

Evaluación y detección bioinformática de terpenoides con potencial inhibitorio de la proteína viral 1 (VP1) del virus de la bursitis infecciosa

C. D. J. Arce¹ , E. Gayozo^{2*} 

Recibido: 25/11/2022. Aprobado: 21/02/2023

RESUMEN

El virus de la bursitis infecciosa (IBDV) es el agente causal de la enfermedad de la bursa, la cual afecta principalmente a poblaciones avícolas jóvenes y genera un impacto económico negativo en la producción. La proteína viral (VP1) es una enzima con funciones clave para la replicación del genoma viral, por lo que puede ser considerada blanco para la búsqueda de compuestos con posibles actividades inhibitorias. El objetivo de esta investigación fue evaluar terpenoides con potencial inhibitorio de la proteína VP1 del IBDV mediante herramientas de aproximaciones bioinformáticas. Se seleccionó un total de 52 terpenoides, cuyas propiedades farmacológicas, farmacocinéticas y tóxicas (ADME-Tox) se evaluaron. Las moléculas sin actividades tóxicas y con aptitudes farmacocinéticas fueron sometidas a pruebas exhaustivas de acoplamiento molecular con el sitio catalítico de la VP1 mediante el uso del algoritmo genético y de Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno junto con el método de optimización local de gradientes. Los datos obtenidos revelaron que la Giberelina A1 presenta valores de energía libre de unión significativamente ($p < 0,05$) favorables ($\Delta G = -7,28 \pm 0,06$ kcal/mol; $K_{d\text{calc}} = 8,62 \pm 0,99$ μM) en comparación con los sustratos rCTP y rGTP. El complejo Giberelina A1-VP1 presenta puentes de hidrógeno con los residuos Arg335 y Asp402, los cuales cumplen roles importantes en la actividad catalítica en la replicación viral. Estos hallazgos sugieren que el terpenoide Giberelina A1 puede ser considerado como compuesto candidato para estudios *in vitro* de inhibición de funciones de la VP1 e *in vivo* de actividades antivirales contra el virus de la bursitis infecciosa.

Palabras clave: bursitis, ARN polimerasa, terpenos, Gumboro.

Evaluation and bioinformatic detection of terpenoids with inhibitory potential of viral protein 1 (VP1) of infectious bursitis virus

ABSTRACT

Infectious bursitis virus (IBDV) is the infectious agent of bursal disease, which mainly affects young poultry populations, generating a negative economic impact on productions. The viral protein 1 (VP1) is an enzyme with important functions for the replication of the viral genome, so it could be considered as a target for searching compounds with possible inhibitory activities. The aim of this research was to evaluate terpenoids with

¹ Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología, San Lorenzo, Paraguay.

² Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología, San Lorenzo, Paraguay.

* Autor de correspondencia. Correo electrónico: elviologo@gmail.com

inhibitory potential of the VP1 protein of IBDV using computational approximations tools. A total of 52 terpenoids were selected and evaluated for their pharmacological, pharmacokinetic and toxic properties (ADME-Tox). Molecules without toxic activities and with pharmacokinetic competences were subjected to extensive molecular docking tests with the catalytic site of VP1 using the genetic and Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno algorithms with a local gradient optimization method. Data obtained revealed that Gibberellin A1 exhibits significantly ($P < 0.05$) favorable binding free energy values ($\Delta G = -7.28 \pm 0.06$ kcal/mol; $K_{d,calc} = 8.62 \pm 0.99$ μ M) compared to rCTP and rGTP substrates. The Gibberellin A1-VP1 complex exhibits hydrogen bonds with residues Arg335 and Asp402, which play important roles in catalytic activity in viral replication. These findings suggest that the terpenoid Gibberellin A1 could be considered as a candidate compound for *in vitro* studies of inhibition of VP1 functions and *in vivo* antiviral activities against infectious bursitis virus.

Keywords: bursitis, RNA polymerase, terpenes, Gumboro.

INTRODUCCIÓN

El virus de la bursitis infecciosa (IBDV) es el agente causal de la enfermedad de Gumboro, una condición altamente contagiosa que afecta a las poblaciones avícolas jóvenes, lo cual genera un impacto económico negativo en la producción a nivel mundial debido a la alta tasa de morbilidad (100%) y de mortalidad de 20-30% (Sharma *et al.* 2000). Tanto los pollos de engorde como las gallinas ponedoras son susceptibles y son protegidas mediante vacunación. A pesar de que la mayoría de estas vacunas inducen respuestas contra el IBDV, el grado de protección contra la virulencia del IBDV es variable y puede ser subóptimo principalmente por variaciones antigénicas (Berg 2000). Debido a esto, los investigadores se enfocan en la búsqueda de nuevos métodos antivirales empleando blancos moleculares para poder combatir al avance del virus (Gayozo *et al.* 2022).

Uno de los blancos moleculares que se están empleando es la proteína VP1, una enzima viral encargada de la replicación del genoma viral y, por ende, vital en el ciclo replicativo del virus; esta proteína actúa como una ARN polimerasa dependiente de

ARN no canónica debido a su interacción con la VP3 para su activación y completo rendimiento (Garriga *et al.* 2007).

En la actualidad, la búsqueda y el diseño de nuevos fármacos se realizan en una primera fase mediante el uso de herramientas informáticas, las cuales requieren la utilización de grandes recursos computacionales con un alto grado de aproximación experimental para la optimización de las investigaciones principalmente en el tiempo y los reactivos implementados para el desarrollo de nuevos compuestos con potenciales farmacológicos que pueden ser utilizados en el tratamiento de numerosas afecciones humanas y animales (Poroikov 2020).

