

Diseño *in silico* para estudio sobre  
acoplamiento molecular de inhibidores de  
mJHBP procedente del culícido vector *Aedes  
aegypti*

TESIS

Para ameritar el grado de  
Licenciatura en Biología

Presenta:

Martínez Osornio Arturo Alan

Directora:

Doctora Aguilar Castro Liliana Mireya

Mineral de la reforma, Hidalgo, año 2022.



Mineral de la Reforma, Hgo., a 31 de mayo de 2022

Número de control: ICBI-D/729/2022  
Asunto: Autorización de impresión.

**MTR. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO**  
**DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH**

Con fundamento en lo dispuesto en el Título Tercero, Capítulo I, Artículo 18 Fracción IV; Título Quinto, Capítulo II, Capítulo V Fracción IX del Estatuto General de nuestra Institución, por este medio le comunico que el Jurado asignado al Pasante de la Licenciatura en Biología **Arturo Alan Martínez Osornio**, quien presenta el trabajo de titulación "**Diseño *in silico* para estudio sobre acoplamiento molecular de inhibidores de mJHBP procedente del culicido vector *Aedes aegypti***", después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

**Presidente** Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzún

**Secretario:** Dr. Antonio Rafael Tapia Benavides

**Vocal:** Dra. Liliana Mireya Aguilar Castro

**Suplente:** Dr. Pablo Octavio Aguilar

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente  
"Amor, Orden y Progreso"

Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval  
Director del ICBI



0AAS/YCC

Ciudad del Conocimiento  
Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia  
Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo,  
México. C.P. 42154  
Teléfono: 771 71 729 00 ext. 2231 Fax 2109  
direccion\_ictbi@uaeh.edu.mx

*Nobilísima condición humana,  
que te hace comprender la realidad,  
viendo para la generación hermana,  
que el mundo ha de heredar.*

*No es acaso deber celestial  
brindar lo mejor a la humanidad?  
Todo organismo esta conectado en una red universal,  
pues formamos parte de la misma entidad.*

## Agradecimiento

Agradezco a la Doctora Liliana Mireya Aguilar Castro por la dirección del presente trabajo.

# ÍNDICE

ÍNDICE	5
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	8
1. RESUMEN	10
2. ABSTRACT	11
3. INTRODUCCIÓN	12
3.1. Incidencia global de infecciones	13
3.2. Riesgos ecológicos y laborales de los plaguicidas convencionales	13
3.3. Desarrollo de mecanismo desintoxicantes y resistencia a los insecticidas por parte de culícidos	14
3.5. Mecanismos moleculares de defensa de los mosquitos	16
4. MARCO TEÓRICO	19
4.1. Función e importancia de las hormonas JH como mecanismos de regulación fisiológica	19
4.2. Función de las OBPs ( <i>Odorant Binding Proteins</i> )	25
4.3. Función y estructura de las mJHBP en insectos	31
4.4 Interacciones Proteína-ligando	39
4.5. Desarrollo de ligandos <i>In silico</i>	42
4.6. Acoplamiento molecular	43
5. JUSTIFICACIÓN	40
6. HIPÓTESIS	42
7. OBJETIVO GENERAL	42
8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42

9. MATERIALES Y MÉTODOS	43
9.1. Materiales	43
9.1.1 <i>Hardware</i>	43
9.1.2 <i>Software</i>	43
9.1.3. <i>Webtools</i>	43
9.2 Método	44
9.2.1. Análisis estructural del receptor proteico y las interacciones con el ligando JH III-10R	45
9.2.2. Desarrollo del farmacóforo	45
9.2.3. Diseño de las estructuras 3D de los ligandos	46
9.2.4. Realización de acoplamientos moleculares seriados	46
9.2.6. Validación de la afinidad, fidelidad y estabilidad estructural de los acoplamientos	47
9.2.7. Estimación dell grado de toxicidad de los candidatos	47
9.2.8. Acoplamientos moleculares de control	47
9.2.9. Selección de la estructura más óptima	48
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
10.1. Estructura y acoplamiento de la JH III-10R con el receptor mJHBP	59
10.2. Diseño del farmacóforo basado en ligando	58
10.3. Ligandos diseñados y análisis estructural	62
10.4. Distribución de cargas y momento dipolar	66
10.5. Acoplamientos moleculares y validación de estabilidad	70
10.6. Acoplamientos con D145	73
10.7. Acoplamientos con D180	78
10.7. Acoplamientos con D194	83
10.8. Evaluación ADME y predicción de la toxicidad de las estructuras generadas	88
10.9. Acoplamientos moleculares de control	95

11. CONCLUSIONES	105
12. REFERENCIAS	106

# LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

## Figuras

1. Estructuras de las 9 formas de hormonas juveniles encontradas en insectos	22
2. Vista de ambas proteínas del tipo JHBP	29
3. Detalle de los bolsillos internos con los respectivos sitios de unión	29
4. Mapa topológico de la 2RQF	32
5. Mapa topológico de la mJHBP	33
6. Resumen gráfico de la metodología seguida	44
7. Diagrama de cableado de la proteína mJHBP	50
8. Vista superficial de las cadenas A, B y C	51
9. Canal de entrada/salida 5v13	52
10. Disposición de las cavidades del sitio de unión interno de las cadenas A, B y C	54
11. Estructura de JH III-10R	55
12. Mapa de interacciones entre el ligando JH III-10R y residuos en el bolsillo de unión	56
13. Disposición espacial del ligando dentro del bolsillo de unión interno	57
14. Disposición espacial de las cadenas laterales interactuantes con la hormona JH III-10R	58
15. Características farmacofóricas derivadas del ligando JH III-10R	60
16. Características farmacóforo derivado	62

17. Estructura del ligando D145	63
18. Estructura del ligando D180	18
19. Estructura del ligando D194	65
20. Distribución de las cargas moleculares	68
21. Momentos dipolares	69
22. Estructura de ligandos y residuos interactuantes	72
23. Mapa de interacción D145 cadena A	74
24. Mapa de interacción D145 cadena B	75
25. Mapa de interacción D145 cadena C	76
26. Disposición espacial del ligando D145	77
27. Mapa de interacción de D180 cadena A	79
28. Mapa de interacción de D180 cadena B	80
29. Mapa de interacción de D180 cadena B	81
30. Disposición espacial del ligando D180	82
31. Mapa de interacción de D194 cadena A	83
32. Mapa de interacción de D194 cadena B	84
33. Mapa de interacción de D194 cadena C	85
34. Disposición espacial del ligando D194	86

## **Tablas**

1. Resultados del análisis ADME	92
2. Resultados de actividad toxicológica	94
3. Resultados de los acoplamientos moleculares de control	97

## RESUMEN

El incremento en la prevalencia de infecciones virales y parasitarias transmitidas por mosquitos vectores, se ve favorecida en zonas tropicales por el aumento de su dispersión, promovida por el cambio climático, fenómenos de la globalización y el desarrollo de poblaciones silvestres con distintos tipos de resistencia a pesticidas. En consecuencia, se requieren de compuestos con un nuevo enfoque de precisión molecular, capaces de solventar las actuales y futuras problemáticas que surjan entorno a este problema de salud mundial.

Por lo cual, se realizaron estudios sobre acoplamiento molecular usando AutoDock Vina (1.1.2) con la estructura cristalina del transportador de hormonas JH III, mJHBP de *Aedes aegypti* (Vector de 54 virus y 2 especies de del género Plasmodium), procedente de la base de datos del PDB y estructuras de los ligandos teóricos generados y optimizados a partir del farmacóforo diseñado *in silico* que mostraron mayor fuerza de unión.

Los resultados mostraron que los ligandos sintéticos creados a partir de un diseño racional, poseen alta afinidad como inhibidores competitivos del bolsillo de unión interno altamente discriminante de la hormona JH III-10R. Además, se aplicaron filtros ADME y de toxicidad con el fin de seleccionar las estructuras más óptimas para su posible aplicación en un contexto real, lográndose un inhibidor con las características necesarias para ser considerada en fases de experimentación *in vitro*.

Palabras clave: Hormona juvenil, mosquito, diseño, inhibidor.

## **ABSTRACT**

The increase in the prevalence of viral and vector parasitic infections transmitted by vectors are favored in tropical zones by the increase of their dispersion, promoted by the climate change, globalization phenomena and the accretion in resistance to conventional pesticides. Consequently, compounds with a new molecular precision approach are required.

Therefore, molecular docking studies were performed using AutoDock Vina (1.1.2) with the crystalline structure of the *Aedes aegypti* odorant carrier mJHBP, (vector of 54 viruses and 2 plasmodium species), from the PDB database and structures of the theoretical ligands generated and optimized *in silico* that showed greater bond strength.

The results showed that the synthetic ligands created from a rational design, possess high affinity as competitive inhibitors of the highly discriminating internal binding pocket of the hormone JH III-10R. In addition, ADME and toxicity filters were applied in order to select the most optimal structures for possible application in a real context, achieving an inhibitor with the necessary characteristics to be considered in *in vitro* experimentation phases.

Key words: Juvenile hormone, mosquito, design, inhibitor.

## INTRODUCCIÓN

### Dispersión de los Culícidos: Un problema global en aumento

El actual cambio ambiental global ha favorecido la alteración significativa de la climatología a nivel mundial de forma drástica, aumentándole a tal grado que en latitudes templadas es posible hallar organismos tropicales viviendo allí sin gran dificultad. Esto junto con la migración humana creciente y la alta conectividad entre naciones, ha promovido la dispersión de mosquitos (Familia Culicidae) hematófagos, y por tanto, vectores de virus y parásitos causantes de enfermedades entre distintos continentes, países y regiones (Originalmente mayoría con dispersión cosmotropical, ocupando el área propia de la isoterma de verano entre latitudes 35° N y 35° S (Gómez & Ibañez, 1994 y López y Neira, 2016).

Recientemente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha generado un listado con los vectores de enfermedades con mayor impacto en la población humana global destacándose los mosquitos de los géneros: *Aedes*, capaces de transmitir: Chikungunya, fiebre amarilla, dengue, zika (Arbovirus), filariasis linfática (nematodos de la superfamilia Filarioidea); *Anopheles*, que transmiten Malaria (*Plasmodium falciparum*) y filariasis linfática. Mientras que especies del género *Culex*, que transmiten Fiebre del Nilo Occidental y filariasis linfática. En México, dada la colindancia de la región neártica y neotropical, así como su orografía, existe una gran diversidad en la culicofauna, con la superposición de poblaciones de mosquitos de climas tropicales y templados, siendo que el territorio mexicano alberga 211 especies de estos insectos, ocupando el 14º lugar a nivel mundial en diversidad de mosquitos culícidos (Bohart & Whasino, 1978; Foley *et al.*, 2007 y World Health Organization, 2020a).

En el estado de Hidalgo se han contabilizado entre el 2004 y 2014 solo 9 egresos hospitalarios por fiebre vírica por picadura de mosquito, en tanto que en el estado de Veracruz se reportaron 3239 casos, siendo un foco de alarma dada la colindancia geográfica. Se han descubierto nuevas especies de virus asociados a enfermedades mortales e incapacitantes, donde los mosquitos son vectores destacados, de los cuales varias especies de virus pueden ser transmitidos por una sola especie de mosquito. Estos factores son de alta prioridad a considerar por los distintos sectores de salud a nivel mundial, respecto a la alta

tendencia de dispersión de estas especies vectoras y a la grave amenaza que representa esta situación a la salud de la población humana global (Atoni *et al.*, 2019 y Manzanares, 2018).

### **Incidencia global de infecciones**

El comportamiento pandémico de estas enfermedades son un foco de alarma latente, debido a que el constante aumento de la población humana en zonas intertropicales (principalmente), predispone a un gran número de sus integrantes a padecer (Por probabilidad) dengue, zika malaria, etc; por lo que es menester generar alternativas a las ya existentes y por aplicarse, que permitan una alta eficacia para combatir a estos vectores.

A saberse, aunque ha habido cierta reducción en casos de infección de malaria a nivel mundial, por ejemplo, este fenómeno parece no ser constante en todas las situaciones y en todas las latitudes, pues las diferencias económicas entre los distintos países; así como en las herramientas y técnicas para la prevención, protección y tratamiento de estas enfermedades, han tenido resultados variables que podrían comprometer seriamente la salud pública de las generaciones actuales y venideras. Ejemplificando, en el periodo comprendido entre el 2015-2018, hubo un descenso en las muertes estimadas a nivel global de 585 000 a 405 000 casos (tomando en cuenta que la tasa de mortalidad por malaria es del # muertes por cada 100,000 habitantes en riesgo) (Brady *et al.*, 2020; Kilpatrick, 2008 y World Health Organization, 2019 y 2020b).

### **Riesgos ecológicos y laborales de los plaguicidas convencionales**

Como medidas de control y saneamiento contra estos vectores, se suelen ejecutar de forma periódica y ligada a la temporada de lluvias, campañas de fumigación en espacios abiertos y cerrados, con el objetivo de eliminar la viabilidad de uso de algunos sitios de recepción de agua y humedad, como lugar de puesta de huevos de mosquito, desarrollo de larvas y supervivencia de las formas adultas. Para ello se pulverizan compuestos químicos de actividad neurotóxica con acción específica sobre estos organismos, como los piretroides (Derivados de piretrinas), cuyo grupo funcional ciclopropano carboxilato, es el responsable de actuar afectando el transporte de iones sodio en la vaina de mielina de los axones. Los compuestos organoclorados, los cuales poseen cloro en

sus anillos heterocíclicos, actuando a nivel electroquímico, dañando el potencial de acción de manera antagonista a los canales de sodio en los axones. En cuanto a los compuestos organofosforados (que poseen P en lugar de Cl) actúan como disruptores de la enzima acetilcolinesterasa en la sinapsis (DOF, 2014).

Debe de considerarse que, así como los culícidos son afectados por estos compuestos pulverizados y liberados al ambiente, otros organismos también pueden sufrir afectaciones considerando su toxicocinética, ya que estos compuestos son rápidamente absorbidos por los tejidos superficiales de los organismos y vía epitelio respiratorio; pasando a la sangre y distribuyéndose hacia tejidos y órganos (por su alta liposolubilidad penetran con gran eficacia barreras biológicas). Con ello, bioacumulándose entre los distintos organismos con los cuales entra en contacto, acentuándose así la inclusión de estos compuestos xenobióticos en las distintas cadenas tróficas y posiblemente afectando en grado variable a los distintos ciclos biológicos (Gasca *et al.*, 2011 y Özkara *et al.*, 2016).

También se ha de destacar que la exposición prolongada, paulatina y/o a altas concentraciones puede desembocar en problemas crónicos, al actuar como cancerígenos, teratógenos, neurotóxicos, daños en tejidos pulmonares (y el sistema respiratorio en general), ojos, sistema inmunológico, etc. Sin embargo, existen diversos mecanismos moleculares que permiten la eliminación de xenobióticos, minimizando el daño a nivel sistémico (también dependiendo de la concentración y modo de acción) (Karam *et al.*, 2004).

### **Desarrollo de mecanismo destoxificantes y resistencia a los insecticidas por parte de culícidos**

Es evidente que acontecen cambios en la dinámica poblacional de la fauna de culícidos vectores, tanto genéticos como ambientales, algunos más aleatorios, periódicos o controlados, otros temporales o permanentes, siempre asociados en algún grado a la aplicación de los distintos plaguicidas. A saberse, la intensidad y presión de selección ejercido por los diferentes tipos de plaguicidas actuarán como factores desequilibrantes en el número de generaciones por año, durabilidad del ciclo de vida, cambios en las frecuencias de genotipos resistentes en las poblaciones, estabilidad de la mutación, número de genes responsables de la resistencia heredados (si la resistencia es monogénica o poligénica

(si es regulada por un solo gen o es la suma funcional de varios genes)), tasa de inmigración, emigración y reproducción entre los mosquitos establecidos y los que emigraron, historial de la exposición previa a otros insecticidas etc. (Bisset, 2002 y Dzul *et al.*, 2007).

