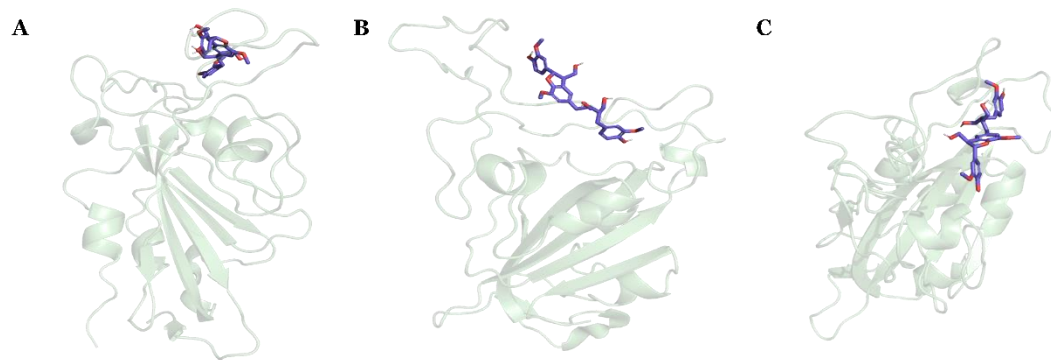


Figura 8. *Representación gráfica de los cambios conformacionales durante la réplica 3.* Color de la glucoproteína spike: verde pálido. Color del sesquipinsapol B: morado oscuro. Oxígeno: rojo. (A) Representación de los cambios conformacionales del ligando a los 30ns de simulación. (B) Representación de los cambios conformacionales del ligando a los 50ns de simulación. (C) Representación de los cambios conformacionales del ligando a los 120ns de simulación.

De acuerdo con las figuras 7 y 8, los cambios presentes en el RMSD del ligando se pueden deber a los cambios conformacionales por parte del sesquipinsapol B en las regiones de contacto sugeridas (CR1, CR2, CR3). Cabe destacar que dichos cambios presentes en el RMSD del ligando no sugieren que el sesquipinsapol B se aleje de su interfaz conformada por la glucoproteína spike.

4.3 Análisis de interacción aminoacídica a partir de dinámica molecular

La estabilidad del sesquipinsapol B a lo largo de la simulación de la dinámica molecular en el sitio de unión propuesto depende de las interacciones aminoacídicas en el sitio de unión propuesto a la enzima ACE2. Debido a esto es necesario analizar qué tipo de interacción se presenta y su frecuencia de interacción en la interfaz proteína ligando. Durante la simulación se puede observar que el sesquipinsapol B forma puentes de hidrógeno con los aminoácidos residuos N487, Y489 (ambos en la zona de contacto CR1) y A522 con frecuencias de del 22%, 19%, y 25%, respectivamente (**figura 9A**). La interacción con aminoácidos relevantes como el aminoácido N487, podría relacionarse con la disminución

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

de interacción entre la glucoproteína spike y la ACE2 (Laurini et al., 2021; Nelson-Sathi et al., 2022). De igual forma, el aminoácido Y489 participa en la conformación de la RBD al permitir que el glucano circundante (N343) desplace la región de dominio de enlace (RBD) de una conformación “cerrada” a “abierta” (Sztain et al., 2021). Las interacciones sobre el residuo Y489 podría generar una disminución de afinidad con respecto a la enzima ACE2 considerándose un posible sitio de evasión inmune del virus (Sharma et al., 2022). En adición al Y489, la participación del aminoácido A522 tiene lugar en las regiones subyacentes del subdominio S1 modificando la conformación estructural de “cerrado” a “abierto”. El cambio de conformación genera una estabilidad energética y vulnera las regiones RBD para la acción de otros ligandos (Peters et al., 2020). Dicha vulnerabilidad permite que el sesquipinsapol B interactúe con las zonas de contacto (en inglés – contact region) para inhibir su unión con la enzima ACE2.

Al igual en las interacciones de tipo puente de hidrógeno, el sesquipinsapol presenta interacciones hidrofóbicas con los residuos L455, F456, F486 y Y489 presentes dentro de la zona de contacto CR1 (**ver figura 9B**). El porcentaje de interacción para estos aminoácidos es del 13%, 12%, 13% y 14% respectivamente, donde la interacción del sesquipinsapol B con la dupla L455 – F456 disminuye el fortalecimiento de los sitios de conectividad alostéricos a lo largo de otros aminoácidos para mediar la interacción, comunicación y transmisión a partir de la enzima ACE2 con los RBD, así como la contribución en la estimulación del enlace viral entre ambos (Greaney et al., 2021; Kathiravan et al., 2021). Es decir que la interacción del sesquipinsapol B sobre la dupla L455 – F456 podría desactivar la interacción de los aminoácidos circundantes a las zonas de contacto con respecto a la

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

enzima ACE2. Así, el sesquipinsapol B podría bloquear la interacción entre la glucoproteína spike y la enzima ACE2.

Por otro lado, las interacciones mediadas por puentes de agua son redes de moléculas de agua que forma puentes de hidrógeno con dos átomos diferentes de una proteína (Law & Daggett, 2010). Las moléculas de agua se conectan a través de una serie de puentes de hidrógeno. Estas interacciones proveen estabilidad y elasticidad para mejorar la expresión de las funciones de la proteína (Petukhov et al., 1999; Sabarinathan et al., 2011). De acuerdo con la figura 6C, el sesquipinsapol presenta este tipo de interacciones con los residuos E484, Y489, y F490, los cuales tienen un porcentaje de interacción del 15%, 5%, y 9%, respectivamente (**ver figura 9C**). La presencia de interacciones aminoacídicas sobre el aminoácido E484 es vital ya que es el encargado del proceso de reconocimiento e identificación en el enlace con la ACE2 (Verkhivker et al., 2021). La presencia del sesquipinsapol B como posible inhibidor del SARS-CoV-2 permite al aminoácido E484 reconocer que se está enlazando con otro agente diferente a la enzima ACE2. Por lo tanto, dicho reconocimiento activa los agentes neutralizadores por medio de las interacciones con el sesquipinsapol B y generar un posible efecto inhibitorio. Así mismo, cualquier mutación o variante realizada sobre este aminoácido puede reducir 10 veces el potencial de neutralización proveniente de anticuerpos produciendo un escape inmune sobre la glucoproteína spike (Bhattacharya et al., 2022; Jangra et al., 2021).

Por último, se encuentran las interacciones π - π cuya responsabilidad es el aumento de la afinidad de interacción en relación con el inhibidor o ligando (Ferreira De Freitas & Schapira, 2017). De acuerdo con la figura 9D, el sesquipinsapol B presenta este tipo de interacción con los residuos F456 y Y489 presentan este tipo de interacción. Sus porcentajes

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

de interacción con la glucoproteína spike son del 10% y 11%, respectivamente. El residuo F456 podría desactivar la interacción de los aminoácidos circundantes a las zonas de contacto con respecto a la enzima ACE2. Las interacciones sobre el residuo Y489 podría generar una disminución de afinidad con respecto a la enzima ACE2 considerándose un posible sitio de evasión inmune del virus.

Finalmente, los resultados obtenidos por medio del sesquipinsapol B coinciden con los resultados reportados por (Padhi et al., 2021) donde reporta el potencial inhibitorio del arbidol como fármaco de referencia. El arbidol interactúa en las tres regiones de contacto conteniendo interacciones mediadas por puentes de hidrógeno con residuos como L455, F456, N487, Y489 o F490 (Padhi et al., 2021). De acuerdo a los resultados de dinámica molecular, el complejo proteína-arbidol es mucho más favorable con respecto a la proteína ligando original (Borisevich et al., 2022). Además, se ha reportado actividad *in vitro* en células HEK293T donde el arbidol inhibe la actividad del SARS-CoV-2 con un potencial de inhibición de $4.11 \mu M$ con un tiempo de 24 horas de tratamiento con DMSO (Shuster et al., 2021).