Las plantas son fuentes naturales de compuestos bioactivos con un sinnúmero de beneficios tanto para el ser humano como para los demás seres vivos (Saboon *et al.* 2019). Los terpenoides son fitoconstituyentes que presentan una gran diversidad estructural química y tienen numerosas propiedades biológicas importantes, entre las que se mencionan las actividades antivirales y antibacterianas *in vitro* (Angeh *et al.* 2006; Nosrati y Behbahani 2015),

por lo que son considerados candidatos para su estudio como posible antiviral de aplicación o uso veterinario.

El objetivo de esta investigación fue evaluar y detectar moléculas de terpenoides con potencial inhibitorio de la proteína viral 1 (VP1) del virus de la bursitis infecciosa mediante herramientas bioinformáticas y computacionales. Lo anterior para constatar qué tipos de terpenoides podrían presentar afinidades de interacción con el sitio activo de la proteína VP1 del virus de la bursitis infecciosa y también demostrar aptitudes farmacocinéticas-tóxicas óptimas para su consideración farmacológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó según el diagrama de flujo metodológico simplificado representado en la figura 1, para lo cual se

emplearon ordenadores con procesadores Intel® Core™ i3-7020U 2.30GHz, RAM de 16.00 Gb y sistema operativo Windows 10.

Caracterización de sitios drogables en la región catalítica de la proteína VP1

La búsqueda de sitios con perfiles drogables presentes en la región catalítica de la VP1 se llevó a cabo empleando la estructura de la proteína viral disponible en la base de datos Protein Data Bank (PDB: 2R70, 2R72). Para la detección computacional del sitio drogable en la región catalítica se utilizó la herramienta DoGSiteScorer (Volkamer *et al.* 2010). La caracterización del sitio identificado se realizó mediante la estimación del puntaje de drogabilidad, de descriptores dimensionales, de grupos funcionales y composición de residuos dicha región (Volkamer *et al.* 2012).

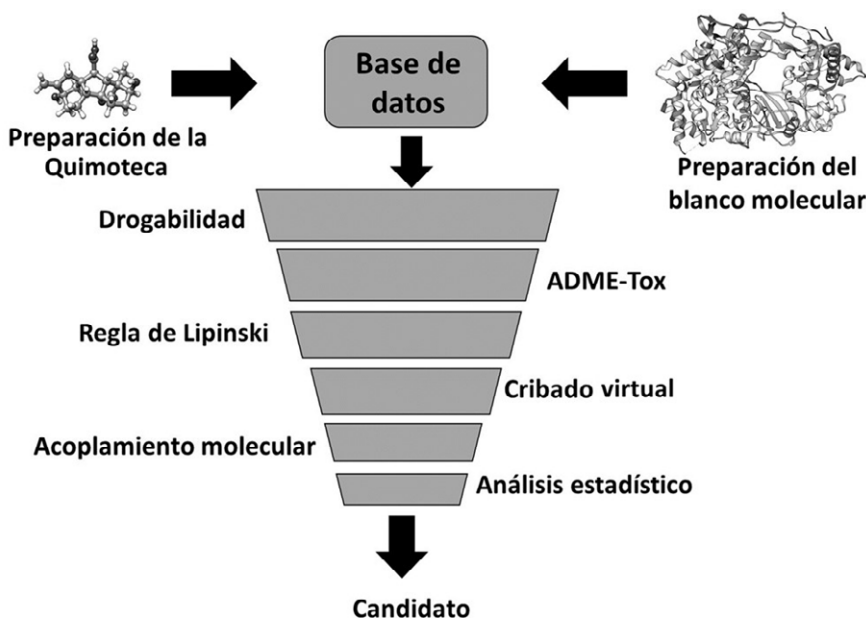


FIGURA 1. Diagrama del flujo metodológico empleado en este estudio.

Fuente: elaboración propia.

Pruebas de acoplamiento molecular entre terpenoides y la proteína VP1

La estructura proteica tridimensional de la VP1 del IBDV se obtuvo de la base de datos Protein Data Bank (PDB: 2R70).

La quimioteca de las estructuras químicas de los terpenoides se realizó mediante el uso de las descripciones de Ludwiczuk *et al.* (2017), que se obtuvieron de la base de datos PubChem (tabla 1).

TABLA 1. Predicciones de propiedades farmacocinéticas y tóxicas (ADME-Tox) de terpenoides evaluados

Parte 1

Compuestos	Abs. GI	Inhibición					Toxicidad				
		CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4	MU	CA	CY	HE	IMT
Mirceno†	Bajo	No	No	No	No	No					
Citral†	Alto	No	No	No	No	No					
Linalool†	Alto	No	No	No	No	No					
Limoneno	Bajo	No	No	Sí	No	No					
Timol	Alto	Sí	No	No	No	No					
Mentol†	Alto	No	No	No	No	No					
Carvon†	Alto	No	No	No	No	No					
Eucaliptol†	Alto	No	No	No	No	No					
α-Tujona†	Alto	No	No	No	No	No					
α-Pineno	Bajo	No	No	Sí	No	No					
β-Pineno	Bajo	No	No	Sí	No	No					
Borneol†	Alto	No	No	No	No	No					
Alcanfor†	Alto	No	No	No	No	No					
Farnesol	Alto	Sí	No	Sí	No	No					
β-Nerolidol	Alto	Sí	No	Sí	No	No					
β-Bisaboleno	Bajo	No	No	Sí	No	No					A
α-Zingibereno	Bajo	No	Sí	Sí	No	No					
α-Humuleno	Bajo	No	No	Sí	No	No					
β-Santalol	Alto	No	Sí	Sí	No	No					
β-Cariofileno	Bajo	No	Sí	Sí	No	No					A
δ-Cadineno	Bajo	No	Sí	Sí	No	No					
Artemisinina	Alto	Sí	No	No	No	No					A
Alantolactona	Alto	No	Sí	Sí	No	No		A			A