Aunado a lo anterior, otros son los factores operativos propios de la ejecución de las campañas de prevención contra estos dípteros, tales como el o los tipos de moléculas usados, dosis, frecuencia de aplicación, residualidad y persistencia ambiental de la molécula; rotación de los distintos tipos de plaguicidas, tipo de equipo de aspersión, calibración de equipos de fumigación, uso de coadyuvantes, calidad de las aguas, sinergismo entre los productos mezclados, etc. Estos puntos mencionados, han ejercido una presión selectiva diferencial en las poblaciones de mosquitos vectores; pues solo aquellos que presentan la o las mutaciones sobreviven sin tanta dificultad (selección direccional, el uso de compuestos insecticidas paulatinamente a resultado de forma inconsciente en favorecer la proliferación de diversas cepas cada vez más resistentes a un mayor número de compuestos y combinaciones de los mismos), quedando solo algunos individuos capaces de reproducirse y heredar estos genes a la siguiente generación (futura población plaga) (Bisset, 2002 y Lenormand *et al.*, 1999).

Los culícidos poseen múltiples estrategias contra los compuestos insecticidas usualmente pulverizados, clasificados en 4 tipos básicos: Metabólicos, fisiológicos, físicos y etológicos (cada uno consecuencia del anterior); con implicaciones desde insensibilidad a los compuestos en los sitios blanco, hasta el engrosamiento cuticular (Miller, 1988).

La resistencia metabólica consiste en el aumento en la tasa metabólica de un compuesto determinado, generando la rápida descomposición de las moléculas, desactivando su función y expulsando la sustancia antes de que causen un daño. La clave está en la rápida sobretraducción de enzimas específicas para cada compuesto insecticida (inducción enzimática) antes de que ingresen en gran cantidad, evitando una saturación del sustrato y facilitando la veloz descomposición de las moléculas antes de que causen daño dada su alta concentración y mecanismo de acción. La resistencia fisiológica está determinado por cambios estructurales en los receptores/moléculas objetivo, lo que evita la unión/acción de los compuestos insecticidas (organofosforados, carbamatos y piretroides, por ejemplo). En cambio, la resistencia física conlleva cambios estructurales que desencadenan en el grosor de la

cutícula o por modificaciones en las válvulas de los espiráculos de su sistema respiratorio, inhibiendo o retardando la penetración de estos compuestos hacia su hemolinfa. Esto evita que su sistema de desintoxicación sea sobrecargado.

También pueden presentar cambios etológicos, por ejemplo, modificaciones en su conducta común que les permite escapar de la nube rociada del plaguicida, como ubicarse en las partes altas de los árboles, paredes, techos, rocas etc; esconderse en depresiones, rugosidades u oquedades de superficies variadas. O evitar el contacto con superficies previamente rociadas. No obstante, también es plausible añadir dos tipos más, que hacen énfasis en la pérdida de sensibilidad a la acción de uno o múltiples compuestos: Resistencia cruzada, es la aplicación de un único mecanismo de resistencia contra 2 diferentes clases de insecticidas molecularmente diferentes. Y por último la resistencia múltiple. Representada por la insensibilidad a diversos compuestos derivados de distintas familias y/o con distintos mecanismos de acción, presentes en poblaciones de mosquitos con varios modos de resistencia (Bisset, 2002; Chaverra *et al.*, 2012; Fonseca & Quiñones, 2005 y Gonzáles, 2013.)

Ya que frecuentemente, las resistencias a pesticidas conllevan la ejecución de distintos mecanismos de desintoxicación, que suele implicar la acción de múltiples enzimas, el uso frecuente de distintos compuestos insecticidas resultará en una intensa selección. Por lo anterior, aumentará la obvia probabilidad de aparición de resistencia cruzada y/o múltiple en las nuevas generaciones, ello dependiendo del grado de dominancia o heredabilidad del gen o genes responsables de estos mecanismos de defensa.

### **Mecanismos moleculares de defensa de los mosquitos**

Estos están mediados por mutaciones (puntuales no silentes, en genes estructurales) y sobretranscripción de los genes codificantes responsables de la traducción de enzimas con capacidad desintoxicante. Como resultado se obtienen diferentes grados de resistencia polifactorial, pues son múltiples los mecanismos implicados en la neutralización y resistencia hacia los pesticidas comúnmente usados. En otras palabras, los mosquitos poseen navajas suizas moleculares, es decir, disponen de múltiples herramientas moleculares eficientes, con las cuales hacer frente de forma eficaz a los problemas de origen

antrópico que pudieran amenazar su existencia (conjunto de genes y moléculas que le confieren resistencia a una especie concreta a compuestos xenobióticos: Pesticidas, antibióticos, antimicóticos, etc.).

Por ejemplo, las acetilcolinesterasas cuya función es catalizar hidrólisis de moléculas de acetilcolina, sobre el plasmalema de nervios postsinápticos. Suele ser molécula objetivo de carbamatos y plaguicidas organofosforados, inhibida por carbamylatación de la Serina del sitio activo o por fosforilaciones covalentes. Las enzimas AChE1 y AChE2 presentes en culícidos, pierden sensibilidad (knockdown) al sufrir mutaciones por sustitución de aminoácidos específicos próximos al sitio activo (Modificando su capacidad de unión), específicamente Phe-por-Val del residuo 290, que forma parte estructural del sitio activo. Son responsables de una resistencia diferencial según el plaguicida usado, y a su vez, es consecuencia de un mínimo de 3 duplicaciones recientes en el locus ace-1 (demostrado en *Culex pipiens*, en el locus G119S del exón 5, correspondiente al tercer exón de codificación), dando como consecuencia polimorfismos que se traducen en cambios estructurales diferenciales en las enzimas objetivo; y por ello los desiguales grados de resistencia (Alout *et al.*, 2007; Elanga-Ndille *et al.*, 2019; Fonseca & Quiñones, 2005; Knutsson *et al.*, 2018 y Labbé *et al.*, 2007).

Las carboxilesterasas, cuya función es catalizar la hidrólisis de enlaces ésteres y amidas en múltiples sustratos, están implicadas en vías de detoxificación de xenobióticos a compuestos a carbamatos, organofosforados y en última instancia a piretroides. Esta enzima ha favorecido la resistencia a plaguicidas gracias a la duplicación de genes codificantes, generando sobreexpresión (constitutiva) (en géneros: *Aedes albopictus* (CCEAE3A y CCEAE6A) y *Aedes aegypti* (AAEL023844) Anopheles y *Culex*), actuando como mecanismo de selección y evolución adaptativa. Suelen encontrarse asociadas a mutaciones puntuales en genes como: ace-1G119S (en *Culex pipiens*), brindando y aumentando la capacidad de metabolismo de fosforotioatos y malatión (Cattel *et al.*, 2020).

Como en el caso de las isoenzimas Glutathion S transferasas, implicadas en el metabolismo de xenobióticos como los organoclorados, actuando como catalizadores de las uniones de capacidad electrofílica con el SH de glutatión reducida (GSH). Su función es proteger las moléculas biológicas del daño tóxico, oxidativo, etc. que provocan moléculas de pesticidas al unirse covalentemente a ellas, generando subproductos de

fácil excreción al ser hidrosolubles (Hemingway *et al.*, 2004 y Wang *et al.*, 2008).

Además de las anteriores, las enzimas citocromo p450, se encuentran particularmente implicadas en el metabolismo de compuestos insecticidas en culícidos. Se encargan de catalizar la oxidación de xenobióticos o compuestos endógenos en presencia de CPR (NADPH-citocromo P450 reductasa), que es el donante de e- obligado y en ciertas ocasiones reemplazada por citocromo b5. En culícidos esta enzima es traducida de más de 100 genes CYP. También se ha demostrado que podría actuar sinérgicamente con otras enzimas (glutatión S-transferasa, esterasa  $\alpha$  y esterasa  $\beta$ ), generando resistencia múltiple a insecticidas neurotóxicos, mediada por mutaciones en genes P450 y P450s (Fagbohun *et al.*, 2020; Ishak *et al.*, 2016 y Weedall *et al.*, 2019)

Evidentemente la gran mayoría de plaguicidas están dirigidos a dianas moleculares de fuerte implicación en el funcionamiento del sistema nervioso, y ya que estos receptores están presentando alteraciones, es conveniente focalizarnos en alternativas funcionales. En general, es obvio que el uso indiscriminado y sin rotación de los distintos plaguicidas, han generado una fuerte presión selectiva, desencadenando en cambios estructurales en las enzimas u otras moléculas objetivo, mediadas a su vez por duplicaciones génicas (resultante en mayor margen de amplitud en los haplotipos) y mutaciones varias, sobreexpresión génica, etc; evitando y/o disminuyendo la capacidad de unión a los sitios activos, así como optimizando el metabolismo de estos compuestos. Esta alarmante situación nos inclina a la imperiosa necesidad de buscar otras moléculas con propiedades plaguicidas, capaces de sustituir a las ya usadas comercialmente, que se encuentran en vías de total ineficacia ante la alarmante y pandémica amenaza de las enfermedades propagadas por esta fauna tan ampliamente extendida. Pero para vislumbrar nuevos mecanismos de acción, se requiere comprender mejor la biología de estos insectos.

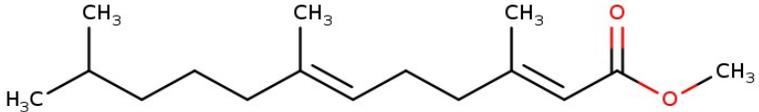
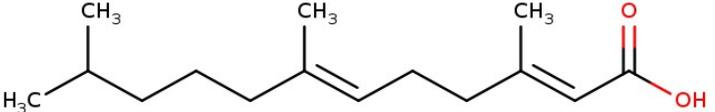
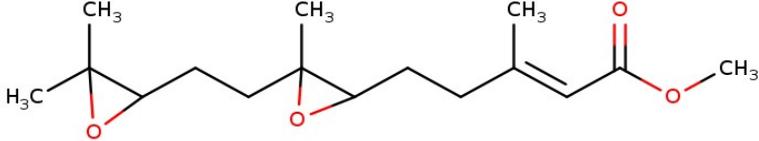
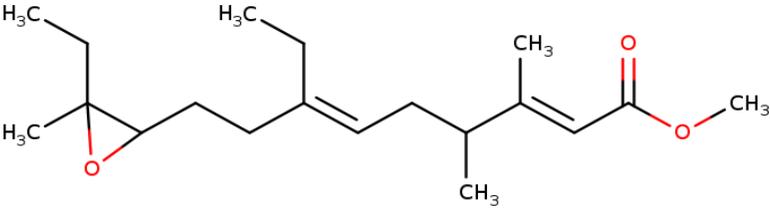
## MARCO TEÓRICO

### **Función e importancia de las hormonas JH como mecanismos de regulación fisiológica**

La JH posee grandes implicaciones fisiológicas en cuanto la madurez reproductiva, uniéndose a varios receptores altamente específicos según vía a iniciar, por lo cual, posee mayor diversidad estructural a comparación de otras hormonas: JH I, II y III, JH O, 4-metil JH, JHB3, MF, FA y el ácido de JH I. Sin embargo, la que tiene mayor importancia en el desarrollo gonadal y crecimiento es la JH III-10R, con frecuente presencia en la mayoría de los insectos, englobando a los culícidos. Estructuralmente son sesquiterpenos con un epóxido y un  $\alpha$ ,  $\beta$ - éster metílico insaturado, una en cada extremo (Fig. 1).

Teóricamente, el grupo éster le confiere resistencia a la degradación por hidrólisis o a la acción de enzimas nucleofílicas presentes en la hemolinfa mientras es transportada. Suelen ser sintetizadas primordialmente en los *corpora allata*, ubicada en la aorta, en el protórax del mosquito. Pero en *A. aegypti*, puede ser sintetizada en las glándulas accesorias. Estas hormonas tienen una gran polivalencia, dado que está comprometida en varios procesos fisiológicos con fuertes consecuencias etológicas: Reproducción, producción de feromonas, alimentación, ecdisis (Y por tanto, crecimiento), búsqueda de alimento, etc. (Areiza *et al.*, 2014; Kamita & Hammock, 2010; Li *et al.*, 2004; Meuti & Short, 2019 y Nouzova *et al.*, 2018).

	<p>JH 0</p>
	<p>JH I</p>
	<p>JH II</p>
	<p>JH III-10R</p>

 <p>Chemical structure of Methyl farnesate: <chem>CC(C)CC=CC(C)CC=CC(=O)OC</chem></p>	<p>Metil farnesoato</p>
 <p>Chemical structure of Farnesic acid: <chem>CC(C)CC=CC(C)CC=CC(=O)O</chem></p>	<p>Acido farnesoico</p>
 <p>Chemical structure of JH B3: <chem>CC1(C)OC1CC2(C)OC2CC=CC(=O)OC</chem></p>	<p>JH B3</p>
 <p>Chemical structure of 4-Methyl JH-I: <chem>CC1(C)OC1CC=CC(C)C=CC(=O)OC</chem></p>	<p>4-Metil JH-I</p>

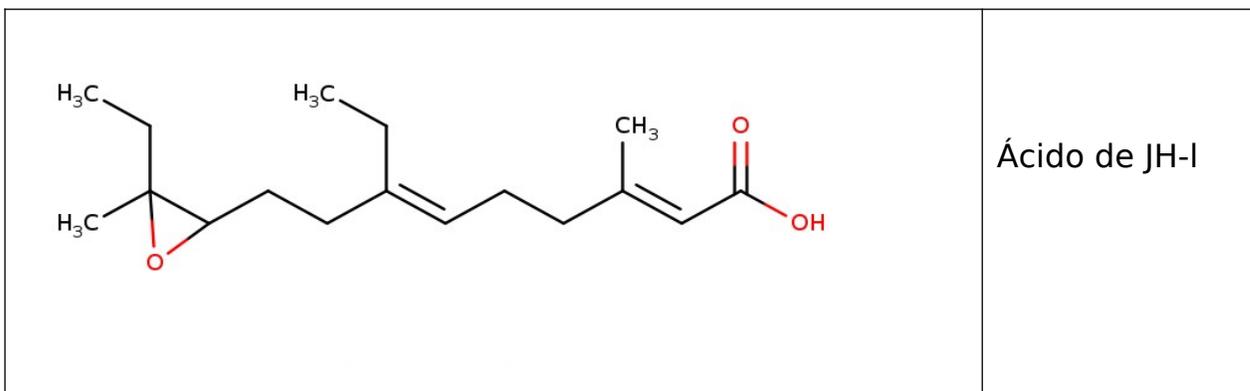


Fig. 1. Estructuras de las 9 formas de hormonas juveniles encontradas en insectos.

Esta familia de sesquiterpenoides está implicada en una gama ampliamente extendida de regulación fisiológica de vital importancia para el crecimiento, desarrollo, maduración y fertilidad en estos artrópodos. Las formas principales biológicamente activas poseen un epóxido y un  $\alpha$ ,  $\beta$  metil ester insaturado en extremos opuestos de la cadena principal (Siendo las JH 0, JH I, JH II, JH III-10R y JHB3 las mas destacables). Las estructuras restantes están identificadas como precursores e intermediarios, pero pueden actuar como análogos con actividad biológica. JH 0, JH I, JH II, se encuentran únicamente en el orden Lepidóptera, mientras que JHb3 parece ser exclusiva Cyclorrhapha. La JH III-10R, es la estructura más recurrente en culícidos y en el resto de insectos (Hagedorn, 2004 y Kamita & Hammock, 2010).

Los aumentos en los títulos de determinadas hormonas en la hemolinfa de culícidos (y de cualquier insecto) siempre conllevan cambios y repercusiones multidimensionales, que desembocan desde aumento de la fertilidad hasta búsqueda de alimento, de pareja reproductora; y en dado caso, de zona de puesta. Es por eso que el correcto entendimiento de los mecanismos de acción de estas hormonas, así como de otras moléculas implicadas en su biosíntesis, transporte y degradación, podrían favorecer el desarrollo de moléculas de diseño racional capaces de contrarrestar su función, comprometiendo la reproducción y esperanza de vida de culícidos vectores de enfermedades (Swevers, 2009).