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

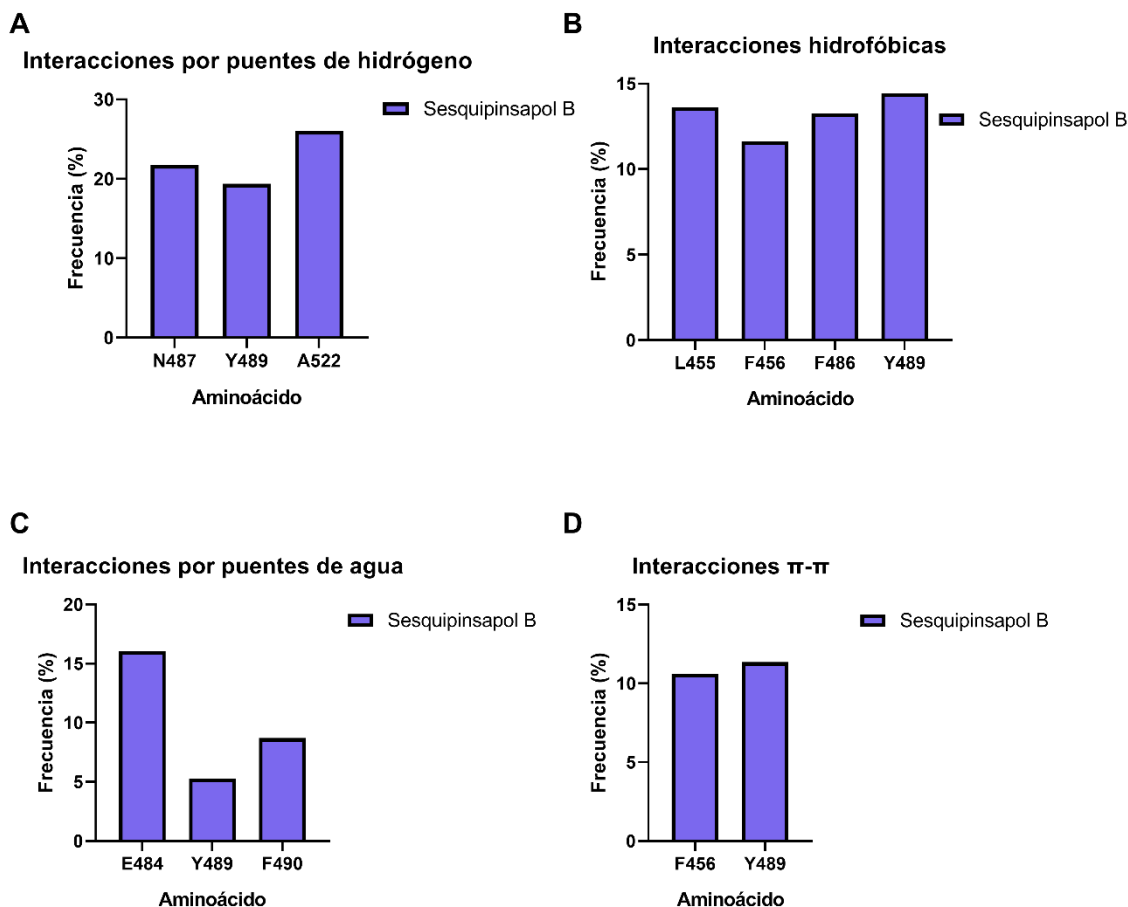


Figura 9. Porcentaje de interacción frecuencia del sesquipinsapol con residuos relevantes de la glucoproteína spike a lo largo de la simulación de 200ns. (A) Interacciones mediadas por puentes de hidrógeno. (B) Interacciones hidrofóbicas. (C) Interacciones mediadas por puentes de agua. (D) Interacciones tipo π - π . Faltan tildes en la gráfica en hidrógeno e hidrofóbicas

En resumen, nuestros resultados sugieren que el sesquipinsapol B podría ser un buen inhibidor de la infección viral ya que interactúa con aminoácidos críticos en el proceso de infección del virus tales como L455, F456, E484, Y489, A522, los cuales pueden generar sitios de evasión inmune del SARS-CoV-2. Además de fortalecer los canales de comunicación aminoacídicos mediante sitios de unión alostéricos como aminoácidos como L455, F456, y E484, vitales para el reconocimiento e identificación de la unión hacia la ACE2. Los resultados de dinámica molecular sugieren que el sesquipinsapol B se mantiene

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

a lo largo de los 200ns en el sitio de unión predicho, pese a las fluctuaciones del ligando en el sitio de unión, interactuando con los residuos anteriormente mencionados.

5. Conclusiones

- ✓ Durante el proceso de screening virtual, se identificaron al sesquipinsapol B, la D-galactosa, el leucopelargonidin y la tagatofuranosa como posibles inhibidores de la entrada del SARS-CoV-2 por medio de la glucoproteína spike, debido a las interacciones mediadas por puentes de hidrógeno con residuos aminoacídicos como E484, Q493, G496, N501 e interacciones de tipo π - π con residuos como R403 o Y505.
- ✓ Se destaca al sesquipinsapol B como el mejor posible inhibidor frente a la glucoproteína spike del SARS-CoV-2 debido a que sus interacciones mediadas por puentes de hidrógeno con aminoácidos como E484, Q493, G496, N501 y Y505 cuya función es la comunicación entre los aminoácidos y el reconocimiento del enlace con la enzima ACE2. Estas interacciones permitieron el cálculo de energía libre más alto evaluado de -65,61 kcal/mol.
- ✓ El sesquipinsapol B permanece estable en el sitio de unión con la glucoproteína spike propuesto por los ensayos de docking en un tiempo de simulación de 200ns. La glucoproteína spike se mantuvo estable dentro del rango de 1-3 Å con el paso del tiempo pese a que el sesquipinsapol B presentó fluctuaciones dentro del sitio de unión propuesto.

6. Recomendaciones

Se recomienda realizar ensayos *in vitro* de la actividad del sesquipinsapol B sobre la glucoproteína spike para corroborar la inhibición de la infección causada por el SARS-CoV-2. De igual forma, se recomienda realizar simulaciones mayores a los 200ns con el fin de confirmar la estabilidad del ligando dentro del sitio de unión y posibles cambios conformacionales en la proteína.

Agradecimientos

Agradecimientos al proyecto SGR BPIN 2020000100126 “Fortalecimiento de capacidades instaladas de CyT en el área de Epidemiología Molecular Viroológica de la sede UIS-Guatiguará para aplicación de herramientas para atender problemáticas asociadas con patógenos de alto riesgo para la salud humana Santander”.

Presentación de resultados en eventos

Se presentaron los resultados en el I Congreso Internacional de Ciencias Biomédicas (CICB) en los días 10 – 13 de noviembre de 2021. Este trabajo de grado hace parte del proyecto macro de Minciencias titulado “Fortalecimiento de capacidades instaladas de CyT en el área de Epidemiología Molecular Viroológica de la sede UIS-Guatiguará para aplicación de herramientas para atender problemáticas asociadas con patógenos de alto riesgo para la salud humana Santander”, del cual se realizó una publicación titulada “Repurposing of Four Drugs as Anti-SARS-CoV-2 agents and their interactions with protein targets” en la revista *Scientia Pharmaceutica* donde se obtiene una participación de coautoría del artículo científico.