Compuestos	Abs. GI	Inhibición					Toxicidad				
		CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4	MU	CA	CY	HE	IMT
Chamazuleno	Bajo	Sí	No	No	Sí	No	I	A	I	I	I
Nootkatona	Alto	No	Sí	Sí	No	No	I	I	I	I	I
Khusimol	Alto	No	No	Sí	No	No	I	I	I	I	A
Tujopseno	Bajo	No	Sí	Sí	No	No	I	I	I	I	I
Cedrol	Alto	No	No	Sí	No	No	I	I	I	I	I
Patchoulol	Alto	No	No	Sí	No	No	I	I	I	I	I
Germacradienol†	Alto	No	No	No	No	No	I	I	I	I	I
Eudesmanólidos	Bajo	No	Sí	Sí	No	No	I	I	I	I	I
Guaiane	Bajo	No	Sí	Sí	No	No	I	I	I	I	I

Abs. GI: Absorción Gastrointestinal, MU: Mutagenicidad, CA: Carcinogenicidad, CY: Citotoxicidad, HE: hepatotoxicidad, IMT: Inmunotoxicidad, I: Inactivo, A: Activo, † Compuestos seleccionados para pruebas exhaustivas.

Fuente: elaboración propia.

Parte 2

Compuestos	Abs. GI	Inhibición					Toxicidad				
		CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4	MU	CA	CY	HE	IMT
Fitol	Bajo	No	No	Sí	No	No	I	I	I	I	I
α-Terpeneol†	Alto	No	No	No	No	No	I	I	I	I	I
Sclareol	Alto	No	No	No	Sí	No	I	I	I	I	I
Marrubiin	Alto	No	No	No	Sí	No	I	I	I	I	I
Salvinorina A	Alto	No	No	No	No	No	I	I	I	I	A
Ácido abiético	Alto	No	Sí	Sí	No	No	I	I	I	A	I
Ácido carnósico	Alto	No	No	Sí	No	No	I	I	I	I	A
Tanshinona I	Alto	Sí	Sí	No	No	Sí	I	I	I	I	I
Giberelina A1†	Alto	No	No	No	No	No	I	I	I	I	I
Steviol	Alto	No	No	Sí	No	No	A	I	I	A	A
Casbeno	Bajo	No	Sí	Si	No	No	I	I	I	I	I
Ginkgólido A	Alto	No	No	No	No	No	I	I	I	I	A
Nezukona	Alto	Sí	No	No	No	No	I	I	I	I	I
Cetona de Artemisia	Alto	No	No	No	No	No	I	A	I	I	I

Compuestos	Abs. GI	Inhibición					Toxicidad				
		CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4	MU	CA	CY	HE	IMT
Ácido crisantémico†	Alto	No	No	No	No	No	I	I	I	I	I
Lavandulof	Alto	No	No	No	No	No	I	I	I	I	I
α-Ionona	Alto	No	No	Sí	No	No	I	I	I	I	I
β-Ionona†	Alto	No	No	No	No	No	I	I	I	I	I
α-Damascona†	Alto	No	No	No	No	No	I	I	I	I	I
β-Damascona†	Alto	No	No	No	No	No	I	I	I	I	I

Abs. GI: Absorción Gastrointestinal, MU: Mutagenicidad, CA: Carcinogenicidad, CY: Citotoxicidad, HE: hepatotoxicidad, IMT: Inmunotoxicidad, I: Inactivo, A: Activo, † Compuestos seleccionados para pruebas exhaustivas.

Fuente: elaboración propia.

Se procedió a aplicar métodos de campo de fuerza Universal Force Field (UFF) junto con el algoritmo de optimización energética de gradientes conjugados, proporcionando cargas parciales y átomos de hidrógeno polares a pH de 7,4, para ello se utilizó el programa Avogadro 1.2 (Hanwell *et al.* 2012).

El cribado virtual se llevó a cabo utilizando una grilla de acoplamiento de 21x25x18 Å³ en la que se incluye al sitio drogable de la región catalítica de la VP1, para ello se empleó el algoritmo genético-lamarckiano con el programa AutoDock Vina (Trott y Olson 2010). Como controles del sistema de acoplamiento se utilizaron los sustratos de la enzima, la adenosina trifosfato (rATP), la guanosina trifosfato (rGTP) y la citosina trifosfato (rCTP).

Se seleccionaron aquellos terpenoides que demostraron valores de energía libre de unión (ΔG) menores a los obtenidos con los controles (Gayozo *et al.* 2022). Estos compuestos fueron sometidos a pruebas de mayor exhaustividad en un total de diez repeticiones, a modo de minimizar

los errores generados en las simulaciones (Gayozo *et al.* 2022).

A modo de control interno de la precisión del algoritmo utilizado (reacoplamiento/*redocking*), este procedimiento se realizó llevando a cabo el ligando co-cristalizado con la proteína (PDB: 2R72) y estimando el valor de raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) que se generó en la simulación (Gayozo *et al.* 2022).

La visualización tridimensional y bidimensional de los complejos, así como su análisis se realizó mediante los programas Chimera v1.16 (Pettersen *et al.* 2004) y PoseView (Fricker *et al.* 2004; Stierand *et al.* 2006). De los complejos con energías de unión favorables se determinó la afinidad de unión mediante la estimación de la constante de disociación $K_{d\text{ calc}}$, empleando la fórmula utilizada por Choudhury y colaboradores (Choudhury *et al.* 2021):

$$Kd\text{ calc} = e^{\left(\frac{\Delta G \times 1000}{RT}\right)}$$

Donde en la ecuación la T es la temperatura corporal promedio aviar (*Gallus domesticus*)

de 313 K (40°C) y R es la constante de los gases ideales con valor de 1,987207 cal/mol.K.