Al iniciar el estado adulto, justo después de la eclosión, los culícidos experimentan un marcado incremento de los títulos de JH en la hemolinfa (llegando a su máximo a las 48 h, tras eclosión); sin embargo,

esta disminuye progresivamente tras la ingesta de sangre (nivel inferior después de 24 h), para luego volver a aumentar. Tras la ingestión de sangre, los culícidos experimentan liberación de hormona esteroideogénica ovárica (OEH) y la concentración de 20-hidroxiecdisona incrementa (4-6 h posterior a consumo de sangre y de nuevo entre las 12-30 h), volviendo el cuerpo graso más sensible a esta. Ello evidencia que los picos en las concentraciones de la JH disminuyen mientras la 20-hidroxiecdisona incrementa (Duvall, 2019 y Hernández *et al.*, 2015).

Cada ciclo gonotrófico termina a las 24-36 h finalizada cada ingesta de sangre, mientras tanto, la acumulación de YPP en ovocitos, así como su traducción van cesando simultáneamente. Esto ocurre por el cierre de los canales interfolliculares que la suministran y la unión de las paredes de las placas endocóricas. También el cuerpo graso sufre cambios celulares que le llevan a dejar de producir hormonas, para comenzar a almacenar glucógeno y lípidos (Rúa *et al.*, 2005 y Kaulenas, 2012).

Las dianas hormonales no suelen ser ubicuas, por lo que las hormonas requieren ser transportadas, para actuar sobre sus respectivos receptores, cuya concentración y nivel de respuesta debe ser ajustado dentro de rangos específicos. Por ejemplo, la JH es de vital importancia para el progreso de la previtelogénesis, ya que es responsable del aumento de la concentración de los precursores YPP para el crecimiento del ovocito, hasta alcanzar la etapa de reposo. En el intestino y cuerpo graso, esta hormona induce la transcripción de RNAs codificantes para determinadas proteínas ribosomales y tripsina, las cuales serán sintetizadas tras la ingestión de sangre (La cual proveerá los aminoácidos necesarios durante la traducción) (Zhu *et al.*, 2010 y Wu *et al.*, 2021).

Es en esta fase cuando los títulos de JH disminuyen, que coincide con la síntesis y aumento en la capacidad de respuesta ovárica a OEH, igualmente en el cuerpo graso para responder a la presencia de 20-hidroxiecdisona. La cascada de señalización devenida por los correspondientes receptores hormonales, inducen a *A. aegypti* a la búsqueda de pareja para apareamiento y en *C. pipiens*, resulta en estímulos para la búsqueda de comida de sangre. Es decir, tras la eclosión donde JH aumenta, cerebro, intestino, cuerpo graso y folículos ováricos, se vuelven tejidos diana para JH. Ello toma obviedad, pues cada estado conlleva al progreso en la madurez del insecto. Por tanto, hay concentraciones diferenciales y antagónicas entre la presencia de

esta hormona, y otras como la 20-E en los distintos procesos fisiológicos en progreso (Bowen, 1991; (Gulia *et al.*, 2015; Sieglaff *et al.*, 2005 y Zhu & Noriega, 2016).

Para el progreso de las etapas finales de la maduración del óvulo, es necesario que la concentración de JH circulante se suprima, por lo que se degrada rápidamente tras la ingesta de sangre, gracias a la acción enzimática de JH-epoxidasa y JH-esterasa. Por lo cual, solo hay niveles traza de JH 24h después de la ingesta de sangre (Hernández *et al.*, 2019; Kamita & Hammock, 2010 y Noriega & Nouzova, 2020).

No obstante, tras cada comida de sangre, posterior a un nuevo conjunto de ovocitos en desarrollo; es necesario disminuir los niveles de 20-E, mientras los niveles de JH aumentan para desencadenar su desarrollo previtelogénico. Es decir, el culícido dispone de una regulación endocrina que le permite la acumulación de vitelogenina en los ovocitos actuales, mientras ha de asegurar la previtelogénesis de los futuros. Esto ya que la 20-E estimula tanto el desarrollo de folículos primarios, como la aparición de los secundarios (Areiza *et al.*, 2014 y Li *et al.*, 2011).

También el consumo de néctar induce la síntesis inicial en los corpora allata de JH en adultos recién eclosionados. También se ha demostrado que los culícidos machos pueden sintetizar cierta cantidad de JH en las glándulas accesorias, por lo que las hembras pueden recibir JH extra tras cada inseminación. Asegurando y aumentando así la fertilidad de la hembra, y con ello el número de huevos en la puesta (Clifton *et al.*, 2014 Vrzal *et al.*, 2010).

Consecuentemente en este sentido, los niveles de JH disminuyen restableciendo el sistema tras la ingestión de sangre, para posteriormente volver a incrementarse para la siguiente previtelogénesis de los folículos secundarios. Esto ejemplifica la competencia o aptitud de cada tejido diana dispuesto a responder a cada hormona liberada, mostrando su estado receptivo según cada fase de maduración (Hansen *et al.*, 2014).

## **Función de las OBPs**

Los receptores olfativos captan los estímulos detectados con grado distinto de especificidad e intensidad según el odorante (Molécula que genera una respuesta olfativa en el insecto al estimular receptores específicos) identificado. Estos odorantes son transportados por proteínas especiales denominadas proteínas de unión a odorantes (OBPs), de circulación hemolinfática (Anton & Rössler, 2021 y Schmidt & Benton, 2020).

Las OBPs son una familia de proteínas con alta diversidad y gran divergencia en su estructura primaria en insectos, pero coincidentes en su reducido peso y tamaño (aproximadamente 14 kD). Estas OBPs están especializadas en el transporte de moléculas de olor provenientes de alimento, humedad ambiental, feromonas, etc. La mayoría se unen a compuestos altamente variables, los cuales suelen ser mayormente hidrófobos. Por lo cual al unirse a su OBP específica se solubilizan en la hemolinfa, protegiéndose de la degradación y haciendo posible su transporte, para conducirlos hasta los receptores específicos correspondientes (Kim *et al.*, 2017; Jablonka *et al.*, 2019 y Sun *et al.*, 2018).

Dentro de la familia OBP (relativamente relacionadas a ellas), se encuentran las proteínas salivales D7, características de Dípteros hematófagos; y por tanto, presentes en la familia y subfamilia Culicidae y Phlebotominae respectivamente. Típicamente estas proteínas poseen 2 formas, una denominada corta, de un dominio activo y la otra larga, con 2 dominios activos (En ambas formas se trata de dominios del tipo OBP, por tanto, son algo conservados). Lo anterior es debido a que los múltiples genes codificantes del grupo de las proteínas D7, sufrieron duplicaciones seriadas a lo largo de su historia evolutiva, lo que a su vez resultó en una divergencia funcional. Al haber múltiples copias del gen con mutaciones distintas, generaron variabilidad en la disposición, número y longitud de los dominios de los respectivos traductos, así como en su capacidad de unión y reconocimiento de distintos ligandos (Jablonka *et al.*, 2019).

Ello resultando en una forma de dominios largos y otra de dominios cortos. Estos dominios conforman parte de un bolsillo de unión a tromboxanos y cisteinil leucotrienos, así como algunas aminas biogénicas sintetizadas por los hospederos de estos Dípteros. Es evidente su preferencia de unión a estos derivados de eicosanoides, dado que tienen participación en procesos de inflamación, coagulación y agregación plaquetaria, dificultando la succión de sangre por parte de insectos como los mosquitos. Por lo tanto, son secretadas en la saliva que usan como vehículo para entrar en contacto con la superficie interna del epitelio que los mosquitos perforan con sus estiletes, evitando la coagulación y reacciones de inflamación, asegurando así; un suministro rápido y fluido de alimento de sangre (Calvo *et al.*, 2006 y Martin *et al.*, 2020).

Estas D7 tienen dentro de un bolsillo alargado interno, ubicado en el dominio OBP N-terminal, un sitio de unión conformado por aminoácidos con grupos R- apolares (a manera de residuos conservados); que revisten dicha cavidad y le confieren la afinidad necesaria para facilitar la atracción y el acoplamiento para ligandos estructuralmente relacionados con cadenas largas de ácidos grasos poliinsaturados. Las proteínas D7 de culícidos manifiestan por otra parte, relación evolutiva con OBPs, demostrada en las secuencias de los residuos que conforman el dominio C-terminal, este último mantiene relación estructural con parte del canal interno de unión a aminas biogénicas (Calvo *et al.*, 2006; Jablonka *et al.*, 2019 y Mans *et al.*, 2007).

### **Función y estructura de las mJHBP en insectos**

A su vez estructuralmente relacionadas con las D7 en culícidos, se encuentran las proteínas mJHBP (proteínas de unión a hormona juvenil en mosquitos), las cuales presentan un dominio doble tipo OBP y una configuración 3D funcional con el mismo ordenamiento. En el dominio N-terminal se encuentran dispuestas en un plegamiento denso, un total de 7 hélices  $\alpha$ , cuyos residuos a su vez, son mayoría de los integrantes que conforman las paredes de un bolsillo alargado interno, con similares propiedades hidrófobas de las D7. Ello le confiere a la mJHBP, la capacidad de unión a las hormonas JH II y JH III-10R, en estos plegamientos proteicos propios de la familia Culicidae; ambas proteínas parálogas dentro de este clado, pues presentan homología en sus secuencias aminoacídicas y en su conformación 3D.

Debido a que la JH III-10R es insoluble en agua, para poder circular por la hemolinfa y llegar hasta sus receptores, requiere de la unión altamente específica a proteínas transportadoras. Es aquí donde la mJHBP ejerce su función, al permitir la unión altamente selectiva del enantiómero -10R de JH III-10R a cada uno de sus 3 sitios de unión (siendo un homotrímero, uno por cada subunidad), quedando protegidas de la degradación durante su transporte en bolsillos internos. Es decir, esta proteína evita que la JH III-10R quede restringida en la periferia de las células secretoras y sea rápidamente degradada por enzimas de acción nucleofílica al llegar a ingresar a la hemolinfa y Por lo anterior, es lógico que existan más proteínas con estas funciones en otros grupos de insectos, dada la importancia fisiológica de esta hormona (Kim *et al.*, 2017 y Jablonka *et al.*, 2019).

Concretamente los autores Kim *et al.*, 2017 en su investigación, encontraron que especies de los géneros *Aedes*, *Anopheles* y *Culex*, poseen genes ortólogos codificantes para el traducto mJHBP, el cual se encuentra ausente en otros grupos de insectos, siendo entonces una sinapomorfia molecular entre las especies de este clado. Sin embargo cabe mencionar que hay proteínas análogas en función como transportadoras de JHs en otros insectos (Proteínas de unión a JH hemolinfática (hJHBP)) (Orth *et al.*, 2003), con ejemplos en los lepidópteros *Manduca sexta*, *Galleria mellonella* y *Bombyx mori* (BmJHBP), pero pertenecen a familias proteicas distintas y difieren drásticamente en sus secuencias aminoacídicas; así como en su estructuras 3D, teniendo entonces diferentes conformaciones y dominios, cambiando la configuración de cada bolsillo de unión (ello sobre todo comparando con la mJHBP) (Kołodziejczyk *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2016 y Suzuki *et al.*, 2011).

Enfatizando, las BmJHBP como un subtipo de las hJHBP propias de lepidópteros, se les incluyen dentro de la familia takeout, debido a la presencia de característicos dominios altamente lipofílicos, denominados dominios TULIP (constituidos de una lámina  $\beta$  antiparalela marcadamente arqueada, que envuelve a manera de rollo una hélice  $\alpha$  dextrógira); que conforman los respectivos bolsillos con sitios de unión internos, de alta afinidad a ligandos hidrófobos, lo que evidentemente, les engloba dentro de la superfamilia TULIP (proteínas conservadas y propias del dominio Eucariota). Los miembros proteicos de esta superfamilia, suelen estar implicados igualmente en el transporte de

múltiples moléculas lipídicas (Alva y Lupas, 2016; Dupas *et al.*, 2020 y Suzuki *et al.*, 2011).

En el caso de la BmJHBP (PDB: 2RQF, ver Fig. 2.), se trata de una proteína con una arquitectura tipo  $\alpha$ ,  $\beta$  *super roll*, y dado su tipo de plegado, presenta una conformación topológica dispuesta en 3 pares de láminas  $\beta$  antiparalelas formando un cilindro, cuya cavidad parece abrazar o enrollar sobre una hélice  $\alpha$  larga, con segmentos tipo loop hacia ambos extremos. Se constituye de los motivos 4  $\beta$  hairpins antiparalelos, 4  $\beta$  bulges antiparalelos, 9 strands, 24 giros  $\beta$ , 2 giros  $\gamma$ , y 4 hélices  $\alpha$  dextrógiras con 3 interacciones  $\alpha$ - $\alpha$ . El orden secuencial de ello les confiere una conformación alargada. Está constituida de una sola cadena de 227 residuos (Buxbaum, 2007 y Suzuki *et al.*, 2011).

Por el contrario, la mJHBP (PDB: 5V13, ver fig. 2.) posee una arquitectura tipo  $\alpha$ , $\alpha$  complex, con una conformación topológica constituida principalmente por hélices  $\alpha$ , $\alpha$  dextrógiras; integrada por los siguientes motivos: 16  $\alpha$  hélices, formando un total de 32 interacciones  $\alpha$ - $\alpha$ , con 1 par  $\beta$  bulge antiparalelo, 1  $\beta$  hairpin, 2 strands antiparalelas, 14 giros  $\beta$  y algunos loops. Consta de 288 residuos por subunidad. Presenta una estructura cuaternaria integrada por 3 subunidades de ensamble homomérico (Buxbaum, 2007 y Kim *et al.*, 2017).

Aunado a lo anterior, la disposición espacial en el acoplamiento con las respectivas hormonas en cada caso (fig. 3), dicha conformación también determina al sitio de unión, presentando este una morfogeometría espacial concreta al confórmero específico de cada ligando. Ello actuando como un factor discriminante y por ende, de especificidad.

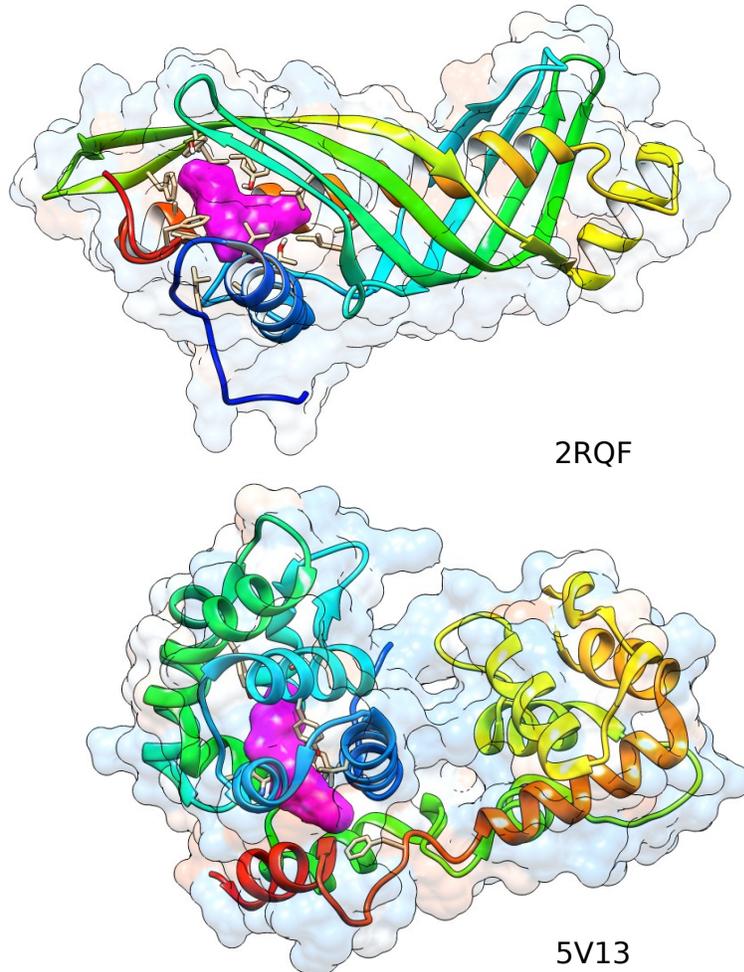


Fig. 2. Vista de ambas proteínas del tipo JHBP descritas en los párrafos anteriores. En la BmJHBP (2RQF) podemos apreciar su arquitectura tipo  $\alpha$ ,  $\beta$  super roll, en la cual la disposición de las láminas  $\beta$  le dan una conformación alargada y algo tubular. A diferencia de la mJHBP (5V13), cuya cercanía intrínseca entre sus 16 hélices  $\alpha$  le brindan una conformación más compacta.