Referencias bibliográficas

- Abagyan, R., Totrov, M., & Kuznetsov, D. (1994). ICM—A new method for protein modeling and design: Applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation. *Journal of Computational Chemistry*, *15*(5), 488–506.
<https://doi.org/10.1002/JCC.540150503>
- Aier, I., Varadwaj, P. K., & Raj, U. (2016). Structural insights into conformational stability of both wild-type and mutant EZH2 receptor. *Scientific Reports 2016 6:1*, *6*(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1038/srep34984>
- Aldeghi, M., Heifetz, A., Bodkin, M. J., Knapp, S., & Biggin, P. C. (2015). Accurate calculation of the absolute free energy of binding for drug molecules. *Chemical Science*, *7*(1), 207–218. <https://doi.org/10.1039/C5SC02678D>
- Baby, K., Maity, S., Mehta, C. H., Suresh, A., Nayak, U. Y., & Nayak, Y. (2021). SARS-CoV-2 entry inhibitors by dual targeting TMPRSS2 and ACE2: An in silico drug repurposing study. *European Journal of Pharmacology*, *896*, 173922.
<https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2021.173922>
- Ban, T., Ohue, M., & Akiyama, Y. (2018). Multiple grid arrangement improves ligand docking with unknown binding sites: Application to the inverse docking problem. *Computational Biology and Chemistry*, *73*, 139–146.
<https://doi.org/10.1016/J.COMPBIOLCHEM.2018.02.008>
- Benet, L. Z., Hosey, C. M., Ursu, O., & Oprea, T. I. (2016). BDDCS, the Rule of 5 and Drugability. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *101*, 89.
<https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2016.05.007>

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

- Bestle, D., Heindl, M. R., Limburg, H., van Lam van, T., Pilgram, O., Moulton, H., Stein, D. A., Harges, K., Eickmann, M., Dolnik, O., Rohde, C., Klenk, H. D., Garten, W., Steinmetzer, T., & Böttcher-Friebertshäuser, E. (2020). TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. *Life Science Alliance*, 3(9). <https://doi.org/10.26508/LSA.202000786>
- Bhar, A., Jain, A., & Das, S. (2022). Natural therapeutics against SARS CoV2: the potentiality and challenges. *Vegetos*, 1, 1–10. <https://doi.org/10.1007/S42535-022-00401-7/TABLES/1>
- Bhattacharya, M., Sharma, A. R., Dhama, K., Agoramoorthy, G., & Chakraborty, C. (2022). Omicron variant (B.1.1.529) of SARS-CoV-2: understanding mutations in the genome, S-glycoprotein, and antibody-binding regions. *GeroScience*, 44(2), 619–637. <https://doi.org/10.1007/S11357-022-00532-4/FIGURES/8>
- Bhuiyan, F. R., Howlader, S., Raihan, T., & Hasan, M. (2020). Plants Metabolites: Possibility of Natural Therapeutics Against the COVID-19 Pandemic. *Frontiers in Medicine*, 7, 444. <https://doi.org/10.3389/FMED.2020.00444/BIBTEX>
- Borisevich, S. S., Khamitov, E. M., Gureev, M. A., Yarovaya, O. I., Rudometova, N. B., Zybkina, A. v., Mordvinova, E. D., Shcherbakov, D. N., Maksyutov, R. A., & Salakhutdinov, N. F. (2022). Simulation of Molecular Dynamics of SARS-CoV-2 S-Protein in the Presence of Multiple Arbidol Molecules: Interactions and Binding Mode Insights. *Viruses*, 14(1), 119. <https://doi.org/10.3390/V14010119/S1>
- Bosch, B. J., Zee, R. van der, Haan, C. A. M. de, & Rottier, P. J. M. (2003). The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

Characterization of the Fusion Core Complex. *Journal of Virology*, 77(16), 8801.

<https://doi.org/10.1128/JVI.77.16.8801-8811.2003>

Cai, Y., Zhang, J., Xiao, T., Peng, H., Sterling, S. M., Walsh, R. M., Rawson, S., Rits-Volloch, S., & Chen, B. (2020). Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. *Science*, 369(6511).

https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABD4251/SUPPL_FILE/ABD4251-CAI-SM.PDF

Carugo, O. (2003). How root-mean-square distance (r.m.s.d.) values depend on the resolution of protein structures that are compared. *Journal of Applied Crystallography*, 36(1), 125–128. <https://doi.org/10.1107/S0021889802020502>

Cascella, M., Rajnik, M., Cuomo, A., Dulebohn, S. C., & di Napoli, R. (2020). Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19). *StatPearls*.

Chen, H.-Y., Huang, C., Tian, L., Huang, X., Zhang, C., Llewellyn, G. N., Rogers, G. L., Andresen, K., O’Gorman, M. R. G., Chen, Y.-W., & Cannon, P. M. (2021). Cytoplasmic Tail Truncation of SARS-CoV-2 Spike Protein Enhances Titer of Pseudotyped Vectors but Masks the Effect of the D614G Mutation. *Journal of Virology*, 95(22). <https://doi.org/10.1128/JVI.00966-21>

Chikhale, R. v., Gurav, S. S., Patil, R. B., Sinha, S. K., Prasad, S. K., Shakya, A., Shrivastava, S. K., Gurav, N. S., & Prasad, R. S. (2021). Sars-cov-2 host entry and replication inhibitors from Indian ginseng: an in-silico approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(12), 4510–4521. https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1778539/SUPPL_FILE/TBSD_A_1778539_S M4608.PDF

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

Choudhary, S., Malik, Y. S., & Tomar, S. (2020). Identification of SARS-CoV-2 Cell Entry Inhibitors by Drug Repurposing Using in silico Structure-Based Virtual Screening

Approach. *Frontiers in Immunology*, *11*, 1664.

<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.01664/BIBTEX>

Cournia, Z., Allen, B., & Sherman, W. (2017). Relative Binding Free Energy Calculations

in Drug Discovery: Recent Advances and Practical Considerations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *57*(12), 2911–2937.

https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.7B00564/ASSET/IMAGES/CI-2017-00564W_M005.GIF

de Groot, R. J., Baker, S. C., Baric, R. S., Brown, C. S., Drosten, C., Enjuanes, L.,

Fouchier, R. A. M., Galiano, M., Gorbalenya, A. E., Memish, Z. A., Perlman, S.,

Poon, L. L. M., Snijder, E. J., Stephens, G. M., Woo, P. C. Y., Zaki, A. M., Zambon,

M., & Ziebuhr, J. (2013). Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-

CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *Journal of Virology*, *87*(14),

7790–7792. <https://doi.org/10.1128/JVI.01244-13>

de Wit, E., van Doremalen, N., Falzarano, D., & Munster, V. J. (2016). SARS and MERS:

recent insights into emerging coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology* *2016* *14*:8,

14(8), 523–534. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.81>

Deng, X., Garcia-Knight, M. A., Khalid, M. M., Servellita, V., Wang, C., Morris, M. K.,

Sotomayor-González, A., Glasner, D. R., Reyes, K. R., Gliwa, A. S., Reddy, N. P.,

Sanchez San Martin, C., Federman, S., Cheng, J., Balcerak, J., Taylor, J., Streithorst,

J. A., Miller, S., Sreekumar, B., ... Chiu, C. Y. (2021). Transmission, infectivity, and

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

neutralization of a spike L452R SARS-CoV-2 variant. *Cell*, 184(13), 3426-3437.e8.