Predicciones de aptitudes farmacológicas, propiedades farmacocinéticas y tóxicas de los terpenoides

Las propiedades ADME-Tox (absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad) de los terpenoides evaluados se estimaron y caracterizaron empleando la regla de los cinco de Lipinski (2004); los parámetros ADME y de toxicidad, mediante el uso de las herramientas bioinformáticas SwissADME (Daina *et al.* 2014; Daina y Zoete 2016; Daina *et al.* 2017) y ProTox-II (Drwal *et al.* 2014).

Análisis estadísticos de datos

Los valores de energía libre de unión obtenidos en las simulaciones de acoplamiento molecular se analizaron mediante el test de Kruskal-Wallis y la prueba *post-hoc* de Dunn (5% de nivel de significancia), para ello se empleó el programa Past 4.11 (Hammer

et al. 2001). Los gráficos estadísticos se realizaron utilizando el programa Past 4.11 (Hammer *et al.* 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de las estructuras de la VP1 evidenció la presencia de un sitio con un alto puntaje de drogabilidad igual a 0,83. Este se encuentra ubicado en la región catalítica de la proteína (4) y presenta un volumen de 579,49 Å³, una superficie de 69,31 Å² y una profundidad de 21,53 Å (figura 2).

Volkamer *et al.* (2010) mencionan que los puntajes de drogabilidad en una proteína o blanco molecular pueden tomar valores que van en un rango de 0 a 1, y que aquellos valores cercanos a 1 demuestran aptitudes para considerarla como blanco para la búsqueda de ligandos.

Este sitio identificado en la VP1 demuestra el 28% de residuos apolares, el 47% de residuos polares, el 19% de residuos básicos y el 6% residuos ácidos, esta región presenta una hidrofobicidad

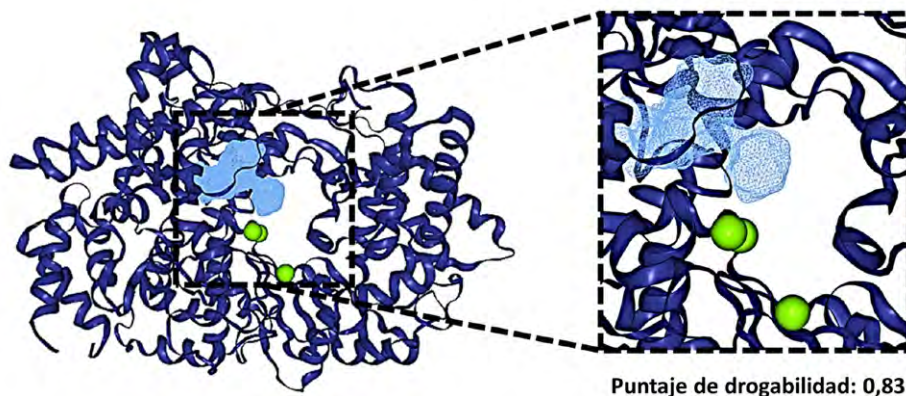


FIGURA 2. Sitio drogable situado en la región catalítica de la VP1 (PDB: 2R72) (región resaltada en celeste).

Fuente: elaboración propia.

del 15%. También es importante destacar que se encuentra conformado por 22 grupos funcionales químicos capaces de actuar como donadores en puentes de hidrógeno, 54 grupos funcionales químicos aceptores en puentes de hidrógeno y 13 grupos funcionales químicos capaces de participar en la formación de interacciones hidrofóbicas.

Los residuos encontrados en el sitio drogable fueron la Tyr59, Arg175, Leu176, Met179, Lys180, Ser256, Ser257, Lys267, Leu318, Lys321, Arg335, Asn336, Ile337, Trp338, Ser339, Ala340, His345, Glu421, Ala422, Val465, Val466, Asp467, Ser468, Ser469, Cys470, Lys478, Thr479, Tyr480, Gly48, Gln482, Gly483, Ser484, Gly485,

Asn486, Ala488 y Thr489, entre los que se encuentran residuos que cumplen funciones importantes en la catálisis realizada por la enzima (Garriga *et al.* 2007).

Con respecto a los terpenoides, se evaluaron un total de 52 compuestos mediante descriptores ADME-Tox y según la regla de los cinco de Lipinski (tabla 1, tabla 2). Entre estos, las moléculas que no presentaron actividades tóxicas y con aptitudes farmacocinéticas (absorción gastrointestinal alta sin actividades inhibitoras de las isoformas de la proteína citocromo P450) y farmacológicas (sin infracciones a la regla de Lipinski) se usaron para llevar a cabo el proceso de cribado virtual (tabla 3).

TABLA 2. Predicciones de aptitudes farmacológicas según la regla de Lipinski

Parte 1

Compuestos	Peso molecular (g/mol)	Grupos aceptores P-H	Grupos donadores P-H	MLOGP*	Número de infracciones
Mirceno†	136,23	0	0	3,56	0
Citral†	152,23	1	0	2,49	0
Linalool†	154,25	1	1	2,59	0
Limoneno	136,23	0	0	3,27	0
Timol	150,22	1	1	2,76	0
Mentol†	156,27	1	1	2,45	0
Carvon†	150,22	1	0	2,1	0
Eucaliptol†	154,25	1	0	2,45	0
α-Tujon†	152,23	1	0	2,3	0
α-Pineno	136,23	0	0	4,29	1
β-Pineno	136,23	0	0	4,29	1
Borneol†	154,25	1	1	2,45	0
Alcanfor†	152,23	1	0	2,3	0
Farnesol	222,37	1	1	3,86	0