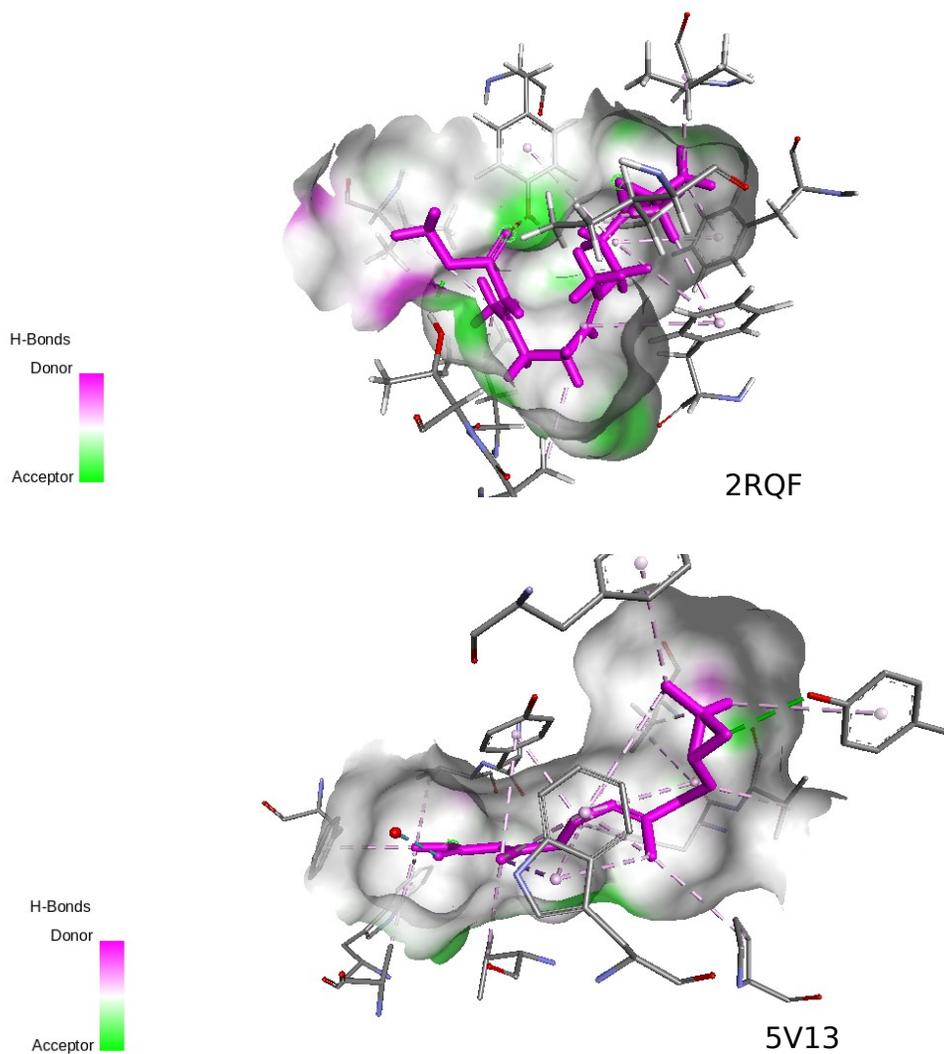


Fig. 3. Detalle de los bolsillos internos con los respectivos sitios de unión. Los ligandos JH II (2RQF) y JH III-10R (5V13) se muestran en morado. La morfología dada la disposición de cada residuo interactuante con el bolsillo, brinda una serie de depresiones del revestimiento interno que restringe la orientación de la longitud de cada sitio de unión.

Ciertamente en la fig. 4 es apreciable como la posición y predominancia de las láminas  $\beta$  en la parte media de la secuencia, favorece el enrollamiento sobre las hélices  $\alpha$ . La longitud de cada motivo está determinado por el número de residuos concatenados en esa región específica, se indican como números en los extremos. En cilindros color rojo se muestran las hélices  $\alpha$ , y en flechas rosas láminas  $\beta$ . El plegamiento de estas estructuras supersecundarias es responsable de la disposición conformacional de la proteína transportadora.

Por lo anterior mostrado en los mapas topológicos (Figs. 4 y 5), se puede inferir que dadas las marcadas diferencias estructurales presentes en ambas proteínas transportadoras, y al no haber relación evolutiva entre ellas, la mJHBP podría ser usada como diana de nuevos compuestos dirigidos exclusivamente a esterilizar con alta selectividad hembras de culícidos y con ello frenar y reducir su expansión global. Un compuesto liberado al ambiente, entre más afinidad y selectividad tenga para su diana, es decir, entre más discriminante sea, presentará menor probabilidad de afectación colateral para con otros organismos no diana (Goulart *et al.*, 2015).

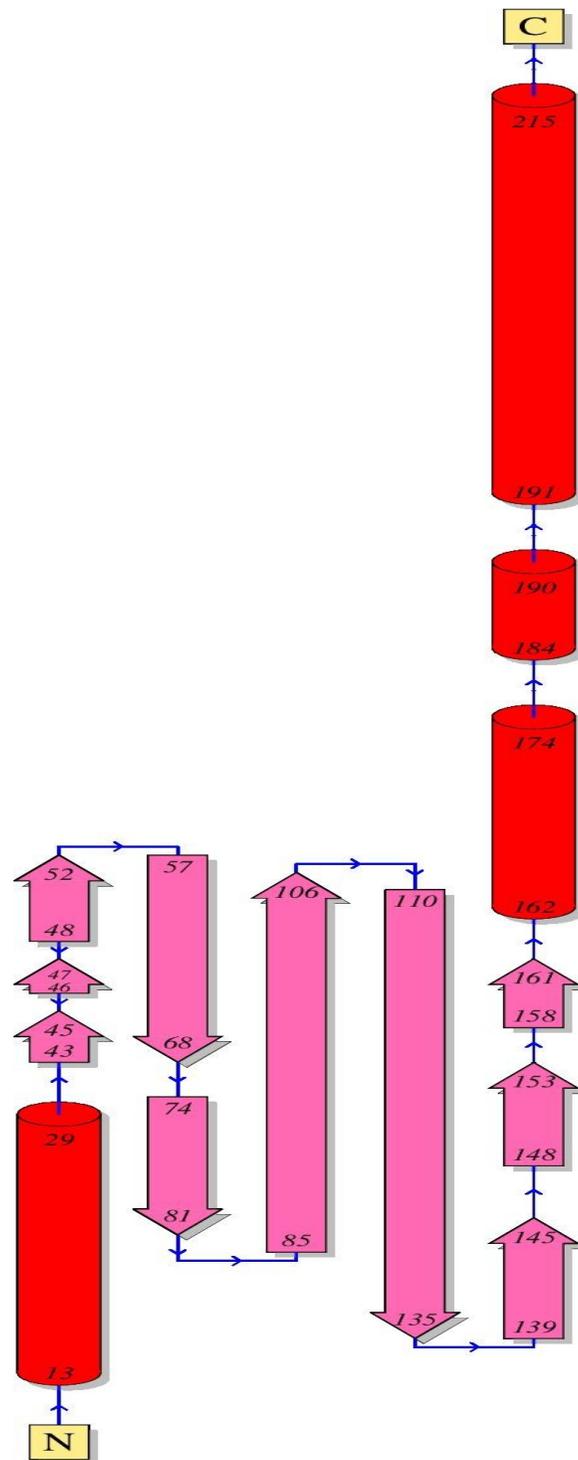


Fig. 4. Mapa topológico de la BmjHBP, donde se muestra longitud, disposición y los distintos motivos estructurales presentes en la proteína 2RQF.

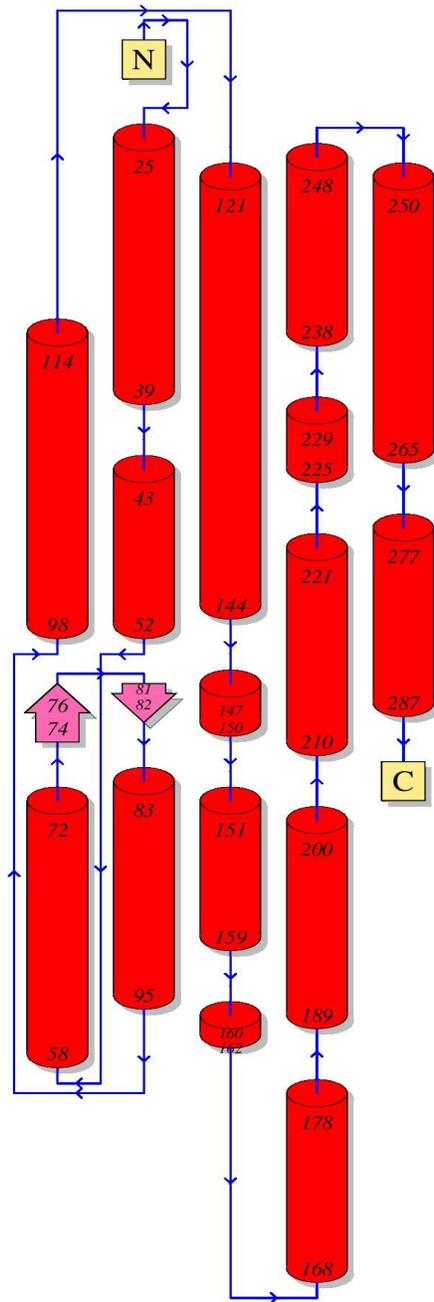


Fig. 5. Diferente disposición de cada uno de los motivos en la mJHBP (5V13). Las hélices  $\alpha$  son bastante numerosas, espaciadas y en su mayoría, se presentan como segmentos medianos y cortos.

Ello toma gran importancia, ejemplificando con el alto número de insecticidas liberados en cultivos agrícolas, que frecuentemente, suelen también matar insectos polinizadores de gran importancia para el mismo cultivo (Sponsler *et al.*, 2019). Al igual que la posible toxicidad que se podría presentar por exposición humana durante y posterior a su aplicación o por posible bioacumulación. Por lo cual, una correcta metodología aplicada al diseño racional de nuevas moléculas con un buen enfoque podría generar nuevos candidatos poseedores de nuevas características capaces de suplir a los compuestos insecticidas usados para la mitigación de esta entomofauna vectorial (Main *et al.*, 2020).

El producto del diseño racional de un inhibidor de mJHBP de alta especificidad con poca y/o nula toxicidad colateral, podría ser usado como complemento combinado con otras estrategias de control y reducción poblacional de culícidos vectores, sobre todo aquellos de enfermedades virales. Aunado a que sería una nueva alternativa para solventar la frecuente resistencia por parte de culícidos a los distintos pesticidas presentes actualmente. Por ello, una comprensión profunda de las interacciones moleculares entre el ligando natural y su respectiva diana, son fundamentales al mostrar las tendencias en el tipo de preferencias por determinadas interacciones, conferidas por los residuos en el o los sitios de unión posibles y/o demostrados.

### **Interacciones Proteína-ligando**

En cuanto a las interacciones entre moléculas dentro de contextos biológicos, en entornos de alta dinamicidad, la formación de complejos e interacciones moleculares son dictaminadas por la intensidad de la energía libre intrínseca a los actores interactuantes, al igual que determinadas por las propiedades geométricas y fisicoquímicas en los ordenamientos atómicos de las superficies a entrar en contacto entre sí para la formación de dicho complejo (Du *et al.*, 2016). La asociación de un complejo, en este caso de proteína-ligando, requiere de un encuentro espacio-temporal coordinado y simultáneo entre las superficies de los interactuantes, es decir; implica una co-localización de al menos 2 moléculas con afinidades mutuas en ambientes muy “poblados” de otras moléculas con diferentes potenciales y afinidades sobre sus superficies. Igualmente, de sus concentraciones diferenciales en dicho medio. Por lo que evolutivamente hablando, la enantioespecificidad suele ser buena herramienta de selectividad a escala fina (Desdouits *et al.*, 2015 y

Barbera *et al.*, 2019), entre las entidades moleculares que requieren de interacciones optimizadas mutuas para cumplir con determinados objetivos biológicos y específicos. Con ello, evitando interacciones negativas o indeseadas potenciales para con otras moléculas en el mismo medio.

Dado lo anterior, el conocer las propiedades que determinan la especificidad de unión de una proteína o enzima para con un ligando concreto, son de vital importancia para justificar el diseño teórico de ligandos sintéticos competitivos para el mismo sitio de unión. Por ello, a este nivel de interacciones, el poder vislumbrar las estructuras 3D de estas moléculas, mejora drásticamente la comprensión del acoplamiento entre ambas. Para solventar estas cuestiones, las técnicas de cristalización de alta resolución atómica como cristalización de rayos x, resonancia magnética nuclear (RMN), microscopía crioelectrónica (*cryo-Electron Microscopy*, *cryo-EM*), etc; aplicadas a proteínas de interés (Jones *et al.*, 2018 y Liebschner *et al.*, 2019), han brindado estructuras de alta resolución que permiten la apreciación espacial del orden de los plegamientos exhibidos por una proteína particular. Con ello, la elucidación de su conformación 3D más estable.

La visualización de estas estructuras en ordenadores con *softwares* adecuados facilita su comprensión topológica, identificación de posibles cavidades y sitios de unión, así como volumen, cargas, motivos estructurales presentes, entre otros caracteres de importancia. Estos análisis *in silico*, permiten una aproximación teórica de alta fidelidad, que facilitan la manipulación estructural y de las interacciones proteína-ligando de interés (Shi *et al.*, 2017). Estos procedimientos actúan como un filtrado selectivo de los posibles compuestos teóricos a usar como candidatos a fármacos, toxinas, pesticidas, etc; ahorrando significativamente tiempo y costes de análisis durante las primeras etapas de desarrollo del estudio (Opo *et al.*, 2021).

La constitución de un sitio de unión debido a los motivos estructurales y número de plegamientos conformantes, así como del tipo y distancias entre cada residuo concatenado, brindan las características y distribución de cargas superficiales con una disposición específica, que le conferirá afinidad a un ligando o conjunto de ligandos que posean a su vez; grupos funcionales insertos en un andamio atómico con cargas y distancias concretas (Duan *et al.*, 2016), cuya conformación estructural

les permita tener una alta y discriminante afinidad a el sitio de unión (Seo *et al.*, 2021). Ya que las depresiones y “topografía” específica de cada sitio de unión, brindan a dicha cavidad un arreglo o emplazamiento espacial concreto, para la aceptación de los ligandos con los cuales coevolucionó (Caro *et al.*, 2017).

Los mecanismos que permiten la unión entre ligandos y los respectivos sitios de unión son variados, y suelen atender a las peculiaridades presentes entre la unión de ambos factores moleculares, como carga, geometría, longitud y la flexibilidad del ligando o la profundidad de las depresiones presentes en el bolsillo de unión. Generalmente se agrupan en 3 modelos básicos, los cuales describen la dinamicidad en la motilidad tanto del ligando como del bolsillo de unión, que permiten un acoplamiento lo suficientemente estable como para retener al ligando en dicho sitio de unión (Plattner & Noé, 2015), y a su vez; generar los subestados proteicos, responsables de conferirle una función específica.

Estos modelos teóricos son:

-Llave-cerradura (*lock and key*): Considera al ligando y al sitio de unión de la proteína fijas o estáticas (no implica cambios conformacionales). El ligando embona perfectamente en un sitio de unión específico en una proteína concreta.

-Complemento inducido (*induced fit*): En este caso, se propone al ligando como estructuralmente estático, mientras que el sitio de unión proteico se acopla a este (el receptor sufre leves cambios conformacionales, para permitir la unión al ligando).

-Selección conformacional (*conformational selection*): El receptor exhibe subestados alternos seriados (cambios conformacionales subsecuentes), de los cuales, solo uno dispone espacialmente al sitio de unión en forma correcta, como para permitir la unión de un ligando específico. En este modelo, para que se logren uniones estables, el ligando debe poseer igualmente cambios conformacionales, lo cual le permitirá un acoplamiento más estable (Amaral *et al.*, 2017 y Du *et al.*, 2016).