<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2021.04.025>

Duan, L., Zheng, Q., Zhang, H., Niu, Y., Lou, Y., & Wang, H. (2020). The SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Biosynthesis, Structure, Function, and Antigenicity: Implications for the Design of Spike-Based Vaccine Immunogens. *Frontiers in Immunology*, 11, 2593. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.576622/XML/NLM>

Durrant, J. D., & McCammon, J. A. (2011). Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biology*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-71/FIGURES/4>

Eid, S., Zalewski, A., Smieško, M., Ernst, B., & Vedani, A. (2013). A Molecular-Modeling Toolbox Aimed at Bridging the Gap between Medicinal Chemistry and Computational Sciences. *International Journal of Molecular Sciences* 2013, Vol. 14, Pages 684-700, 14(1), 684–700. <https://doi.org/10.3390/IJMS14010684>

Ekins, S., Mestres, J., & Testa, B. (2007). In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *British Journal of Pharmacology*, 152(1), 9. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0707305>

Eldridge, M. D., Murray, C. W., Auton, T. R., Paolini, G. v., & Mee, R. P. (1997). Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 1997 11:5, 11(5), 425–445. <https://doi.org/10.1023/A:1007996124545>

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

- Evans, D. J., & Holian, B. L. (1998). The Nose–Hoover thermostat. *The Journal of Chemical Physics*, 83(8), 4069. <https://doi.org/10.1063/1.449071>
- Ferreira De Freitas, R., & Schapira, M. (2017). A systematic analysis of atomic protein–ligand interactions in the PDB. *MedChemComm*, 8(10), 1970. <https://doi.org/10.1039/C7MD00381A>
- Fisher, D., & Heymann, D. (2020). Q&A: The novel coronavirus outbreak causing COVID-19. *BMC Medicine*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/S12916-020-01533-W>
- Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., Repasky, M. P., Knoll, E. H., Shelley, M., Perry, J. K., Shaw, D. E., Francis, P., & Shenkin, P. S. (2004). Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7), 1739–1749. https://doi.org/10.1021/JM0306430/SUPPL_FILE/JM0306430_S.PDF
- Ganjhu, R. K., Mudgal, P. P., Maity, H., Dowarha, D., Devadiga, S., Nag, S., & Arunkumar, G. (2015). Herbal plants and plant preparations as remedial approach for viral diseases. *VirusDisease 2015 26:4*, 26(4), 225–236. <https://doi.org/10.1007/S13337-015-0276-6>
- Gorbalenya, A. E., Snijder, E. J., & Spaan, W. J. M. (2004). Severe acute respiratory syndrome coronavirus phylogeny: toward consensus. *Journal of Virology*, 78(15), 7863–7866. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.15.7863-7866.2004>

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

- Gorgun, D., Lihan, M., Kapoor, K., & Tajkhorshid, E. (2021). Binding mode of SARS-CoV-2 fusion peptide to human cellular membrane. *Biophysical Journal*, *120*(14), 2914–2926. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2021.02.041>
- Gralinski, L. E., & Menachery, V. D. (2020). Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses*, *12*(2). <https://doi.org/10.3390/V12020135>
- Greaney, A. J., Loes, A. N., Crawford, K. H. D., Starr, T. N., Malone, K. D., Chu, H. Y., & Bloom, J. D. (2021). Comprehensive mapping of mutations in the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human plasma antibodies. *Cell Host & Microbe*, *29*(3), 463-476.e6. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2021.02.003>
- Guedes, I. A., Pereira, F. S. S., & Dardenne, L. E. (2018). Empirical scoring functions for structure-based virtual screening: Applications, critical aspects, and challenges. *Frontiers in Pharmacology*, *9*(SEP), 1089. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2018.01089/XML/NLM>
- Halgren, T. A., Murphy, R. B., Friesner, R. A., Beard, H. S., Frye, L. L., Pollard, W. T., & Banks, J. L. (2004). Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, *47*(7), 1750–1759. <https://doi.org/10.1021/JM030644S>
- Harrison, A. G., Lin, T., & Wang, P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends in Immunology*, *41*(12), 1100–1115. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2020.10.004>

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

- Harvey, W. T., Carabelli, A. M., Jackson, B., Gupta, R. K., Thomson, E. C., Harrison, E. M., Ludden, C., Reeve, R., Rambaut, A., Peacock, S. J., & Robertson, D. L. (2021). SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nature Reviews Microbiology* 2021 19:7, 19(7), 409–424. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00573-0>
- Hayes, J. M., & Archontis, G. (2012). MM-GB(PB)SA Calculations of Protein-Ligand Binding Free Energies. *Molecular Dynamics - Studies of Synthetic and Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.5772/37107>
- Heinzelmann, G., & Gilson, M. K. (2021). Automation of absolute protein-ligand binding free energy calculations for docking refinement and compound evaluation. *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80769-1>
- Helmy, Y. A., Fawzy, M., Elaswad, A., Sobieh, A., Kenney, S. P., & Shehata, A. A. (2020). The COVID-19 Pandemic: A Comprehensive Review of Taxonomy, Genetics, Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control. *Journal of Clinical Medicine* 2020, Vol. 9, Page 1225, 9(4), 1225. <https://doi.org/10.3390/JCM9041225>
- Henderson, R., Edwards, R. J., Mansouri, K., Janowska, K., Stalls, V., Gobeil, S., Kopp, M., Hsu, A., Borgnia, M., Parks, R., Haynes, B. F., & Acharya, P. (2020). Controlling the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Conformation. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.05.18.102087>
- Hilmi, Z. A., Aloufi, B. H., & Ibrahim, H. M. (2020). A review on SARS-CoV-2: the origin, taxonomy, transmission, diagnosis, clinical manifestations, treatment and prophylaxis. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 11(3), 052–066. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2020.11.3.0156>

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

- Hoffmann, M., Arora, P., Groß, R., Seidel, A., Hörnich, B. F., Hahn, A. S., Krüger, N., Graichen, L., Hofmann-Winkler, H., Kempf, A., Winkler, M. S., Schulz, S., Jäck, H. M., Jahrsdörfer, B., Schrezenmeier, H., Müller, M., Kleger, A., Münch, J., & Pöhlmann, S. (2021). SARS-CoV-2 variants B.1.351 and P.1 escape from neutralizing antibodies. *Cell*, *184*(9), 2384-2393.e12. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2021.03.036>
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., & Pöhlmann, S. (2020). A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Molecular Cell*, *78*(4), 779-784.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.022>
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, *181*(2), 271-280.e8. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.02.052>
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2020). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology* *2020 19:3*, *19*(3), 141–154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Huang, S. Y., & Zou, X. (2010). Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking. *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(8), 3016. <https://doi.org/10.3390/IJMS11083016>
- Huang, Y., Yang, C., Xu, X. feng, Xu, W., & Liu, S. wen. (2020). Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica* 2020 41:9, 41(9), 1141–1149.

<https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>

Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J., & Goodsell, D. S. (2007). A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *Journal of Computational Chemistry*, 28(6), 1145–1152. <https://doi.org/10.1002/JCC.20634>

Ioakimidis, L., Thoukydidis, L., Mirza, A., Naeem, S., & Reynisson, J. (2008).

Benchmarking the Reliability of QikProp. Correlation between Experimental and Predicted Values. *QSAR & Combinatorial Science*, 27(4), 445–456.