Compuestos	Peso molecular (g/mol)	Grupos aceptores P-H	Grupos donadores P-H	MLOGP*	Número de infracciones
β-Nerolidol	222,37	1	1	3,86	0
β-Bisaboleno	204,35	0	0	4,53	1
α-Zingibereno	204,35	0	0	4,53	1
α-Humuleno	204,35	0	0	4,53	1
β-Santalol	220,35	1	1	3,56	0
β-Cariofileno	204,35	0	0	4,63	1
δ-Cadineno	204,35	0	0	4,63	1
Artemisinina	282,33	5	0	2,62	0
Alantolactona	232,32	2	0	3,35	0
Chamazuleno	184,28	0	0	5,01	1
Nootkatona	218,33	1	0	3,46	0
Khusimol	220,35	1	1	3,67	0
Tujopseno	204,35	0	0	5,65	1
Cedrol	222,37	1	1	3,81	0
Patchoulol	222,37	1	1	3,81	0
Germacradienol†	222,37	1	1	3,56	0
Eudesmanólicos	208,38	0	0	5,8	1
Guaiane	208,38	0	0	5,8	1

*Coeficiente de partición agua: octanol de Moriguchi, P-H: Puentes de hidrógeno, † Compuestos seleccionados para pruebas exhaustivas.

Parte 2

Compuestos	Peso molecular (g/mol)	Grupos aceptores P-H	Grupos donadores P-H	MLOGP*	Número de infracciones
Fitol	296,53	1	1	5,25	1
α-Terpineol†	154,25	1	1	2,3	0
Sclareol	308,5	2	2	3,93	0
Marrubiin	332,43	4	1	2,76	0
Salvinorina A	432,46	8	0	1,56	0
Ácido abiético	302,45	2	1	4,54	1

Compuestos	Peso molecular (g/mol)	Grupos aceptores P-H	Grupos donadores P-H	MLOGP*	Número de Infracciones
Ácido carnósico	332,43	4	3	3,25	0
Tanshinona I	276,29	3	0	1,82	0
Giberelina A1†	348,39	6	3	1,75	0
Steviol	318,45	3	2	3,75	0
Casbeno	272,47	0	0	5,72	1
Ginkgólido A	408,4	9	2	0,83	0
Nezukona	148,2	1	0	1,97	0
Cetona de Artemisia	152,23	1	0	2,49	0
Ácido crisantémico†	168,23	2	1	2,08	0
Lavandulol†	154,25	1	1	2,59	0
α -Ionona	192,3	1	0	2,94	0
β -Ionona†	192,3	1	0	2,94	0
α -Damascona†	192,3	1	0	2,94	0
β -Damascona†	192,3	1	0	2,94	0

*Coeficiente de partición agua:octanol de Moriguchi, P-H: Puentes de hidrógeno, † Compuestos seleccionados para pruebas exhaustivas.

Fuente: elaboración propia.

TABLA 3. Resultados obtenidos en las pruebas de acoplamiento molecular

Compuestos	PubChem CID	ΔG de unión (kcal/mol)
rATP*	5.957	-7,2
rGTP*	135.398.633	-7,0
rCTP*	6.176	-7,0
Mirceno	31.253	-4,1
Citral	638.011	-4,6
Linalool	6.549	-4,2
Mentol	1.254	-4,7

Compuestos	PubChem CID	ΔG de unión (kcal/mol)
Carvona	7.439	-4,5
Eucaliptol	2.758	-4,1
α -Tujona	261.491	-4,8
Borneol	64.685	-4,2
Alcanfor	2.537	-4,1
Germacradienol	16.667.385	-5,4
α -Terpineol	17.100	-4,6
Giberelina A1**	5.280.379	-7,1
Ácido crisantémico	2.743	-4,7
Lavandulol	5.464.156	-4,2
β -Ionona	638.014	-5,4
α -Damascona	5.366.077	-4,7
β -Damascona	32.052	-4,9

* Controles, **Compuesto con valores de energía menores o iguales a los controles.

Fuente: elaboración propia.

Los resultados obtenidos en las pruebas del cribado molecular demostraron que el terpenoide con valor de energía libre de interacción semejante a los controles fue la molécula de Giberelina A1, compuesto que posteriormente se sometió a pruebas de mayor exhaustividad (tabla 3).

El complejo formado por la Giberelina A1 y la VP1 registró valores promedio de energía libre de unión ($\Delta G = -7,28 \pm 0,06$ kcal/mol) significativamente favorables

($p < 0,05$) en comparación con lo obtenido con los ribonucleótidos rCTP y rGTP, sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) con el ribonucleótido rATP (figura 3). Se estimó también el valor promedio de la constante de disociación, que fue de $K_{d,calc} = 8,62 \pm 0,99$ μ M, demostrando de esta forma ser el terpenoide con más aptitudes para ser considerado como ligando (Choudhury *et al.* 2021) (figura 4).

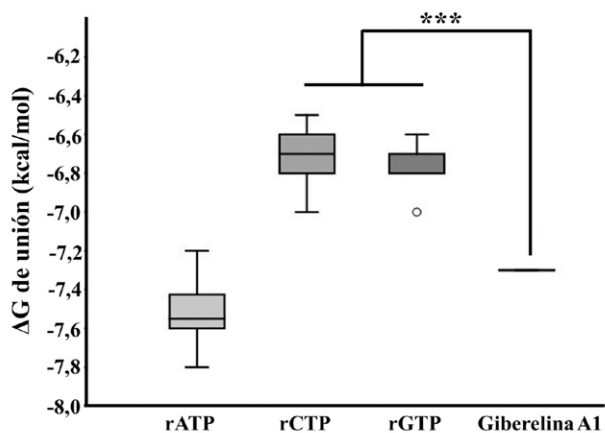


FIGURA 3. Valores de energía libre de interacción (ΔG) registrados en las pruebas de acoplamiento molecular con el sitio catalítico de la VP1. *** $p < 0,05$.

Fuente: elaboración propia.