Como todo modelo, no son absolutos, en múltiples casos y en un contexto biológico, dichas interacciones no presentan un acoplamiento donde embonen perfectamente. Se espera que, en mayor o menor medida, el ligando promueva en el receptor proteico o viceversa,

cambios estructurales, como una forma de maximizar la estabilidad y aumentar la afinidad; acortando distancias entre los grupos funcionales o átomos interactuantes. También es plausible que estos modelos no sean únicamente posibles y mutuamente excluyentes, es decir, podrían presentarse al unísono con cierto grado de variabilidad e intensidad.

### **Desarrollo de ligandos *in silico***

Con miras al desarrollo de un ligando de alta afinidad a un sitio de unión concreto, entendida la demanda de afinidad que exige este, se suelen desarrollar estructuras moleculares denominadas farmacóforos (ensamble a nivel atómico de un andamio cuyas rasgos estéricos y electrónicos necesarios en una interacción funcional para con el receptor proteico, sean lo suficientemente estables como para mantener cierta afinidad constante entre el receptor y los ligandos derivados de dicho andamio), los cuales son concebidos a manera de una abstracción en 3D de los requerimientos mínimos a considerar estructuralmente, para que ese conjunto de moléculas derivadas, posean una configuración y conformación que satisfaga el filtro discriminatorio del sitio de unión. Siendo este el primer paso a la formación de un conjunto de moléculas aceptables como ligandos de un receptor específico (Akram *et al.*, 2017 y Seidel *et al.*, 2020).

Es por esto, que las técnicas de diseño de fármacos asistido por computadora (Computational Aided Drug Design, CADD), son de vital importancia para generar acercamientos a escala precisa de las interacciones presentes entre los residuos que conforman el sitio de unión y los ligandos con afinidad al mismo. Dichas interacciones pueden ser resumidas y caracterizadas en modelos farmacofóricos, de los cuales pueden derivar candidatos viables con rasgos de alta afinidad y estabilidad (Prieto y Medina, 2019). Las características químicas eventualmente buscadas en el modelado de farmacóforos, son aquellas que evidentemente aumentan la probabilidad de creación de interacciones proteína-ligando, como: Sitios ionizables, hidrofóbicos alifáticos y anillos aromáticos, puentes de H donantes y aceptores. Se suelen representar a manera de esferas en 3D punteadas, diferenciadas en color y volumen, de tal manera que al menos 2 o más estructuras diferentes derivadas, comparten similares características físico-químicas apreciables en los visualizadores moleculares (Schaller *et al.*, 2020).

El uso de farmacóforos para la obtención de ligandos *in silico*, teóricamente puede llegar a favorecer en el desarrollo de nuevos compuestos activos, aunados a estructuras de novo con la capacidad de aumentar la afinidad a determinados sitios de unión, en comparación de los ligandos típicos con los cuales coevolucionó. La creación y aplicación de *softwares* de gran resolución y computadoras con la capacidad de manejar simultáneamente cantidades astronómicas de datos, ha favorecido la posibilidad de realizar experimentalmente, múltiples acoplamiento moleculares (*molecular docking*) y seleccionar las mejores estructuras como candidatos de alta afinidad al sitio de unión estudiado.

El desarrollo y validación de una nueva entidad química puede tomar de 10 a 15 años e incluir costes superiores a los 50 millones de dólares (Pan *et al.*, 2013), por lo que realizar estos análisis *in silico* presenta un gran aporte en la reducción de ambos factores en términos de costos (Opo *et al.*, 2021). Igualmente facilita una comprensión al momento del acoplamiento y en la escala correcta sobre las deficiencias y ventajas que podrían presentar cada uno de los candidatos generados. Siendo este tipo de análisis, uno de los magnos éxitos de la química computacional. Por ellos, el presente trabajo se basó en la evaluación y estudios *in silico* de ligandos teóricos modelados como inhibidores selectivos de mJHBP, utilizando a su vez técnicas de diseño racional de fármacos, para la generación de nuevas estructuras químicas; con la capacidad de inhibir específicamente la reproducción de culícidos vectores, mediante un enfoque de esterilización ambiental.

### **Acoplamiento molecular**

La activación e inhibición de la capacidad y funcionalidad de una proteína se basa en las interacciones que tenga con el o los ligandos cuyo acoplamiento sea correcto en los respectivos sitios de unión. Estos acoplamiento moleculares han logrado ser emulados a manera de aproximaciones bioinformáticas, que permiten predecir la postura o conformación más estables de un ligando para generar y/o aumentar el número de interacciones entre los grupos funcionales de dicho ligando y los residuos del sitio de unión del blanco proteico. Ello se basa en funciones y algoritmos computacionales para predecir las mejores representaciones 3D de los acoplamiento a analizar, así como la afinidad de cargas y las energías de acoplamiento entre cada postura. A

mayor estabilidad en las interacciones, mejor embonamiento según la geometría del del ligando y el sitio de unión, mayor especificidad, afinidad de cargas y estabilidad; presentará consecuentemente mayor actividad biológica (Pinzi & Rastelli, 2019).

Las funciones de puntuación empleadas por *softwares* para acoplamiento muestran en orden descendente las energías de unión de cada postura, actuando así, en primer lugar como filtro en cuanto a las posturas de mayor estabilidad/afinidad posibles con el ligando; y secundariamente, como un filtro de cada estructura evaluada de forma independiente. Sin embargo, hay que considerar estos procedimientos como relativos, pues evidentemente existen limitaciones. Por lo general, la proteína diana se considera como un receptor rígido, no atiende a su dinámica intrínseca de subestados, el sitio de unión es visto como una cavidad cuya superficie es sésil. Aunado a lo anterior, se puede presentar desfase en las puntuaciones brindadas. Esto debido a las limitaciones de los algoritmos empleados que pueden llegar a malinterpretar datos generados durante el acoplamiento (Huang *et al.*, 2021 y Salmaso & Moro, 2018) .

Dada la variabilidad de las estructuras proteicas y los ligandos diseñados, atendiendo igualmente que cada *software* posee enfoques distintos al momento de considerar a las estructuras durante el análisis, se debe tener en cuenta que cada *software* usa diferentes algoritmos durante el procedimiento, lo que podría complicar la replicación de los resultados. Entendido esto, implementar una metodología rigurosamente homologada, puede ser complicado e incluso contraproducente, al momento de correr los análisis y valorar los resultados. Es por ello, que se debe atender a las particularidades en cada caso, desde un enfoque racional y profesional en la materia.

El cribado virtual de los datos generados en estos análisis fundamenta la creación de enormes bases de datos y bibliotecas de posibles nuevos compuestos, aumentando el multiverso químico de bioisómeros (compuestos con diferentes estructuras, pero misma actividad biológica) de fuerte potencial farmacológico, desarrollo de pesticidas, etc. Con ello, brindando nuevas herramientas a problemas, desde cotidianos hasta excepcionales, si es que pasan todos los filtros (Gogoi *et al.*, 2017 y Maia *et al.*, 2020).

Se han realizado búsquedas exhaustivas de nuevas moléculas de actividad biocida vía relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR), generando modelos estadísticos cuantitativo-predictivos sobre la posible actividad biológica de las estructuras a usar como representaciones homólogas funcionales de las estructuras y propiedades moleculares que cada compuesto figura en el conjunto, para el descubrimiento y desarrollo de fármacos afines a una actividad biológica o reactividad química concreta (Esfahani *et al.*, 2021). Además, el uso de técnicas como acoplamiento molecular y simulaciones de dinámica molecular han facilitado la elucidación de estructuras de gran potencial insecticida contra especies de culícidos vectores como *Culex pipiens* (Rao *et al.*, 2021). Así como el modelado por homología y detección virtual de compuestos como las sulfonamidas, evaluadas mediante técnicas CADD, para la obtención de estructuras líder de capacidad insecticida (Gang *et al.*, 2020).

Es evidente que el descubrimiento y desarrollo de nuevos compuestos vía técnicas *in silico*, dirigidos contra dianas moleculares expresadas en culícidos y otros insectos vectores de enfermedades, así como plagas de cosechas, etc. (Loza *et al.*, 2018); ha favorecido el incremento de opciones provenientes del multiverso químico, a usar como medida a estos problemas milenarios. Aunado a lo anterior, el descubrimiento y cristalización de la mJHBP, así como la elucidación de su función como transportadora de JH III-10R, provee un entendimiento más detallado sobre la importancia a nivel molecular y fisiológico de esta proteína. Igualmente las características estructurales del sitio de unión e interacciones entre la mJHBP y su ligando hormonal, son una opción viable a usar como objetivo para el desarrollo de nuevos compuestos con capacidad insecticida (Kim *et al.*, 2017).

## **JUSTIFICACIÓN**

Dado que existe una marcada tendencia por parte de culícidos a desarrollar resistencia a compuestos comúnmente usados como insecticidas, puesto que el uso frecuente de un solo tipo de compuesto durante el tiempo suficiente genera una fuerte presión selectiva sobre sus poblaciones; heredando a las siguientes generaciones dicha

capacidad de supervivencia, obteniéndose poblaciones enteras cada vez más resistentes. Por ello, aunque se apliquen las 2 estrategias típicas que son: Reducción de sitios de criadero y el uso de pesticidas químicos, se tratan solo de soluciones virtuales, basadas en la probabilidad de reducción de las tasas de natalidad y supervivencia del mosquito vector, que no parecen tener mucho efecto en proyecciones futuras (Gonzales, 2013 y López & Neira, 2016).

En cuanto a la liberación de culícidos infectados con *Wolbachia* sp, la reproducción entre machos y hembras infectados con esta bacteria, no suelen presentar incompatibilidad citoplasmática, por lo que la descendencia se desarrolla de forma viable, originando individuos que les reemplazarán en la población. Aunado a lo anterior, se requieren de liberaciones periódicas de mosquitos infectados para mantener reducida o suprimida las poblaciones salvajes de vectores objetivo, de lo contrario, rápidamente se recuperarán. Esta estrategia está pensada para prevenir brotes, no para frenarlos. Además, se debe considerar la naturaleza de la dinámica poblacional de las especies vectoras objetivo, pues pueden llegar a emigrar y reproducirse con individuos provenientes de poblaciones aledañas, o las poblaciones locales pueden verse incrementadas en número por la llegada de más individuos; desplazando a los infectados con *Wolbachia* sp. Requiriendo por tanto, de la liberación de más individuos infectados, para superar y favorecer la probabilidad de reproducción con estos (Alkuriji *et al.*, 2020; Ndi *et al.*, 2021 y Ogunlade *et al.*, 2020).

La liberación ambiental de culícidos genéticamente modificados, también puede conllevar problemas imprevistos. Se ha demostrado que los individuos transgénicos portadores de genes letales, pueden llegar a hibridar con individuos de las poblaciones salvajes a suprimir, generando descendientes con parte del genoma modificado, siendo estos capaces de reproducirse en condiciones agrestes. Se desconocen las implicaciones ecológicas y en la dinámica de poblaciones de la existencia de híbridos viables en la naturaleza, y cómo esto puede afectar en la resistencia a las técnicas existentes para su control poblacional (Evans *et al.*, 2019 y World Health Organization, 2021).

Dado lo anterior, se requiere del desarrollo de pesticidas de alta especificidad y nula toxicidad colateral, que permita su aplicación en estrategias cruzadas con otras técnicas, a fin de maximizar la eficacia en la reducción y consecuente supresión de poblaciones de culícidos vectores.

## **HIPÓTESIS**

El desarrollo *in silico* de estructuras de unión altamente específicas al receptor mJHBP de mayor afinidad que el ligando natural JH III-10R, inhibirían su acoplamiento con la mJHBP, desplazando a esta hormona hacia el medio hemolinfático, donde es degradada por enzimas de acción nucleofílica. Con ello, evitando que esta hormona llegue a su destino y se una a sus respectivas proteínas de reconcieminto. Estos compuestos diseñados racionalmente actuarían como disruptores altamente selectivos de este acoplamiento, afectando la maduración y crecimiento, así como el desarrollo gonotrófico en las hembras de culícidos vectores de enfermedades.

## **OBJETIVO GENERAL**

Desarrollo y modelado de estructuras teóricas, evaluadas *in silico*, de alta afinidad al objetivo proteico mJHBP, mediante el uso de técnicas de diseño racional y evaluación de compuestos. Con la finalidad de generar nuevas estructuras químicas de alta precisión inhibitoria, así como predicciones sobre el posible comportamiento tóxico de las estructuras diseñadas para con otros organismos no objetivo.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a Análisis estructural del receptor mJHBP y del ligando JH III 10-R.
- b Diseño racional *in silico* del farmacóforo y creación de estructura líder.
- c Diseño de nuevos compuestos químicos derivados, análisis estructural y distribución de cargas.
- d Realizar acoplamientos moleculares seriados con el receptor diana.
- e Validar la estabilidad del acoplamiento molecular con las estructuras de mayor puntuación generada.
- f Predecir el grado de toxicidad de los ligandos seleccionados contra bases de datos y realizar acoplamientos de control con otras estructuras proteicas similares, expresadas en organismos no diana.
- g Seleccionar la estructura más óptima, según los criterios considerados.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Materiales

### *Hardware*

-Descripción Primera computadora: Macbook, Intel Core™ i5- 2 núcleos , GPU Intel Iris Graphics 6100 1536 MB and Random Access Memory (RAM), 8 GB 1867 MHz DDR3 con sistema operativo MacOS Big Sur.

-Descripción Segunda computadora: Hp, Intel Core i3 de 10<sup>o</sup> generación, 8 GB de SDRAM DDR4-2666 (1 x 8 GB), disco duro SATA de 1 TB y 5400 RPM, con Windows 10.

### *Software*

- a USCF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).
- b Autodock Vina (Trott y Olson, 2010).
- c Discovery Studio Visualizer (DASSAULT SYSTEMES, 2021).
- d MarvinSketch (CHEMAXON ,2021).
- e Lisica (Lešnik *et al.*, 2015).

### *Webtools*

- a PDBsum (Laskowski *et al.*, 2018).
- b CASTp 3.0 (Tian *et al.*, 2018).
- c ZINCPharmer (Koes y Camacho, 2012).
- d Swiss ADME (Daina *et al.*, 2017).
- e ProTox-II (Banerjee *et al.*, 2018).

## Método

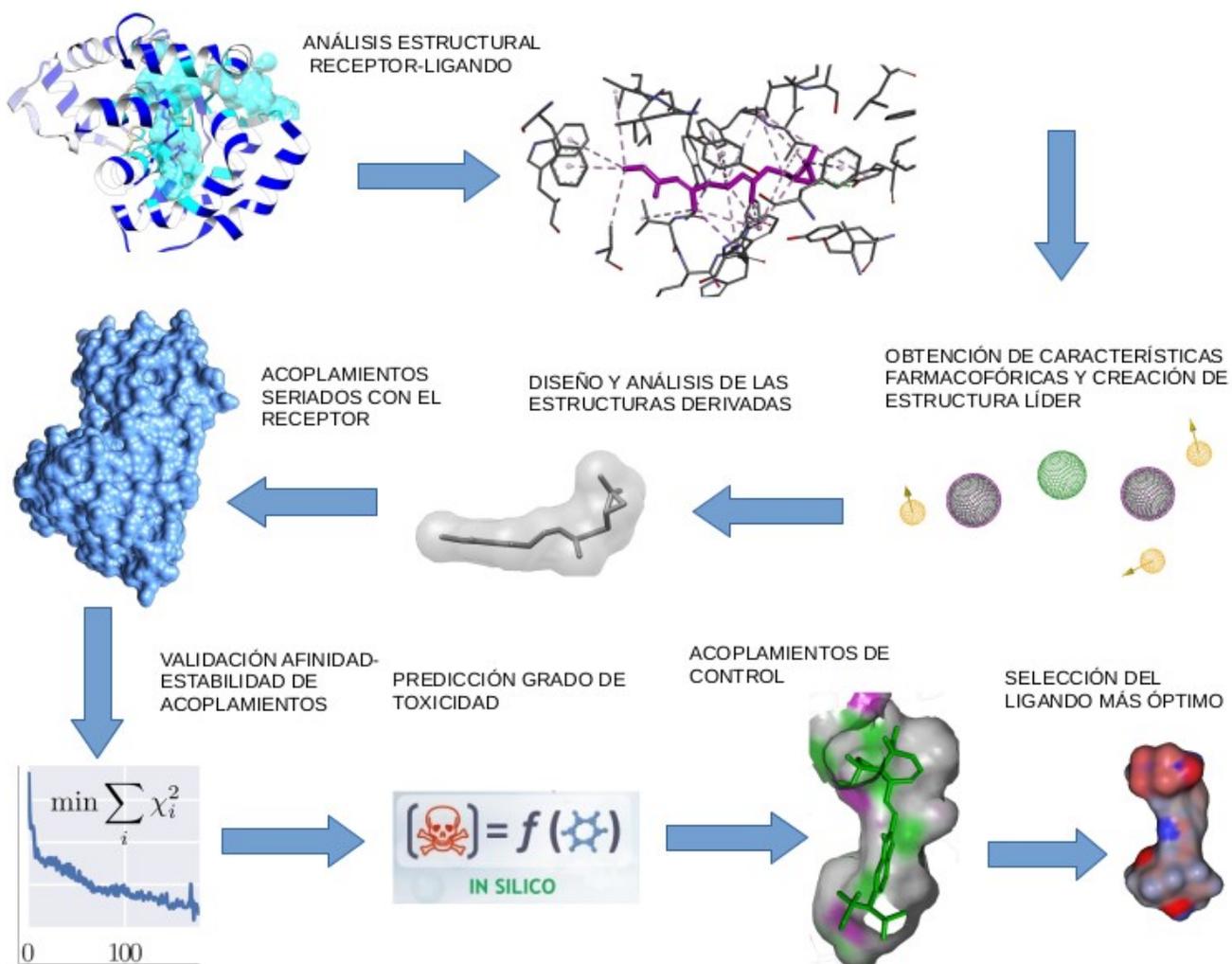


Fig. 6. Resumen gráfico de la metodología seguida.