<https://doi.org/10.1002/QSAR.200730051>

Jangra, S., Ye, C., Rathnasinghe, R., Stadlbauer, D., Krammer, F., Simon, V., Martinez-Sobrido, L., Garcia-Sastre, A., & Schotsaert, M. (2021). The E484K mutation in the SARS-CoV-2 spike protein reduces but does not abolish neutralizing activity of human convalescent and post-vaccination sera. *MedRxiv : The Preprint Server for Health Sciences*. <https://doi.org/10.1101/2021.01.26.21250543>

Jena, A. B., Kanungo, N., Nayak, V., Chainy, G. B. N., & Dandapat, J. (2021). Catechin and curcumin interact with S protein of SARS-CoV2 and ACE2 of human cell membrane: insights from computational studies. *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81462-7>

Jorgensen, W. L., Ruiz-Caro, J., Tirado-Rives, J., Basavapathruni, A., Anderson, K. S., & Hamilton, A. D. (2006). Computer-aided design of non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16(3), 663–667. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2005.10.038>

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

Jorgensen, W. L., & Tirado-Rives, J. (1988). The OPLS Potential Functions for Proteins.

Energy Minimizations for Crystals of Cyclic Peptides and Crambin. *Journal of the American Chemical Society*, *110*(6), 1657–1666.

https://doi.org/10.1021/JA00214A001/ASSET/JA00214A001.FP.PNG_V03

Kanwar, A., Selvaraju, S., & Esper, F. (2017). Human Coronavirus-HKU1 Infection

Among Adults in Cleveland, Ohio. *Open Forum Infectious Diseases*, *4*(2).

<https://doi.org/10.1093/OFID/OFX052>

Kathiravan, M. K., Radhakrishnan, S., Namasivayam, V., & Palaniappan, S. (2021). An

Overview of Spike Surface Glycoprotein in Severe Acute Respiratory Syndrome–
Coronavirus. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *8*.

<https://doi.org/10.3389/FMOLB.2021.637550/FULL>

Khare, S., Azevedo, M., Parajuli, P., & Gokulan, K. (2021). Conformational Changes of the

Receptor Binding Domain of SARS-CoV-2 Spike Protein and Prediction of a B-Cell
Antigenic Epitope Using Structural Data. *Frontiers in Artificial Intelligence*, *4*, 31.

<https://doi.org/10.3389/FRAI.2021.630955/XML/NLM>

Khater, S., Anand, S., & Mohanty, D. (2016). In silico methods for linking genes and

secondary metabolites: The way forward. *Synthetic and Systems Biotechnology*, *1*(2),

80–88. <https://doi.org/10.1016/J.SYNBIO.2016.03.001>

Kirchdoerfer, R. N., Wang, N., Pallesen, J., Wrapp, D., Turner, H. L., Cottrell, C. A.,

Corbett, K. S., Graham, B. S., McLellan, J. S., & Ward, A. B. (2018). Stabilized
coronavirus spikes are resistant to conformational changes induced by receptor

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

recognition or proteolysis. *Scientific Reports* 2018 8:1, 8(1), 1–11.

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-34171-7>

Kirtipal, N., Bharadwaj, S., & Kang, S. G. (2020). From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 85, 104502.

<https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2020.104502>

Koch, J., Uckelely, Z. M., Doldan, P., Stanifer, M., Boulant, S., & Lozach, P.-Y. (2021). TMPRSS2 expression dictates the entry route used by SARS-CoV-2 to infect host cells. *The EMBO Journal*, 40(16), e107821.

<https://doi.org/10.15252/EMBJ.2021107821>

Koppiseti, R. K., Fulcher, Y. G., & van Doren, S. R. (2021). Fusion Peptide of SARS-CoV-2 Spike Rearranges into a Wedge Inserted in Bilayered Micelles. *Journal of the American Chemical Society*, 143(33), 13205–13211.

https://doi.org/10.1021/JACS.1C05435/ASSET/IMAGES/LARGE/JA1C05435_0005.JPEG

Kufareva, I., & Abagyan, R. (2012). Methods of protein structure comparison. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 857, 231. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-588-6_10

Laurini, E., Marson, D., Aulic, S., Fermeglia, A., & Pricl, S. (2021). Computational Mutagenesis at the SARS-CoV-2 Spike Protein/Angiotensin-Converting Enzyme 2 Binding Interface: Comparison with Experimental Evidence. *ACS Nano*, 15(4), 6929–6948.

https://doi.org/10.1021/ACSNANO.0C10833/SUPPL_FILE/NN0C10833_SI_002.PDF

F

Law, P. B., & Daggett, V. (2010). The relationship between water bridges and the polyproline II conformation: a large-scale analysis of molecular dynamics simulations and crystal structures. *Protein Engineering, Design and Selection*, 23(1), 27.

<https://doi.org/10.1093/PROTEIN/GZP069>

Leach, A. R. (2001). Empirical Force Field Models: Molecular Mechanics. *Molecular Modelling: Principles and Applications*, 165–252.

https://books.google.com/books/about/Molecular_Modelling.html?id=kB7jsbV-uhkC

Lee, M. Y., & Hu, T. (2019). Computational Methods for the Discovery of Metabolic Markers of Complex Traits. *Metabolites 2019, Vol. 9, Page 66*, 9(4), 66.

<https://doi.org/10.3390/METABO9040066>

Li, G., & de Clercq, E. (2020). Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). *Nature Reviews Drug Discovery 2021 19:3*, 19(3), 149–150.

<https://doi.org/10.1038/d41573-020-00016-0>

Li, J., Abel, R., Zhu, K., Cao, Y., Zhao, S., & Friesner, R. A. (2011). The VSGB 2.0 model: A next generation energy model for high resolution protein structure modeling.

Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 79(10), 2794–2812.

<https://doi.org/10.1002/PROT.23106>

Lin, Y., Pan, D., Li, J., Zhang, L., & Shao, X. (2017). Application of Berendsen barostat in dissipative particle dynamics for nonequilibrium dynamic simulation. *The Journal of Chemical Physics*, 146(12), 124108.

<https://doi.org/10.1063/1.4978807>

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

- Liu, J., Bodnar, B. H., Meng, F., Khan, A. I., Wang, X., Saribas, S., Wang, T., Lohani, S. C., Wang, P., Wei, Z., Luo, J., Zhou, L., Wu, J., Luo, G., Li, Q., Hu, W., & Ho, W. (2021). Epigallocatechin gallate from green tea effectively blocks infection of SARS-CoV-2 and new variants by inhibiting spike binding to ACE2 receptor. *Cell and Bioscience*, *11*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S13578-021-00680-8/FIGURES/6>
- Liu, Z., VanBlargan, L. A., Bloyet, L. M., Rothlauf, P. W., Chen, R. E., Stumpf, S., Zhao, H., Errico, J. M., Theel, E. S., Liebeskind, M. J., Alford, B., Buchser, W. J., Ellebedy, A. H., Fremont, D. H., Diamond, M. S., & Whelan, S. P. J. (2021). Identification of SARS-CoV-2 spike mutations that attenuate monoclonal and serum antibody neutralization. *Cell Host & Microbe*, *29*(3), 477-488.e4. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2021.01.014>
- Lu, C., Wu, C., Ghoreishi, D., Chen, W., Wang, L., Damm, W., Ross, G. A., Dahlgren, M. K., Russell, E., von Bargen, C. D., Abel, R., Friesner, R. A., & Harder, E. D. (2021). OPLS4: Improving force field accuracy on challenging regimes of chemical space. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *17*(7), 4291–4300. https://doi.org/10.1021/ACS.JCTC.1C00302/SUPPL_FILE/CT1C00302_SI_002.ZIP
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., ... Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, *395*(10224), 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8/ATTACHMENT/1686D69B-3F2C-44B2-A8A5-C648EF9D1C2B/MMC1.PDF](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8/ATTACHMENT/1686D69B-3F2C-44B2-A8A5-C648EF9D1C2B/MMC1.PDF)

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

Madhavi Sastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., & Sherman, W. (2013).

Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 2013 27:3, 27(3), 221–234. <https://doi.org/10.1007/S10822-013-9644-8>

Mahmud, S., Afrose, S., Biswas, S., Nagata, A., Paul, G. K., Mita, M. A., Hasan, M. R.,

Shimu, M. S. S., Zaman, S., Uddin, M. S., Islam, M. S., & Saleh, M. A. (2022). Plant-derived compounds effectively inhibit the main protease of SARS-CoV-2: An in silico approach. *PLOS ONE*, 17(8), e0273341.

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0273341>

Malik, Y. A. (2020). Properties of coronavirus and SARS-CoV-2. *Malaysian Journal of Pathology*, 42(1), 3–11.

https://www.unboundmedicine.com/medline/citation/32342926/Properties_of_Coronavirus_and_SARS_CoV_2_

Mamedov, T., Yuksel, D., Ilgin, M., Gurbuzaslan, I., Gulec, B., Yetiskin, H., Uygut, M. A.,

Islam Pavel, S. T., Ozdarendeli, A., Mammadova, G., Say, D., & Hasanova, G. (2021).

Plant-Produced Glycosylated and In Vivo Deglycosylated Receptor Binding Domain Proteins of SARS-CoV-2 Induce Potent Neutralizing Responses in Mice. *Viruses*

2021, Vol. 13, Page 1595, 13(8), 1595. <https://doi.org/10.3390/V13081595>

Marín-Palma, D., Tabares-Guevara, J. H., Zapata-Cardona, M. I., Flórez-álvarez, L., Yepes,

L. M., Rugeles, M. T., Zapata-Builes, W., Hernandez, J. C., & Taborda, N. A. (2021).

Curcumin Inhibits In Vitro SARS-CoV-2 Infection In Vero E6 Cells through Multiple

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

Antiviral Mechanisms. *Molecules*, 26(22).

<https://doi.org/10.3390/MOLECULES26226900>

Mark, P., & Nilsson, L. (2001). Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K. *Journal of Physical Chemistry A*, 105(43), 9954–9960.

<https://doi.org/10.1021/JP003020W>

Mavrodiev, E. v., Tursky, M. L., Mavrodiev, N. E., Ebach, M. C., & Williams, D. M.

(2020). On Classification and Taxonomy of Coronaviruses (Riboviria, Nidovirales, Coronaviridae) with special focus on severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-Cov-2). *BioRxiv*, 2020.10.17.343749.

<https://doi.org/10.1101/2020.10.17.343749>

Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*, 7(2), 146. <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>

Mlcochova, P., Kemp, S. A., Dhar, M. S., Papa, G., Meng, B., Ferreira, I. A. T. M., Datir, R., Collier, D. A., Albecka, A., Singh, S., Pandey, R., Brown, J., Zhou, J., Goonawardane, N., Mishra, S., Whittaker, C., Mellan, T., Marwal, R., Datta, M., ... Gupta, R. K. (2021). SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion. *Nature* 2021 599:7883, 599(7883), 114–119. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03944-y>

Nelson-Sathi, S., Umasankar, P. K., Sreekumar, E., Nair, R. R., Joseph, I., Nori, S. R. C., Philip, J. S., Prasad, R., Navyasree, K. v., Ramesh, S., Pillai, H., Ghosh, S., Santosh Kumar, T. R., & Pillai, M. R. (2022). Mutational landscape and in silico structure

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

models of SARS-CoV-2 spike receptor binding domain reveal key molecular determinants for virus-host interaction. *BMC Molecular and Cell Biology*, 23(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12860-021-00403-4/FIGURES/6>

Ou, X., Liu, Y., Lei, X., Li, P., Mi, D., Ren, L., Guo, L., Guo, R., Chen, T., Hu, J., Xiang, Z., Mu, Z., Chen, X., Chen, J., Hu, K., Jin, Q., Wang, J., & Qian, Z. (2020).

Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15562-9>

Padhi, A. K., Seal, A., Khan, J. M., Ahamed, M., & Tripathi, T. (2021). Unraveling the mechanism of arbidol binding and inhibition of SARS-CoV-2: Insights from atomistic simulations. *European Journal of Pharmacology*, 894, 173836.

<https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2020.173836>

Papageorgiou, A. C., & Mohsin, I. (2020). The SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein as a Drug and Vaccine Target: Structural Insights into Its Complexes with ACE2 and Antibodies. *Cells* 2020, Vol. 9, Page 2343, 9(11), 2343.

<https://doi.org/10.3390/CELLS9112343>

Pawłowski, P. H. (2021). Additional Positive Electric Residues in the Crucial Spike Glycoprotein S Regions of the New SARS-CoV-2 Variants. *Infection and Drug Resistance*, 14, 5099–5105. <https://doi.org/10.2147/IDR.S342068>

Peters, M. H., Bastidas, O., Kokron, D. S., & Henze, C. E. (2020). Static all-atom energetic mappings of the SARS-Cov-2 spike protein and dynamic stability analysis of “Up”

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

versus “Down” protomer states. *PloS One*, 15(11).

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0241168>

Petit, L., Vernès, L., & Cadoret, J. P. (2021). Docking and in silico toxicity assessment of Arthrospira compounds as potential antiviral agents against SARS-CoV-2. *Journal of Applied Phycology*, 33(3), 1579–1602. <https://doi.org/10.1007/S10811-021-02372-9/TABLES/7>

Petukhov, M., Cregut, D., Soares, C. M., & Serrano, L. (1999). Local water bridges and protein conformational stability. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 8(10), 1982. <https://doi.org/10.1110/PS.8.10.1982>

Planas, D., Veyer, D., Baidaliuk, A., Staropoli, I., Guivel-Benhassine, F., Rajah, M. M., Planchais, C., Porrot, F., Robillard, N., Puech, J., Prot, M., Gallais, F., Gantner, P., Velay, A., le Guen, J., Kassis-Chikhani, N., Edriss, D., Belec, L., Seve, A., ... Schwartz, O. (2021). Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature* 2021 596:7871, 596(7871), 276–280. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03777-9>

Prajapat, M., Shekhar, N., Sarma, P., Avti, P., Singh, S., Kaur, H., Bhattacharyya, A., Kumar, S., Sharma, S., Prakash, A., & Medhi, B. (2020). Virtual screening and molecular dynamics study of approved drugs as inhibitors of spike protein S1 domain and ACE2 interaction in SARS-CoV-2. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 101, 107716. <https://doi.org/10.1016/J.JMGM.2020.107716>

Prashantha, C. N., Gouthami, K., Lavanya, L., Bhavanam, S., Jakhar, A., Shakthiraju, R. G., Suraj, V., Sahana, K. v., Sujana, H. S., Guruprasad, N. M., & Ramachandra, R.