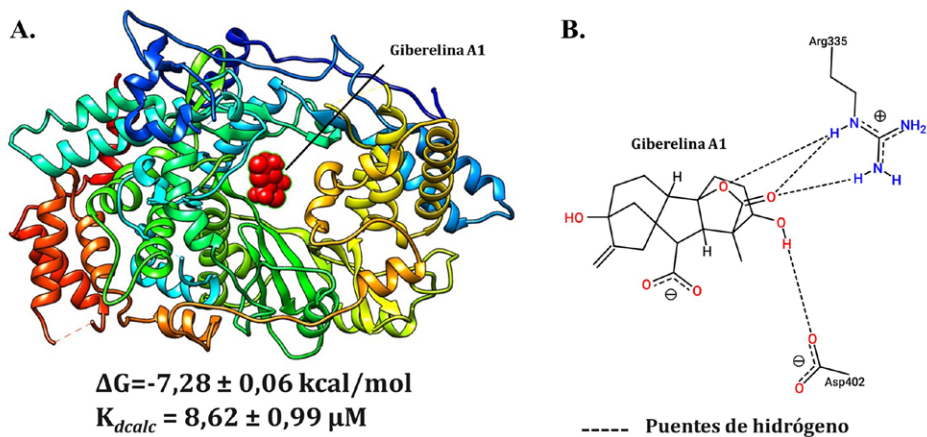


FIGURA 4. Representación gráfica del acoplamiento entre la Giberelina A1 y la región catalítica de VP1. A. Modelo tridimensional del complejo Giberelina A1-VP1. B. Modelo bidimensional de las interacciones ligando-proteína del complejo Giberelina A1-VP1.

Fuente: elaboración propia.

En dicho complejo (Giberelina A1-VP1), se registró la formación de varios puentes de hidrógeno entre la Giberelina A1 y los residuos Arg335 (residuo básico) y Asp402 (residuo ácido) de la VP1 (figura 4). Es importante destacar que ambos residuos cumplen funciones imprescindibles en las actividades catalíticas de la enzima durante la replicación del genoma del virus, ya que se encuentran actuando específicamente en la estabilización de los nucleótidos entrantes al sitio catalítico (Garriga *et al.* 2007). Además de las utilidades que poseen las moléculas de Giberelinas en el campo de la agroproducción, se ha descrito que estas tienen propiedades antiinflamatorias en organismos animales, y también se ha reportado que presentan actividades antibióticas y antiparasitarias, los cuales podrían ser beneficiosas para el control sanitario de enfermedades (Brito *et al.* 2006; Ghisalberti 1997; Pérez *et al.* 2009).

El proceso de validación de los algoritmos empleados en este estudio demostró resultados óptimos, donde el reacomplamiento del ligando co-cristalizado evidenció un valor de RMSD igual a 2 Å.

La regla de Lipinski establece que las moléculas con aptitudes farmacológicas de administración oral deben poseer peso molecular no mayor a 500 g/mol, coeficiente de participación agua:octanol de Moriguchi no mayor a cinco, un número no mayor a diez grupos aceptores de puentes de hidrógeno y no mayor a cinco grupos donadores de puentes de hidrógeno (Lipinski 2004).

La Giberelina A1 no presenta infracciones a la regla de Lipinski, posee un peso molecular igual a 348,39 g/mol, presenta seis grupos funcionales que pueden actuar como aceptores en puentes de hidrógeno y solo tres grupos funcionales capaces de

interactuar como donadores en los puentes de hidrógeno.

En cuanto al coeficiente de partición agua:octanol de Moriguchi igual a 1,75, todos estos parámetros estructurales se encontraban en los límites establecidos por la regla de Lipinski, sin embargo, los productos naturales generalmente rompen la regla debido a que son capaces de mantener el equilibrio entre el peso molecular, la cantidad de enlaces rotables, la hidrofobicidad del compuesto y la capacidad de actuar como donadores en puentes de hidrógeno, lo cual hace que los productos naturales presenten amplias ventajas sobre otros xenobióticos sintéticos (Ganesan 2008).

Asimismo, es importante destacar que las predicciones sugieren que la Giberelina A1 presenta un alto perfil de absorción gastrointestinal y no demuestra ser inhibidora del citocromo P450 (CYP) en ninguna de sus isoformas (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 y CYP3A4) (tabla 1, tabla 2).

Muchos estudios se han enfocado en la búsqueda de constituyentes vegetales con actividades antivirales que puedan ayudar a combatir el avance del IBDV, tal es el caso de los resultados reportados por Sun *et al.* (2013), quienes, al evaluar compuestos de la medicina natural china, evidenciaron que las moléculas de glicirricato de dipotasio y clorhidrato de ligustrazina presentan actividades antivirales contra el virus de la bursitis infecciosa, con una EC_{50} de 663,2±268,4 mg/mL y 92,52±21,13 mg/mL, respectivamente, e índices de selectividad mayores de 4,52 y 21,62, respectivamente.

Igualmente, Ahmad *et al.* (2014) reportaron potenciales actividades antivirales del extracto de raíces de *Glycyrrhiza glabra*,

frutos de *Phyllanthus emblicus*, hojas de *Moringa oleifera* y *Eugenia jambolana* contra el virus de la bursitis infecciosa a las concentraciones de 12,5, 25, 50 y 100 µg/mL, respectivamente.

Así también Anyanwu *et al.* (2017) demostraron que moléculas de alcaloides aislados del fruto de *Cucumis metuliferus* presentan actividades antivirales contra el virus de la bursitis infecciosa a concentraciones de 6,125 mg/mL y 100 mg/mL, las cuales fueron seguras para el modelo biológico empleado (células fibroblásticas embrionarias de pollo).

Por otro lado, Pant *et al.* (2012) hallaron actividades antivirales importantes del extracto hidroalcohólico de raíces de *W. somnifera* contra el virus de la bursitis infecciosa, el cual evidenció un 99% de inhibición de la replicación viral a una concentración no tóxica de 25 µg/mL.