## **Análisis estructural del receptor proteico y las interacciones con el ligando JH III-10R**

Se procedió a la búsqueda y descarga de la proteína mJHBP (PDB: 5V13) de la base de datos del PDB y en seguida, se continuó con la realización de un mapa topológico en la web PDBsum (Laskowski *et al.*, 2018), así como su análisis estructural en acoplamiento con su ligando co-cristalizado JH III-10R, con la ayuda del visualizador USCF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004). Posteriormente se procedió al análisis visual de los motivos estructurales conformantes del bolsillo de unión interno, así como de los residuos interactuantes con dicha hormona, en este último caso generando un mapa de interacciones, con el uso del *software* Discovery Studio Visualizer versión 4.5, 2021. Subsecuentemente, se estudió la topología de los bolsillos internos de interés de las 3 cadenas, obteniéndose volumen, área, dimensión de canales interiores, bolsillos adyacentes, orificios de acceso a cavidades, entre otros rasgos geométricos y topológicos. Esto con el uso del servidor web CASTp 3.0 (Tian *et al.*, 2018), y los resultados analizados con el *software* USCF Chimera.

### **Desarrollo del farmacóforo**

Se continuó con un análisis estructural *in silico* del enantiómero -10R de la JH III, identificándose los grupos funcionales interactuantes con los residuos más próximos, así como el tipo de fuerzas e interacciones, distribución de cargas y la geometría de dicho ligando, con los *softwares* anteriormente mencionados y el uso de MarvinSketch versión 21.14. Posteriormente la estructura se sometió a la interfaz online de ZINCPharmer (Koes & Camacho, 2012), esto para la identificación de los núcleos de mayor interacción y la identificación de rasgos haptofóricos optimizables para el desarrollo de un farmacóforo modelo. Los rasgos de mayor afinidad fueron usados como criterios guía para el desarrollo de nuevas propuestas estructurales, las cuales fueron dibujadas en Marvin. Seguidamente, la estructura líder derivada del farmacóforo diseñado, se comparó contra los rasgos presentes del ligando JH III-10R, mediante la aplicación del coeficiente de Jaccard-Tanimoto, para validar similitudes con el uso del *software* ILSICA (Lešnik *et al.*, 2015).

## **Diseño de las estructuras 3D de los ligandos**

Para esto, se consideró la distribución y distancias de los núcleos activos presentes en el farmacóforo diseñado y seleccionado. A partir de ello, se derivaron estructuras químicas teóricas como posibles inhibidores del receptor mJHBP. Cada posible ligando fue creado, protonado y optimizado con el *software* MarvinSketch, y de aquellos más viables, se analizaron los conformeros que exhibieron mayor estabilidad y menor energía expresada en kcal/mol de cada uno, considerándose como estructuras distintas y por tanto, candidatos distintos. Posteriormente, se analizó la distribución de las cargas en la superficie molecular y el momento dipolar de cada ligando.

## **Realización de acoplamiento moleculares seriados**

Anterior a los análisis *in silico*, se realizó un acoplamiento con su propio ligando JH III-10R, que fue previamente protonado, pero dejando la conformación estructural original intacta, la cual corresponde al conformero -10R para obtener un índice a considerar como umbral de afinidad biológica entre el ligando y el receptor de estudio a superar. Para el acoplamiento molecular, se parametrizaron las estructuras diseñadas y el receptor proteico con las herramientas de USCF Chimera. Se removieron los ligandos co-cristalizados y se agregaron campos de fuerza AMBER a los residuos estandar. Se protonaron tanto los residuos interactuantes como cada una de las estructuras a someter al análisis como ligandos.

Tanto receptor proteico como los ligandos teóricos a analizar, fueron guardados con las conformaciones que expresaron el mínimo de energía en formato “.pdbqt”. Posteriormente, se realizó un acoplamiento molecular semi flexible con los ligandos generados, utilizando el plugin Chimera-AutoDock Vina (Trott & Olson, 2010), con las 3 cadenas de la proteína mJHBP (PDB: 5V13) usada como objetivo. Enseguida, se determinaron las interacciones entre los residuos implicados en la formación del bolsillo de unión y los átomos de los grupos funcionales de cada una de las estructuras generadas a partir del farmacóforo propuesto. Los mapas de interacciones fueron generados con el *software* Discovery Studio Visualizer, para cada uno de los acoplamientos realizados. Consecuentemente, se registraron las afinidades arrojadas y se seleccionaron los ligandos que mostraron mayor afinidad, y en

función de ello, se rediseñaron estructuras derivadas, con el objetivo de generar otras de aún mayor afinidad.

### **Validación de la afinidad, fidelidad y estabilidad estructural de los acoplamientos**

Para ello, con el uso de Marvin, se determinó el área de la superficie molecular, volumen, y la distribución de cargas de los ligandos. Después, se aplicó la prueba de Jaccard-Tanimoto, entre la estructura base derivada del farmacóforo y las estructuras derivadas de mayor afinidad, con el uso del *software* lisica. Del conjunto de acoplamientos moleculares generados, se seleccionaron aquellos que mostraron mayor afinidad al sitio de unión propuesto. De cada uno se analizaron los mapas de interacciones realizados tras los acoplamientos, así como con cada interacción a nivel atómico, eliminando las menos estables, consecuentemente seleccionando las 3 estructuras con mejores resultados.

### **Estimación del grado de toxicidad de los candidatos**

Luego, se utilizó el servidor web Swiss ADME, con el fin de someter a análisis al total de las estructuras generadas. Realizándose una predicción *in silico* mediante modelos bioinformáticos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME,) de cada propuesta. El filtrado usó reglas como Veber, Lipinski y Ghose, mostrando también índices del grado de hidrosolubilidad y lipofilicidad. Posteriormente se aplicó un segundo filtro, mediante el servidor web ProTox-II, con el cual se identificaron criterios toxicológicos, que valoraron la posible citotoxicidad, inmunotoxicidad, hepatotoxicidad, etc; como dianas índice de su posible actividad (Banerjee *et al.*, 2018 y Daina *et al.*, 2017).

### **Acoplamientos moleculares de control**

Seguidamente, con cada una de las 3 estructuras filtradas, se realizaron acoplamientos moleculares con las estructuras proteicas co-cristalizadas con sus propios ligandos, provenientes de organismos no diana. Esto con el objetivo de valorar la afinidad de los ligandos filtrados a sitios de unión presentes en proteínas transportadoras de ligandos hidrófobos, siguiendo la misma metodología anteriormente descrita. Todas las proteínas objetivo fueron obtenidas de la base de datos del PDB, correspondientes a los siguientes organismos: 2OBP, 4EWS, ambas

transportadoras de lípidos y el bactericida 1BP1 expresadas en humanos. Así como de las proteínas de unión a hormonas 2RQF y 2RCK de los lepidópteros *Bombyx mori* y *Galleria mellonella*. Se usaron los mismos sitios de unión reconocidos por los ligandos co-cristalizados en cada una de las estructuras proteicas, como objetivo de cada acoplamiento molecular.

### **Selección de la estructura más óptima**

De las 3 estructuras diseñadas y filtradas, se seleccionó solamente una de ellas como la más destacable, dada su afinidad al receptor proteico y su teóricamente baja toxicidad estimada, como posible candidato a considerar para análisis más profundos. Y si es el caso, para su posible síntesis, análisis *in vitro* y en sistemas biológicos. Aunado lo anterior, coincidente a su probabilidad de síntesis.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Estructura y acoplamiento de la JH III-10R con el receptor mJHBOP

Los plegamientos de mayor densidad suceden entre los primeros 6 motivos del extremo N terminal de la mJHBP (5v13), de los cuales gran parte de los residuos concatenados en los motivos H3, *loop* 3 y H6 (fig. 7), se encuentran mayormente implicados en la formación del orificio de entrada/salida del túnel que conecta a la cavidad interna. Las hélices  $\alpha$  son bastante numerosas, espaciadas y en su mayoría, se presentan como segmentos cortos que no superan los 6 giros (exceptuando la H6 de  $8 \frac{1}{2}$ ). Los segmentos de los motivos interactuantes en el sitio de unión para con la JH III-10R son: Última media vuelta de la H1, H2, H3, H4, H5, y primer residuo de la H6; hasta los medios segmentos de las H10 Y H11 respectivamente. Aunado a parte del giro  $\beta$  10 y 2 giros de la H14. Estos presentes en las 3 cadenas (fig. 8), poseedoras del sitio de unión de interés, mostrado en la fig. 9.

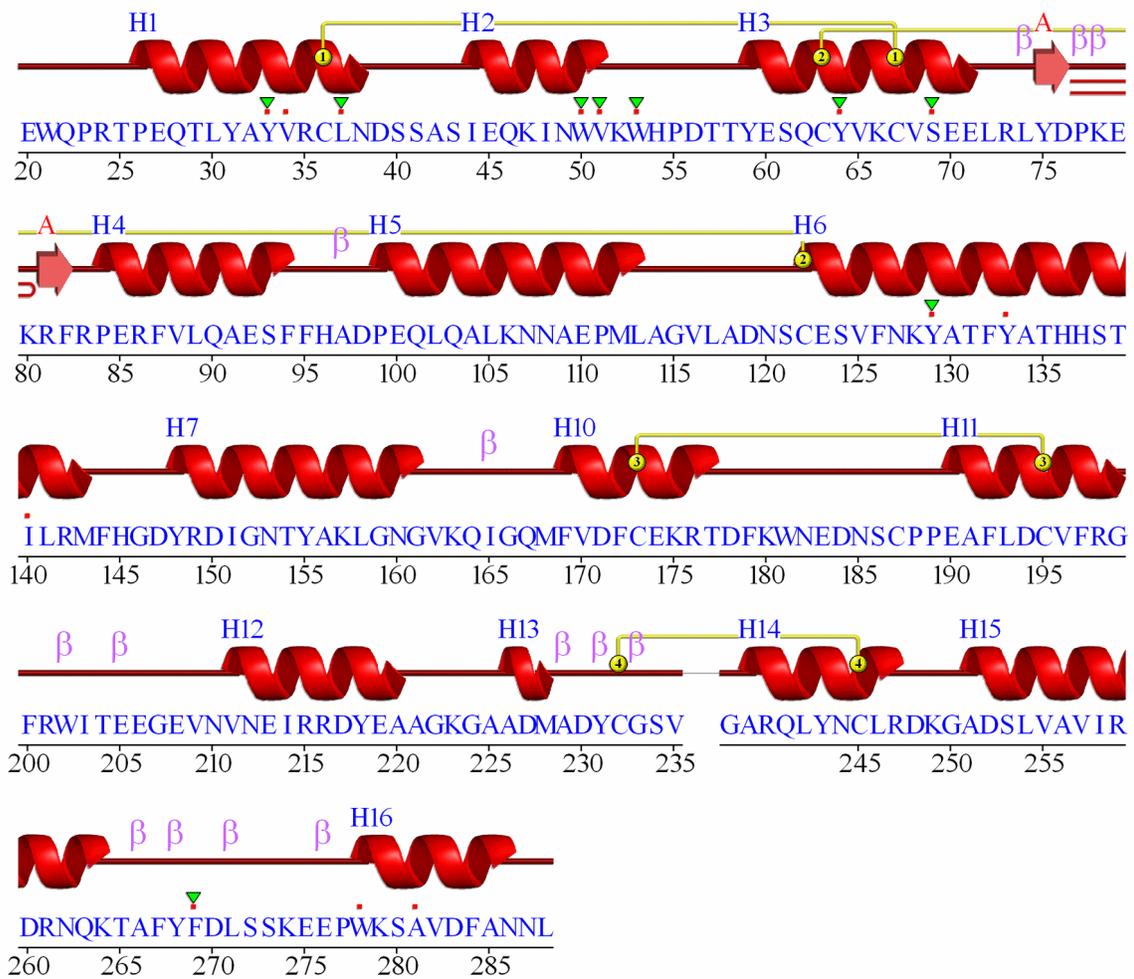


Fig. 7. Diagrama de cableado de la proteína mJHBP (PDB: 5V13). En amarillo se muestran los puentes disulfuro, los puntos rojos sobre el código de una letra, señalan a los residuos que interactúan en el bolsillo de unión interno, los cuales a su vez están numerados según su posición. Los motivos estructurales se encuentran en color rojo, algunos señalados por letras griegas.

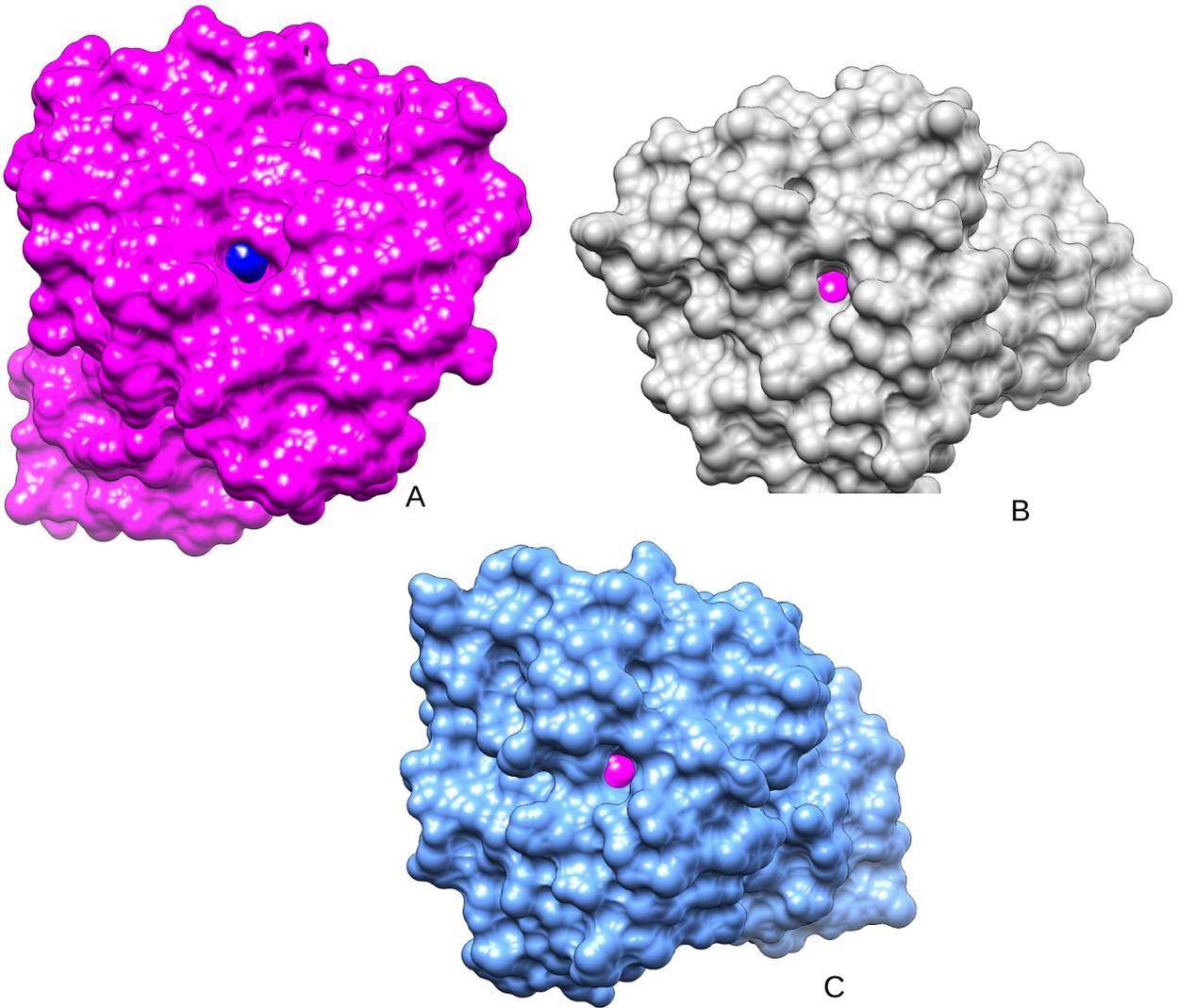


Fig. 8. Vista superficial de las cadenas A, B y C separadas mostrando el orificio de entrada/salida del túnel que conduce a la cavidad interna del sitio de unión (contrastada en distinto color, el cual muestra el revestimiento interno del bolsillo de unión).