(2021). Molecular screening of antimalarial, antiviral, anti-inflammatory and HIV protease inhibitors against spike glycoprotein of coronavirus. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 102, 107769. <https://doi.org/10.1016/J.JMGM.2020.107769>

Premkumar, L., Segovia-Chumbez, B., Jadi, R., Martinez, D. R., Raut, R., Markmann, A. J., Cornaby, C., Bartelt, L., Weiss, S., Park, Y., Edwards, C. E., Weimer, E., Scherer, E. M., Roupael, N., Edupuganti, S., Weiskopf, D., Tse, L. v., Hou, Y. J., Margolis, D., ... de Silva, A. M. (2020). The receptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Science Immunology*, 5(48).
<https://doi.org/10.1126/SCIIMMUNOL.ABC8413>

Pruijssers, A. J., George, A. S., Schäfer, A., Leist, S. R., Gralinski, L. E., Dinnon, K. H., Yount, B. L., Agostini, M. L., Stevens, L. J., Chappell, J. D., Lu, X., Hughes, T. M., Gully, K., Martinez, D. R., Brown, A. J., Graham, R. L., Perry, J. K., du Pont, V., Pitts, J., ... Sheahan, T. P. (2020). Remdesivir Inhibits SARS-CoV-2 in Human Lung Cells and Chimeric SARS-CoV Expressing the SARS-CoV-2 RNA Polymerase in Mice. *Cell Reports*, 32(3).
<https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2020.107940/ATTACHMENT/26A67130-E9F0-47A2-BB9F-E9C45D2AF93B/MMC1.PDF>

Rogge, S. M. J., Vanduyfhuys, L., Ghysels, A., Waroquier, M., Verstraelen, T., Maurin, G., & van Speybroeck, V. (2015). A Comparison of Barostats for the Mechanical Characterization of Metal-Organic Frameworks. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 11(12), 5583–5597.
https://doi.org/10.1021/ACS.JCTC.5B00748/SUPPL_FILE/CT5B00748_SI_001.PDF

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

Rollinger, J. M., Stuppner, H., & Langer, T. (2008). Virtual screening for the discovery of bioactive natural products. *Natural Compounds as Drugs Volume I*, 65, 211.

https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8117-2_6

Runfeng, L., Yunlong, H., Jicheng, H., Weiqi, P., Qin Hai, M., Yongxia, S., Chufang, L., Jin, Z., Zhenhua, J., Haiming, J., Kui, Z., Shuxiang, H., Jun, D., Xiaobo, L., Xiaotao, H., Lin, W., Nanshan, Z., & Zifeng, Y. (2020). Lianhuaqingwen exerts anti-viral and anti-inflammatory activity against novel coronavirus (SARS-CoV-2).

Pharmacological Research, 156, 104761.

<https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2020.104761>

Sabarinathan, R., Aishwarya, K., Sarani, R., Vaishnavi, M. K., & Sekar, K. (2011). Water-mediated ionic interactions in protein structures. *Journal of Biosciences*, 36(2), 253–

263. <https://doi.org/10.1007/S12038-011-9067-4>

Salmaso, V., & Moro, S. (2018). Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: An overview. *Frontiers in*

Pharmacology, 9(AUG), 923.

<https://doi.org/10.3389/FPHAR.2018.00923/XML/NLM>

Saxena, S. K., Kumar, S., Baxi, P., Srivastava, N., Puri, B., & Ratho, R. K. (2020). Chasing COVID-19 through SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *VirusDisease*, 31(4), 399.

<https://doi.org/10.1007/S13337-020-00642-7>

Shang, J., Ye, G., Shi, K., Wan, Y., Luo, C., Aihara, H., Geng, Q., Auerbach, A., & Li, F. (2020). Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature* 2020

581:7807, 581(7807), 221–224. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y>

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

- Shanmugarajan, D., P., Kumar, B. R. P., & Suresh, B. (2020). Curcumin to inhibit binding of spike glycoprotein to ACE2 receptors: computational modelling, simulations, and ADMET studies to explore curcuminoids against novel SARS-CoV-2 targets. *RSC Advances*, *10*(52), 31385–31399. <https://doi.org/10.1039/D0RA03167D>
- Sharma, D., Rawat, P., Janakiraman, V., & Gromiha, M. M. (2022). Elucidating important structural features for the binding affinity of spike - SARS-CoV-2 neutralizing antibody complexes. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *90*(3), 824–834. <https://doi.org/10.1002/PROT.26277>
- Shuster, A., Pechalrieu, D., Jackson, C. B., Abegg, D., Choe, H., & Adibekian, A. (2021). Clinical Antiviral Drug Arbidol Inhibits Infection by SARS-CoV-2 and Variants through Direct Binding to the Spike Protein. *ACS Chemical Biology*, *16*(12), 2845–2851. https://doi.org/10.1021/ACSCHEMBIO.1C00756/ASSET/IMAGES/LARGE/CB1C00756_0005.JPEG
- Sinha, S. K., Prasad, S. K., Islam, M. A., Gurav, S. S., Patil, R. B., AlFaris, N. A., Aldayel, T. S., AlKehayez, N. M., Wabaidur, S. M., & Shakya, A. (2021). Identification of bioactive compounds from *Glycyrrhiza glabra* as possible inhibitor of SARS-CoV-2 spike glycoprotein and non-structural protein-15: a pharmacoinformatics study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *39*(13), 4686–4700. https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1779132/SUPPL_FILE/TBSD_A_1779132_S M8554.DOCX

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

- Søndergaard, C. R., Olsson, M. H. M., Rostkowski, M., & Jensen, J. H. (2011). Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pKa Values. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7(7), 2284–2295. <https://doi.org/10.1021/CT200133Y>
- Spitzer, R., & Jain, A. N. (2012). Surflex-Dock: Docking benchmarks and real-world application. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 2012 26:6, 26(6), 687–699. <https://doi.org/10.1007/S10822-011-9533-Y>
- Sternberg, A., & Naujokat, C. (2020). Structural features of coronavirus SARS-CoV-2 spike protein: Targets for vaccination. *Life Sciences*, 257, 118056. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2020.118056>
- Sun, Z., Ren, K., Zhang, X., Chen, J., Jiang, Z., Jiang, J., Ji, F., Ouyang, X., & Li, L. (2021). Mass Spectrometry Analysis of Newly Emerging Coronavirus HCoV-19 Spike Protein and Human ACE2 Reveals Camouflaging Glycans and Unique Post-Translational Modifications. *Engineering*, 7(10), 1441–1451. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2020.07.014>
- Sztain, T., Ahn, S. H., Bogetti, A. T., Casalino, L., Goldsmith, J. A., Seitz, E., McCool, R. S., Kearns, F. L., Acosta-Reyes, F., Maji, S., Mashayekhi, G., McCammon, J. A., Ourmazd, A., Frank, J., McLellan, J. S., Chong, L. T., & Amaro, R. E. (2021). A glycan gate controls opening of the SARS-CoV-2 spike protein. *Nature Chemistry* 2021 13:10, 13(10), 963–968. <https://doi.org/10.1038/s41557-021-00758-3>
- Taka, E., Yilmaz, S. Z., Golcuk, M., Kilinc, C., Aktas, U., Yildiz, A., & Gur, M. (2021). Critical Interactions between the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein and the Human

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

ACE2 Receptor. *Journal of Physical Chemistry B*, 125(21), 5537–5548.

https://doi.org/10.1021/ACS.JPCB.1C02048/ASSET/IMAGES/LARGE/JP1C02048_0007.JPEG

Tallei, T. E., Tumilaar, S. G., Niode, N. J., Fatimawali, Kepel, B. J., Idroes, R., Effendi, Y., Sakib, S. A., & Emran, T. bin. (2020). Potential of Plant Bioactive Compounds as SARS-CoV-2 Main Protease (Mpro) and Spike (S) Glycoprotein Inhibitors: A Molecular Docking Study. *Scientifica*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6307457>