Recientemente, Gayozo *et al.* (2022), al desarrollar aproximaciones computacionales y bioinformáticas, han revelado que los compuestos de la especie *W. somnifera* con potenciales actividades inhibitorias de la VP1 fueron la somniferina, el witanólido A, el witanólido N, el witanólido R, el witanólido S y el witasomniferol C, siendo la somniferina la de mayor afinidad de interacción con la proteína viral.

Los residuos Arg335 y Asp402, que participaban activamente en la formación del complejo Giberelina A1-VP1, presentan funciones importantes en la región catalítica de la VP1, ya que están involucrados en recibir a los nucleótidos y estabilizarlos en el sitio catalítico posteriormente a ser polimerizados por la enzima, por lo que bloquear sus funciones sería fundamental (Garriga *et al.* 2007).

La utilización de terpenoides de baja toxicidad y de bajo riesgo como potenciales antivirales es una de las aplicaciones e

investigaciones más exploradas en las últimas décadas. Estos se emplean para combatir diferentes tipos de virus que afectan a seres humanos y animales (Jumaa *et al.* 2021; Yang *et al.* 2020).

Según Amal Gaber *et al.* (2014), los terpenos tienen la capacidad de interrumpir la adhesión del virus a la superficie de las membranas celulares del hospedero, así como de inhibir la replicación del genoma viral.

Asimismo, Yang *et al.* (2015), mediante el uso de moléculas de terpenoides aisladas, han demostrado que estos son capaces de inhibir la replicación viral, impiden la síntesis de proteínas virales e inhiben la expresión de genes virales.

Otros trabajos como el de Chukwuma *et al.* (2017) reportaron la capacidad que presentan los terpenoides de inhibir la replicación de virus de interés veterinario, entre ellos el virus de la bursitis infecciosa, resaltando la importancia de estos compuestos naturales para combatir el avance del virus de la bursitis infecciosa causante la enfermedad del Gumboro.

CONCLUSIONES

Estos hallazgos bioinformáticos sugieren que, de entre los terpenoides evaluados, la Giberelina A1 es la que presenta mayor afinidad de interacción con la región catalítica de la VP1, demostrando aptitudes tanto farmacológicas como farmacocinéticas, así como muy bajas posibilidades de presentar algún tipo de actividad toxicológica en el organismo animal, por lo que este terpenoide puede ser considerado como compuesto candidato para estudios *in vitro* de inhibición de actividades enzimáticas de la VP1 e *in vivo* para evaluar sus propiedades antivirales con el virus de la bursitis infecciosa.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflicto de intereses.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Programa Nacional de Incentivo a Investigadores (PRONII) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) de Paraguay por el apoyo en la realización del estudio, a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, que permitió la realización de esta investigación a través del Programa de Iniciación Científica (PIC), y al Grupo de Investigación en Biología Computacional y Bioinformática Estructural (GIBCBE) del Departamento de Biología por la colaboración en la investigación.

REFERENCIAS

- Ahmad W, Ejaz S, Anwar K, Ashraf M. 2014. Exploration of the in vitro cytotoxic and antiviral activities of different medicinal plants against infectious bursal disease (IBD) virus. *Open Life Sciences*. 9(5):531-542. <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0276-8>
- Amal Gaber SF, Ibrahim N, Yaakob WA. 2014. Phytochemical screening and antiviral activity of *Marrubium vulgare*. *Malaysian Journal of Microbiology*. 10(2):106-111. <http://dx.doi.org/10.21161/mjm.58013>
- Angeh JE, Huang X, Swan GE, Möllman U, Sattler I, Eloff JN. 2006. Novel antibacterial triterpenoid from *Combretum padoides* [Combretaceae]. *Zhdankin VV, editor. Arkivoc*. 2007(9):113-120. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0008.913>
- Anyanwu AA, Jimam NS, Omale S, Wannang NN. 2017. Antiviral activities of *Cucumis metuliferus* fruits alkaloids on Infectious Bursal Disease Virus (IBDV). *J Phytopharmacol*. 6(2):98-101. <https://doi.org/10.31254/phyto.2017.6206>
- Berg TPVD. 2000. Acute infectious bursal disease in poultry: A review. *Avian Pathology*. 29(3):175-194. <https://doi.org/10.1080/03079450050045431>
- Brito S, Crescente O, Fernández A, Coronado A, Rodríguez N. 2006. Eficacia de un ácido kaurénico extraído de la planta venezolana *Wedelia trilobata* (Asterácea) contra *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Biomedica*. 26:180-187. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572006000500019
- Choudhury A, Das NC, Patra R, Bhattacharya M, Ghosh P, Patra BC, Mukherjee S. 2021. Exploring the binding efficacy of ivermectin against the key proteins of SARS-CoV-2 pathogenesis: an in silico approach. *Future Virology*. 16(4):277-291. <https://doi.org/10.2217/fvl-2020-0342>
- Chukwuma OJT, Joseph AO, Dike N. 2017. In vitro antiviral activities of *Aframomum melegueta* leaf extracts on Newcastle Disease Virus (NDV), Fowl Pox Virus (FPV) and Infectious Bursal Disease Virus (IBDV). *IDOSR Journal of Science and Technology*. 2(2): 33-45. Disponible en: <https://www.idosr.org/wp-content/uploads/2017/12/IDOSR-JST-22-33-45-2017-ON-1.pdf>
- Daina A, Michielin O, Zoete V. 2014. iLOGP: A Simple, robust, and efficient description of n-octanol/water partition coefficient for drug design using the GB/SA approach. *J Chem Inf Model*. 54(12):3284-3301. <https://doi.org/10.1021/ci500467k>
- Daina A, Michielin O, Zoete V. 2017. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*. 7(1):42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Daina A, Zoete V. 2016. A boiled-egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. *ChemMedChem*. 11(11):1117-1121. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600182>
- Drwal MN, Banerjee P, Dunkel M, Wettig MR, Preissner R. 2014. ProTox: a web server for the in silico prediction of rodent oral toxicity. *Nucleic Acids Research*. 42(W1):W53-W58. <https://doi.org/10.1093/nar/gku401>
- Fricker PC, Gastreich M, Rarey M. 2004. Automated Drawing of Structural Molecular Formulas under Constraints. *J Chem Inf Comput Sci*. 44(3):1065-1078. <https://doi.org/10.1021/ci049958u>