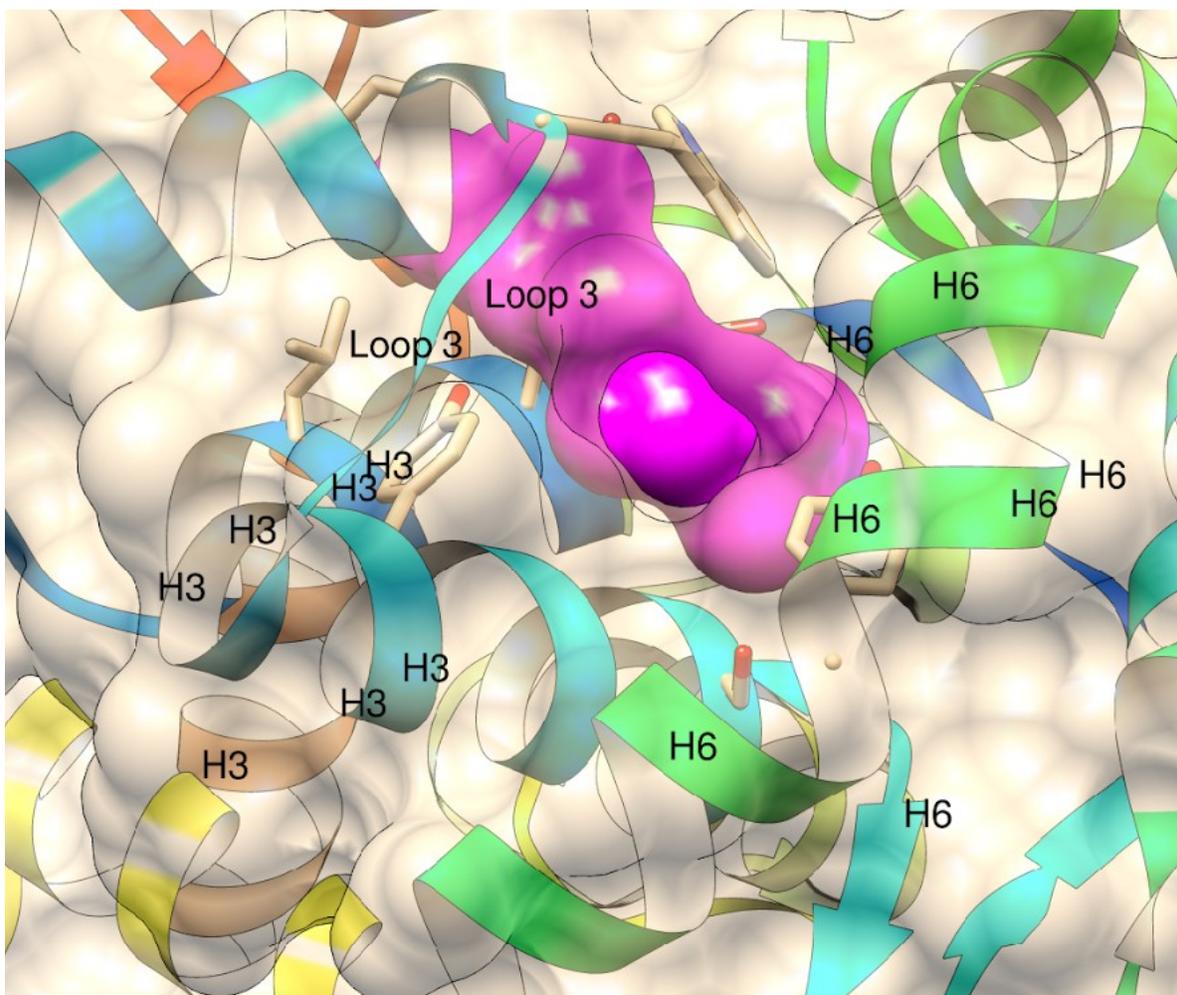


Fig. 9. Se muestra la cadena A a manera de referencia, donde se exponen los motivos estructurales, cuyos residuos se encuentran implicados en la formación del canal de entrada/salida del ligando JH III-10R (el cual se muestra en morado).

Es importante destacar que, las 3 cadenas que conforman la mJHBP poseen un bolsillo de unión interno morfogeométricamente dísimil entre sí, tomando como referencia el volumen calculado, siendo la cadena A la de mayor volumen (fig. 10). Concretamente, En el caso de la cadena A, posee un área de 830.994 Å<sup>2</sup> y un volumen de 733.045 Å<sup>3</sup>. Para la cadena B, el área corresponde a 896.876 Å<sup>2</sup> y el volumen a 716.479 Å<sup>3</sup>. Mientras que para la cadena C, el área está dimensionada en 701.637 Å<sup>2</sup>, y el volumen en 561.203 Å<sup>3</sup>.

Dado lo anterior, obtenemos una diferencia de 171.842 Å<sup>3</sup> con el bolsillo interno de la cadena C, sabiendo que esta es la de menor volumen, y para con la cadena B es de solo 16. 566 Å<sup>3</sup>. Esto nos muestra una aparente falta de razón, dado que las tres cadenas se unen con el mismo ligando, por lo que deberían tener un volumen más aproximado, considerando que el volumen global de la JH III-10R es constante. Pero es bastante plausible que, el receptor independiente de los subestados que experimente previo al reconocimiento y acoplamiento con esta hormona, puedan tener ciertos cambios conformacionales regionalizados a nivel de superestructura, que acerquen o alejen los residuos interactuantes a una distancia tal que permita un acoplamiento espontáneo y lo más estable posible.

Es decir, se trataría de acoplamientos de alta dinamicidad, donde ambos interactuantes moleculares sufrirían cambios estructurales diferenciales (solo a partir de ciertos enlaces, el ligando cambiaría su conformación, mientras que parte de los motivos del bolsillo de unión, podría experimentar ciertos cambios espaciales, a fin de lograr una concordancia geométrico-espacial que maximice la fuerza de unión).

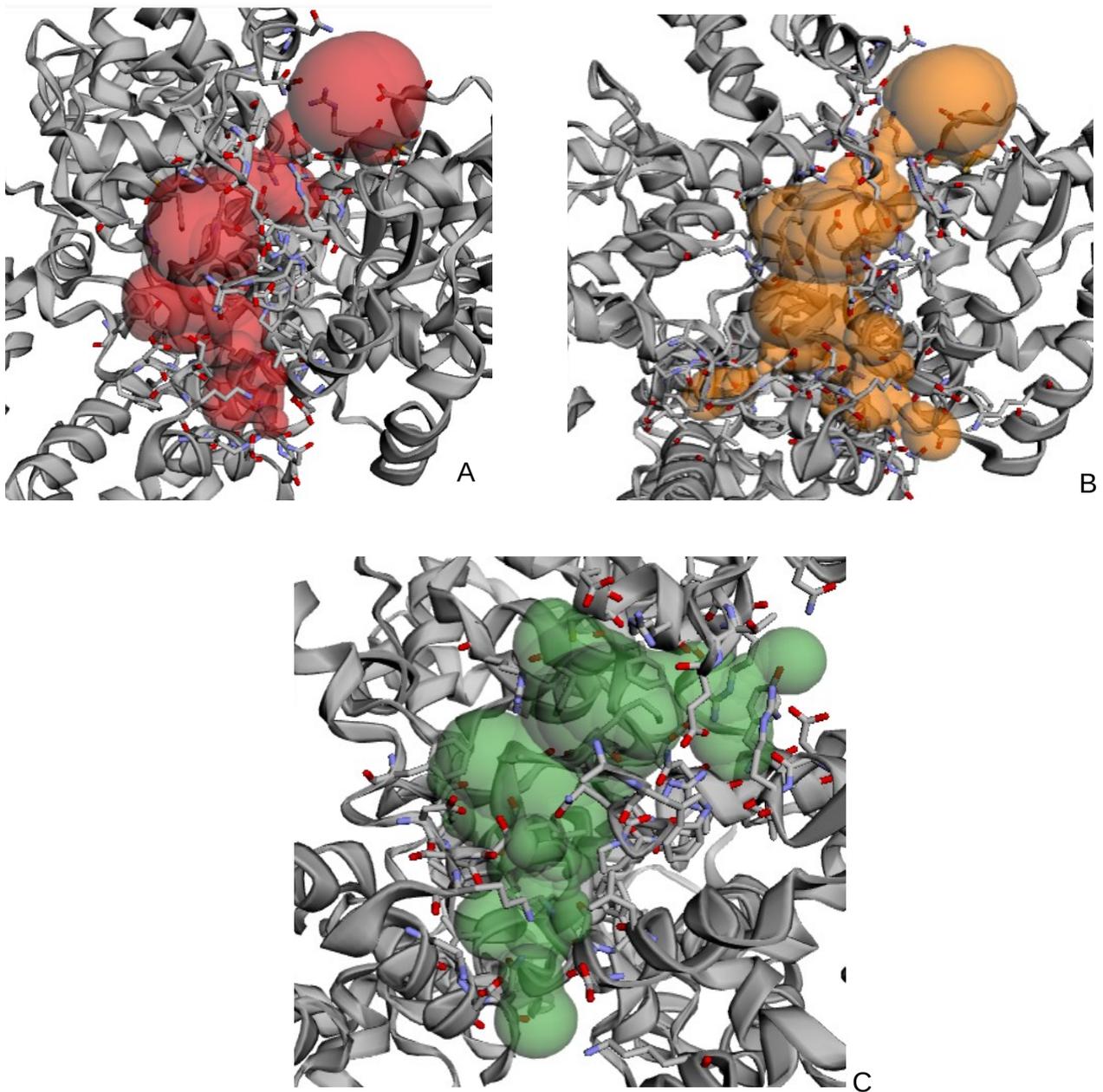


Fig. 10. Disposición de las cavidades del sitio de unión interno de las cadenas A, B y C, las cuales son presentadas como esferas huecas superpuestas señaladas en distinto color, rodeadas de las cadenas laterales que conforman sus respectivas paredes.

Los residuos clave que interactúan directamente con la hormona JH III-10R, VAL-34 y LEU-37, constituyentes de los últimos 2 1/2 giros de hélice H1, TRP-50, VAL-51, de la última vuelta de la H2 y TRP-53, del *loop* 3, interactúan con el primer segmento del ligando JH III-10R (tomando como referencia el C1, ver fig. 11). Es decir, desde el metilo de la posición 4, hasta el metilo enlazado al carbono 6, lo cual orienta sobre la regionalización de plegamientos con los residuos interactuantes dentro del bolsillo de unión con el ligando acoplado.

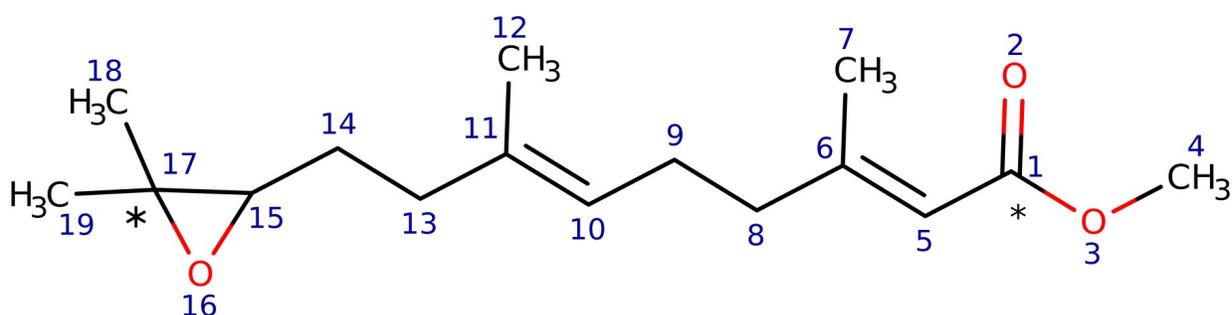


Fig. 11. Átomos numerados de la estructura JH III-10R.

En el segmento opuesto se tiene que TYR-129 y TYR-133, ambas conformantes de los giros 3 y 4 de la H6; así como PHE-144 del *loop* 8, PRO-55 del *loop* 3, VAL-65 y VA-68 de los giros 3 y 4 de la H3 ayudan al acoplamiento del segmento opuesto al descrito primeramente (del C 11 al C 18 y C 19 implicados en la formación del grupo epóxido) y la estabilización de la estructura durante el acoplamiento. Ello gracias a las interacciones  $\pi$ -alquil y  $\pi$ - $\sigma$  principalmente, al ser las interacciones no covalentes de mayor energía implicados como fuerzas de estabilización (Giese y Albrecht, 2020 y Tiekink y Zukerman, 2012) (fig. 12). En este caso se destaca al residuo TRP-53, pues presenta ambos tipos de las interacciones nombradas, con 5 C de la estructura JH III-10R, en las posiciones 7, 9, 12, 14 y 18. Similar situación con VAL-68, que muestra interacciones alquil y  $\pi$ -alquil con 4 C de la estructura, en las posiciones 9, 14, 18 y 19.

Solamente TYR-129 presenta un enlace convencional de hidrógeno, entre el oxígeno de su hidroxilo fenólico y el oxígeno del grupo epóxido,

con una distancia de 2.75 Å., TRP-53 posee interacción  $\pi$ - $\sigma$  con una distancia de 3.86 Å, con el metilo enlazado al carbono de la posición 6. Los residuos TYR-33, TYR-64, PHE-144, PHE-269 y TRP-278 presentan interacciones alquil y  $\pi$ -alquil, siendo todos residuos neutros aromáticos.

Mismas interacciones para VAL-34, VAL-51, PRO-55, VAL-65, VAL-68 y ALA-281; en este caso neutros apolares. El carbono de la posición 1, con un doble enlace al grupo  $\alpha$ ,  $\beta$  metil éster, genera un puente de H con una molécula de agua, con una longitud de 2.86 Å. Mientras que el carbono enlazado al primer oxígeno, genera interacciones con: VAL-34, PHE-269, TRP-278 y ALA-281. Aunado a lo anterior, el carbono en la posición 9 mantiene interacciones con: TYR-33, TRP-53, TYR-64, VAL-68. Por último, el carbono sustituyente en la posición 7 con: TYR-33, VAL-51 y TRP-53. Tras el acoplamiento con su propio receptor proteico, género una puntuación de -9 kcal/mol.