Thomson, E. C., Rosen, L. E., Shepherd, J. G., Spreafico, R., da Silva Filipe, A., Wojcechowskyj, J. A., Davis, C., Piccoli, L., Pascall, D. J., Dillen, J., Lytras, S., Czudnochowski, N., Shah, R., Meury, M., Jesudason, N., de Marco, A., Li, K., Bassi, J., O’Toole, A., ... Snell, G. (2021). Circulating SARS-CoV-2 spike N439K variants maintain fitness while evading antibody-mediated immunity. *Cell*, 184(5), 1171-1187.e20. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2021.01.037>

Uline, M. J., & Corti, D. S. (2005). Molecular dynamics in the isothermal-isobaric ensemble: The requirement of a “shell” molecule. I. Theory and phase-space analysis. *The Journal of Chemical Physics*, 123(16), 164101. <https://doi.org/10.1063/1.2064512>

van Boheemen, S., de Graaf, M., Lauber, C., Bestebroer, T. M., Raj, V. S., Zaki, A. M., Osterhaus, A. D. M. E., Haagmans, B. L., Gorbalenya, A. E., Snijder, E. J., & Fouchier, R. A. M. (2012). Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *MBio*, 3(6). <https://doi.org/10.1128/MBIO.00473-12>

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

- Verkhivker, G., Agajanian, S., Oztas, D., & Gupta, G. (2021). Dynamic profiling of binding and allosteric propensities of the SARS-CoV-2 spike protein with different classes of antibodies: Mutational and perturbation-based scanning reveals the allosteric duality of functionally adaptable hotspots. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *17*(7), 4578–4598.
https://doi.org/10.1021/ACS.JCTC.1C00372/ASSET/IMAGES/LARGE/CT1C00372_0012.JPEG
- Verli, H. (2014). *Bioinformática : da biologia à flexibilidade molecular*.
<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/166105>
- Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Velesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, *181*(2), 281-292.e6.
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.02.058/ATTACHMENT/0D452E6C-56C8-4028-8AFB-CFC22B1A37FF/MMC2.PDF>
- Walls, A. C., Tortorici, M. A., Frenz, B., Snijder, J., Li, W., Rey, F. A., DiMaio, F., Bosch, B. J., & Velesler, D. (2016). Glycan shield and epitope masking of a coronavirus spike protein observed by cryo-electron microscopy. *Nature Structural & Molecular Biology* *23*:10, *23*(10), 899–905. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3293>
- Wang, C., Horby, P. W., Hayden, F. G., & Gao, G. F. (2020). A novel coronavirus outbreak of global health concern. *The Lancet*, *395*(10223), 470–473.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30185-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30185-9)

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

- Wang, M., Cao, R., Zhang, L., Yang, X., Liu, J., Xu, M., Shi, Z., Hu, Z., Zhong, W., & Xiao, G. (2020). Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Research* 2020 30:3, 30(3), 269–271. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0>
- Wang, Q., Zhang, Y., Wu, L., Niu, S., Song, C., Zhang, Z., Lu, G., Qiao, C., Hu, Y., Yuen, K. Y., Wang, Q., Zhou, H., Yan, J., & Qi, J. (2020). Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell*, 181(4), 894-904.e9. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.03.045/ATTACHMENT/9E7684DA-BAEE-487B-9D65-478D87F0C2BB/MMC1.PDF>
- Watanabe, Y., Allen, J. D., Wrapp, D., McLellan, J. S., & Crispin, M. (2020). Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science*, 369(6501), 330–333. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABB9983/SUPPL_FILE/ABB9983_WATANABE_SM.PDF
- Weisblum, Y., Schmidt, F., Zhang, F., DaSilva, J., Poston, D., Lorenzi, J. C. C., Muecksch, F., Rutkowska, M., Hoffmann, H. H., Michailidis, E., Gaebler, C., Agudelo, M., Cho, A., Wang, Z., Gazumyan, A., Cipolla, M., Luchsinger, L., Hillyer, C. D., Caskey, M., ... Bieniasz, P. D. (2020). Escape from neutralizing antibodies 1 by SARS-CoV-2 spike protein variants. *ELife*, 9, 1. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.61312>
- Wlodawer, A., Dauter, Z., Shabalín, I. G., Gilski, M., Brzezinski, D., Kowiel, M., Minor, W., Rupp, B., & Jaskolski, M. (2020). Ligand-centered assessment of SARS-CoV-2 drug target models in the Protein Data Bank. *The FEBS Journal*, 287(17), 3703–3718. <https://doi.org/10.1111/FEBS.15366>

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

Wnorowska, S., Targowska-Duda, K., Kurzepa, J., Wnorowski, A., & Strzemski, M.

(2022). Carlina oxide inhibits the interaction of SARS-CoV-2 S glycoprotein with angiotensin-converting enzyme 2. *Industrial Crops and Products*, 187, 115338.

<https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2022.115338>

World Health Organization. (2020). Coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Situation Report - 51*.

Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C.-L., Abiona, O., Graham, B. S., & McLellan, J. S. (2020). Cryo-EM Structure of the 2019-nCoV Spike in the Prefusion Conformation. *BioRxiv : The Preprint Server for Biology*.

<https://doi.org/10.1101/2020.02.11.944462>

Xu, C., Wang, Y., Liu, C., Zhang, C., Han, W., Hong, X., Wang, Y., Hong, Q., Wang, S., Zhao, Q., Wang, Y., Yang, Y., Chen, K., Zheng, W., Kong, L., Wang, F., Zuo, Q., Huang, Z., & Cong, Y. (2021). Conformational dynamics of SARS-CoV-2 trimeric spike glycoprotein in complex with receptor ACE2 revealed by cryo-EM. *Science Advances*, 7(1).

https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABE5575/SUPPL_FILE/ABE5575_SM.PDF

Xu, Y., Zhu, J., Liu, Y., Lou, Z., Yuan, F., Liu, Y., Cole, D. K., Ni, L., Su, N., Qin, L., Li, X., Bai, Z., Bell, J. I., Pang, H., Tien, P., Gao, G. F., & Rao, Z. (2004).

Characterization of the heptad repeat regions, HR1 and HR2, and design of a fusion core structure model of the spike protein from Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) coronavirus. *Biochemistry*, 43(44), 14064–14071.

GLUCOPROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

<https://doi.org/10.1021/BI049101Q/ASSET/IMAGES/LARGE/BI049101QF00008.JPG>
EG

Yan, R., Zhang, Y., Li, Y., Xia, L., Guo, Y., & Zhou, Q. (2020). Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*, 367(6485), 1444–1448. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABB2762/SUPPL_FILE/ABB2762S1.MP4

Zhang, J., Xiao, T., Cai, Y., & Chen, B. (2021). Structure of SARS-CoV-2 spike protein. *Current Opinion in Virology*, 50, 173–182.
<https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2021.08.010>

Zheng, M., Cong, W., Peng, H., Qing, J., Shen, H., Tang, Y., Geng, C., Chen, S., Zou, Y., Zhang, W. D., Hu, H. G., & Li, X. (2021). Stapled Peptides Targeting SARS-CoV-2 Spike Protein HR1 Inhibit the Fusion of Virus to Its Cell Receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(23), 17486–17495.
https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.1C01681/SUPPL_FILE/JM1C01681_SI_002.CSV

Zhou, Z., Qiu, Y., & Ge, X. (2021). The taxonomy, host range and pathogenicity of coronaviruses and other viruses in the Nidovirales order. *Animal Diseases 2021 1:1*, 1(1), 1–28. <https://doi.org/10.1186/S44149-021-00005-9>

Zígolo, M. A., Goytia, M. R., Poma, H. R., Rajal, V. B., & Irazusta, V. P. (2021). Virtual screening of plant-derived compounds against SARS-CoV-2 viral proteins using computational tools. *Science of The Total Environment*, 781, 146400.
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.146400>