- Ganesan A. 2008. The impact of natural products upon modern drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*. 12(3):306-317. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.03.016>
- Garriga D, Navarro A, Querol-Audí J, Abaitua F, Rodríguez JF, Verdaguer N. 2007. Activation mechanism of a noncanonical RNA-dependent RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104(51):20540-20545. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704447104>
- Gayozo E, Rojas L, Castro L. 2022. Acoplamiento molecular entre la proteína viral 1 del virus de la enfermedad infecciosa bursal y fitoconstituyentes de *Withania somnifera* (L.) Dunal: Un enfoque computacional. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 33(5):e22022-e22022. <https://doi.org/10.15381/rivep.v33i5.22022>
- Ghisalberti EL. 1997. The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes. *Fitoterapia*, 68(4), 303-325. Disponible en: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:88747041>
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis 4(1):1-9. Disponible en: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
- Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR. 2012. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*. 4(1):17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
- Jumaa RS, Abdulmajeed DI, Karim AJ. 2021. Evaluation of secondary metabolites of herbal plant extracts as an antiviral effect on infectious bursal disease virus isolates in embryonated chicken eggs. *Vet World*. 14(11):2971-2978. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.2971-2978>
- Lipinski CA. 2004. Lead and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*. 1(4):337-341. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>
- Ludwiczuk A, Skalicka-Woźniak K, Georgiev MI. 2017. Chapter 11. Terpenoids. En: Badal S, Delgoda R, editores. *Pharmacognosy*. Boston: Academic Press. p. 233–266. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128021040000111>
- Nosrati M, Behbahani M. 2015. Molecular docking study of HIV-1 protease with triterpenoid compounds from plants and mushroom. *Arak Uni Med Sci J*. 18(3): 67-79. Disponible en: <http://jams.arakmu.ac.ir/article-1-3723-en.html>
- Pant M, Ambwani T, Umaphathi V. 2012. Antiviral activity of ashwagandha extract on infectious bursal disease virus replication. *Indian Journal of Science and Technology*. 5(5): 2750-2751. <https://doi.org/10.17485/ijst/2012/v5i5.20>
- Pérez JR, Ramos CS, Gamboa AV, Cabarcos NP, Murgas GF. 2009. Uso de microdosis de aloe vera L. en el asma bronquial. *MEDICINA NATURISTA*, 2009; Vol. 3 - N.º 2: 66-71. S.S.N.: 1576-3080.
- Petersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. 2004. UCSF Chimera. A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*. 25(13):1605-1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Poroikov VV. 2020. Computer-aided drug design: from discovery of novel pharmaceutical agents to systems pharmacology. *Biochem Moscow Suppl Ser B*. 14(3):216-227. <https://doi.org/10.1134/S1990750820030117>
- Saboon, Chaudhari SK, Arshad S, Amjad MS, Akhtar MS. 2019. Natural Compounds Extracted from Medicinal Plants and Their Applications. En: Akhtar MS, Swamy MK, Sinniah UR, editores. *Natural Bio-active Compounds. Volume 1. Production and Applications*. Singapore: Springer. p. 193–207. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7154-7_7
- Sharma JM, Kim IJ, Rautenschlein S, Yeh HY. 2000. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Developmental & Comparative Immunology*. 24(2):223-235. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(99\)00074-9](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00074-9)
- Stierand K, Maaß PC, Rarey M. 2006. Molecular complexes at a glance: automated generation of two-dimensional complex diagrams. *Bioinformatics*. 22(14):1710-1716. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl150>
- Sun Y, Song M, Niu L, Bai X, Sun N, Zhao X, Jiang J, He J, Li H. 2013. Antiviral effects of the constituents derived from Chinese herb

- medicines on infectious bursal disease virus. *Pharmaceutical Biology*. 51(9):1137-1143. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.781197>
- Trott O, Olson AJ. 2010. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*. 31(2):455-461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Volkamer A, Griewel A, Grombacher T, Rarey M. 2010. Analyzing the topology of active sites: on the prediction of pockets and subpockets. *J Chem Inf Model*. 50(11):2041-2052. <https://doi.org/10.1021/ci100241y>
- Volkamer A, Kuhn D, Grombacher T, Rippmann E, Rarey M. 2012. Combining Global and Local Measures for Structure-Based Druggability Predictions. *J Chem Inf Model*. 52(2):360-372. <https://doi.org/10.1021/ci200454v>
- Yang JL, Ha TKQ, Dhodary B, Pyo E, Nguyen NH, Cho H, Kim E, Oh WK. 2015. Oleanane Triterpenes from the Flowers of *Camellia japonica* Inhibit Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) Replication. *J Med Chem*. 58(3):1268-1280. <https://doi.org/10.1021/jm501567f>
- Yang W, Chen X, Li Y, Guo S, Wang Z, Yu X. 2020. Advances in Pharmacological Activities of Terpenoids. *Natural Product Communications*. 15(3):1-13. <https://doi.org/10.1177/1934578X20903555>

Forma de citación del artículo:

Arce, C. D. J. y Gayozo, E. (2023). Evaluación y detección bioinformática de terpenoides con potencial inhibitorio de la proteína viral 1 (VP1) del virus de la bursitis infecciosa. *Rev Med Vet Zoot*. 70(3): e106011. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v70n3.106011>