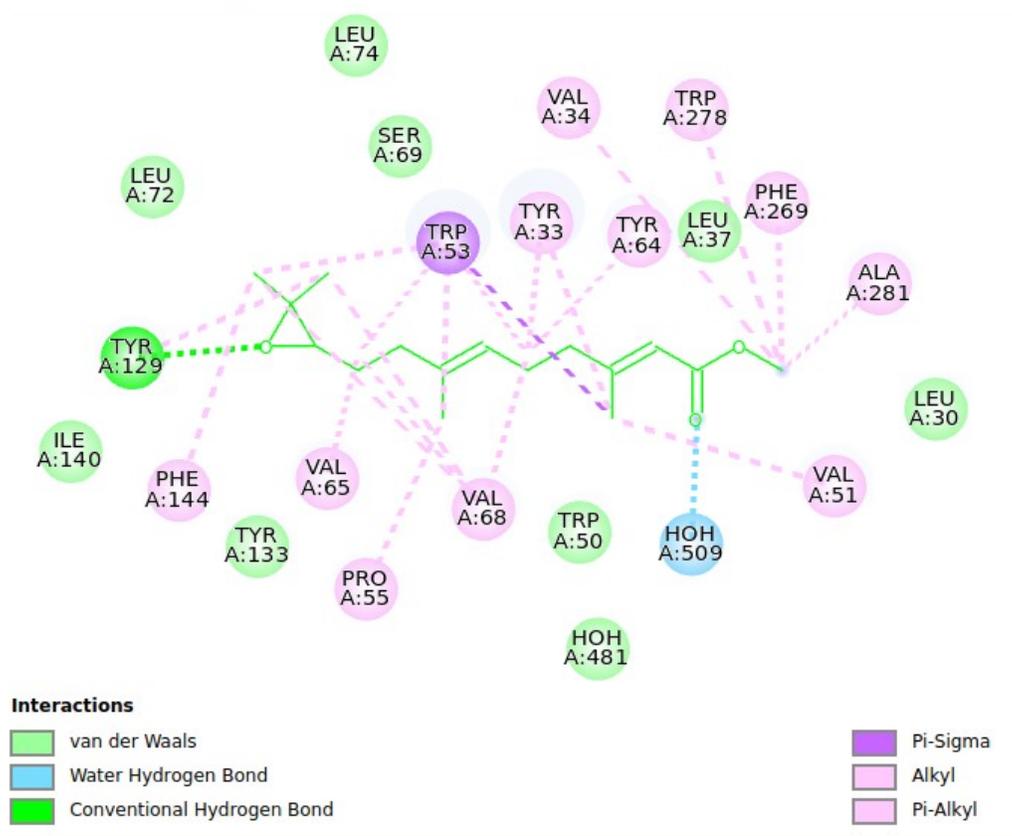


Fig. 12. Mapa de interacciones entre el ligando JH III-10R y residuos en el bolsillo de unión de mJHBP.

La forma de esta cavidad, cuya disposición espacial se asemeja a una L (fig. 13), que al no estar totalmente cerrada en ninguna de sus 3 cadenas, permite la entrada de moléculas de agua; cuya interacción con alguna de ellas, facilita la estabilidad coordinada del ligando para el acoplamiento, mediante un puente de H. Aunque los autores Kim *et al.*, 2017, co-cristalizaron receptor y ligando con una sola molécula de agua presente, es plausible que esta proteína que actúa como transportadora de ligandos de estructura fuertemente hidrófoba, pueda recibir más moléculas de agua provenientes del medio hemolinfático dentro de esta cavidad; si otro ligando distinto acoplado, tuviera cierta polaridad y/o los átomos enlazados en el sitio correcto, como para permitir más interacciones mediante puentes de H con esta moléculas de agua.

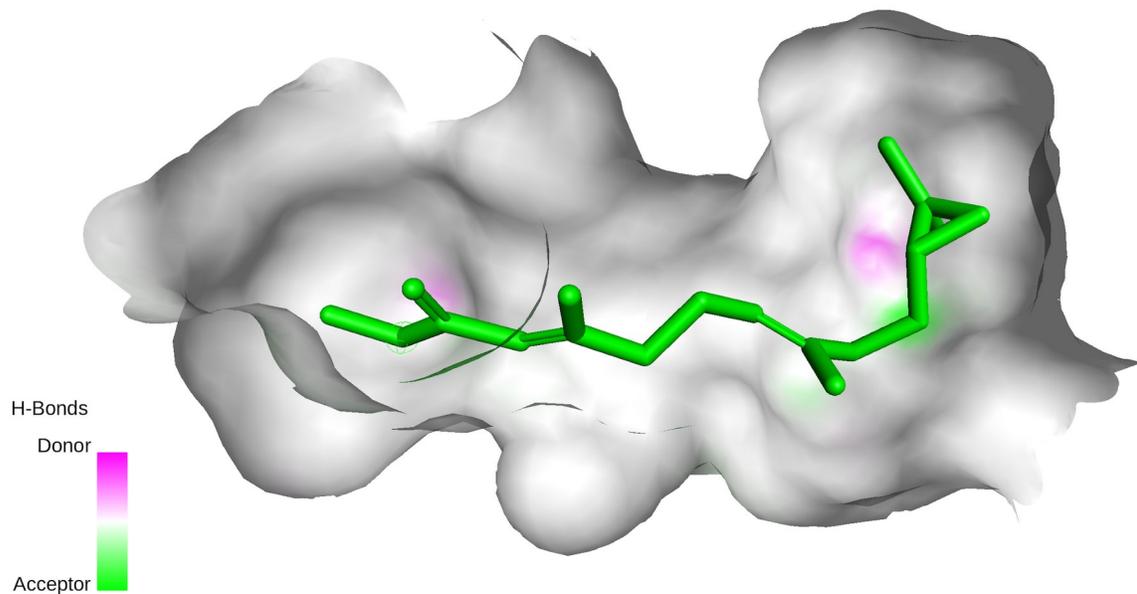


Fig. 13. Disposición espacial del ligando dentro del bolsillo de unión interno. Destacable como la JH III-10R se encuentra en concordancia en cuanto a su conformación, permitiéndole un acoplamiento en sintonía con la forma de L de la cavidad.

## Diseño del farmacóforo basado en ligando

Los residuos neutros apolares LEU-30, LEU-33, VAL-34, VAL-51, PRO-55, VAL-65, VAL-68, LEU-72, LEU-74, ILE-140 y ALA-281, presentes en los motivos estructurales que conforman el bolsillo de unión interno, le confieran una hidrofobicidad discriminatoria por moléculas con un componente estructural sesquiterpenoide. Además concretamente los residuos LEU-30, LEU-37, TRP-50, SER-69, LEU-72, LEU-74, TYR-133 e ILE-140, mantienen interacciones tipo Van der Waals con la superficie molecular del ligando JH III-10R, esto al parecer mayormente en dirección hacia los extremos de esta molécula, ambos con presencia de 1 y 2 átomos de oxígeno. Es decir, la longitud de la molécula, así como la presencia de cargas a una intensidad y distancia concretas, favorecen la proximidad y atracción entre los polos de esta hormona y los residuos presentes de las hélices  $\alpha$  interactuantes (fig. 14).

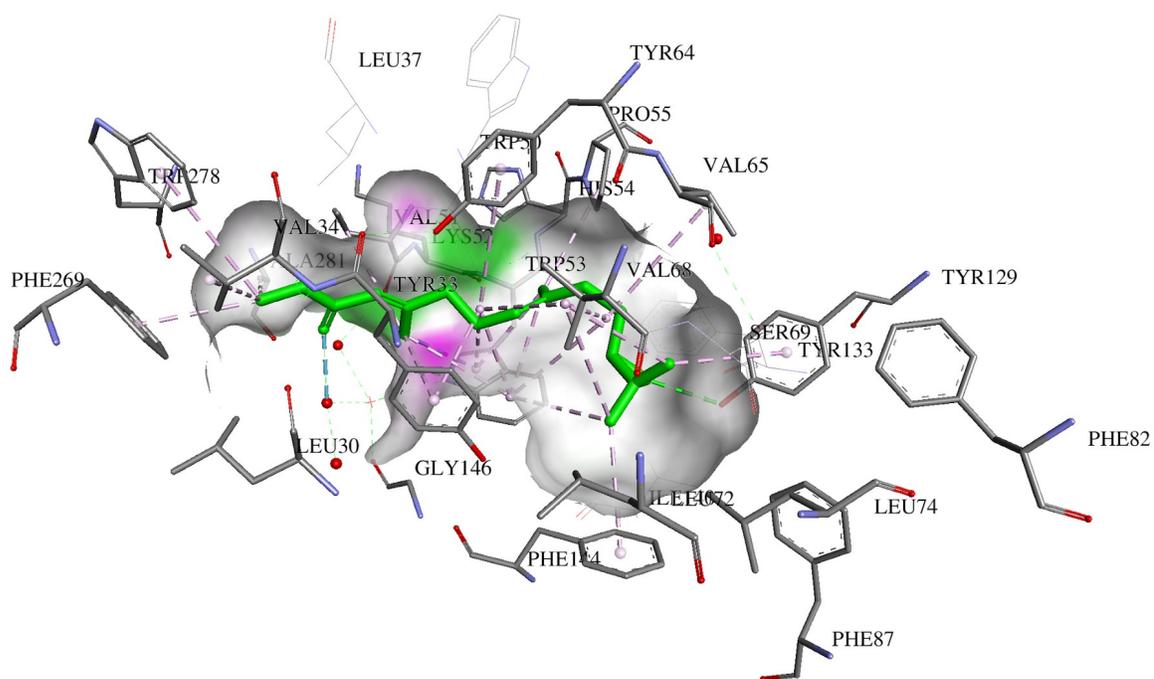
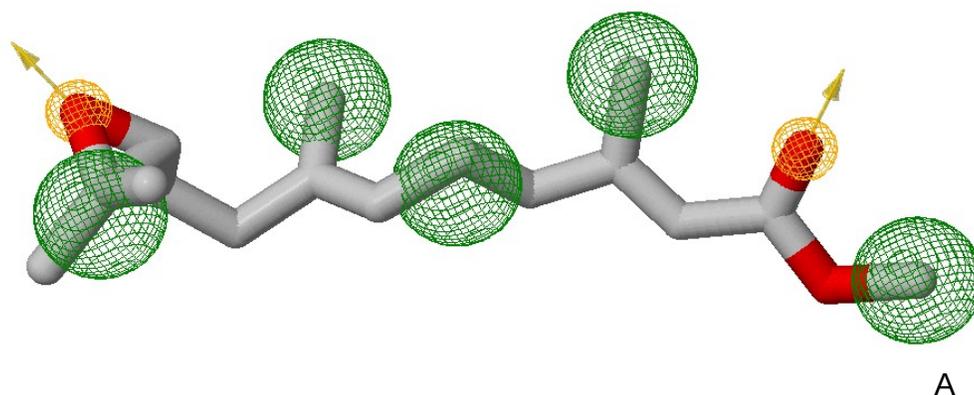


Fig. 14. Vista rotada que muestra la disposición espacial de la mayoría de las cadenas laterales de los residuos interactuantes con la estructura de la hormona JH III-10R.

El farmacóforo derivado de las características más destacables presentes entre las interacciones de JH III-10R y el receptor mJHBP (fig. 15), posee 4 puntos de anotación, distribuidos en 6 ubicaciones distintas. A saberse 3 hidrófobas, 2 de las cuales se encuentran superpuestas a los 2 aromáticos existentes y 3 aceptoras de H dispuestas en ambos extremos. Estas representaciones en esferas de colores corresponden a las características que fueron buscadas, con miras a aumentar la afinidad y estabilidad de las estructuras derivadas del farmacóforo diseñado basado en el ligando JH III-10R. Es decir, el presente farmacóforo, posee los requerimientos mínimos a considerar en interacciones, como para tener la capacidad de generar nuevas estructuras con alta afinidad y estabilidad al bolsillo de unión del receptor mJHBP. Consecuentemente, se compararon tanto los rasgos de la estructura JH III-10R y los de la estructura líder generada del farmacóforo, mediante la métrica de Jaccard-Tanimoto, obteniendo un valor de 0.15625. Si conocemos que 1 equivale a una igualdad absoluta entre ambas, vemos que el valor es muy bajo (chung *et al.*, 2019). No obstante, es apreciable como los puntos de anotación poseen una distribución espacial similar, aunque las estructuras que las originaron son distintas en su configuración.



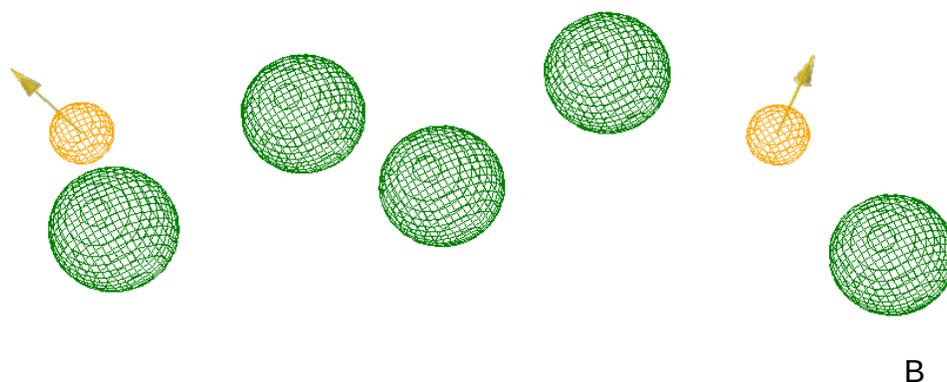


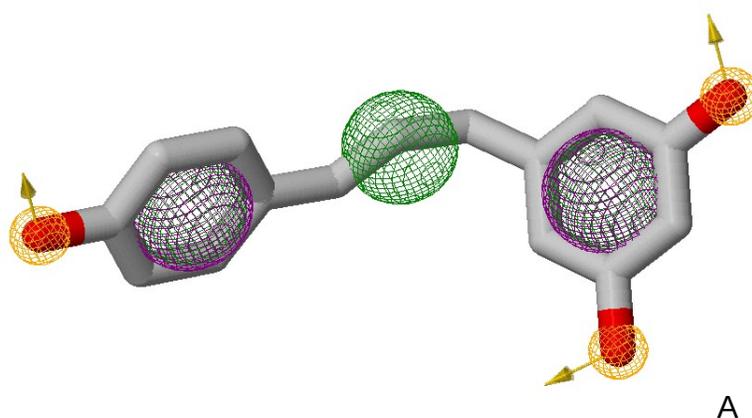
Fig. 15. A corresponde a las características derivadas de las interacciones con el ligando JH III-10R. B, las esferas de color verde muestran las características hidrófobas, mientras en naranja, se encuentran los aceptores de hidrógeno. Las primeras 4 esferas verdes (de izquierda a derecha) marcan la región más hidrófoba del ligando, dada su ubicación y cercanía.

Dado esto, sirvió como parámetro para brindar un valor cuantitativo a los núcleos de interacción y la dilucidación de rasgos haptofóricos optimizables a considerar, manteniendo aquellos que parecen brindar estabilidad y la facultad de acoplamiento de alta afinidad. Es por ello por lo que las estructuras generadas poseen un patrón de andamiaje básico, fácilmente apreciable, dada la configuración de la cadena principal y la mayoría de sus sustituyentes. Concretamente en la fig. 16, podemos apreciar que la ubicación de los puntos de anotación (distribución espacial de los puntos que muestran la presencia o ausencia de una característica) (Pérez, 2009) dispuestos longitudinalmente, evidencian cierto patrón espacial resultante de las características propias del ligando JH III-10R presentes en la estructura líder derivada del farmacóforo, representadas en A. Siendo esta la estructura líder de la cual se derivaron nuevos ligandos teóricos.

Lo anterior facilitó la inferencia de colocar 2 anillos aromáticos separados por un máximo de 5 C a un mínimo de 2 C; con 1-2 dobles enlaces conjugados en el centro de esta región de la cadena principal. Los anillos aromáticos fueron colocados en posiciones concretas, con

átomos electronegativos o relativamente electronegativos en los sustituyentes enlazados a estos, con el fin de favorecer la creación de interacciones por puentes convencionales de H y puentes de halógeno, buscando proximidad espacial con residuos de cadena lateral neutro polar y aromática previamente identificados a una distancia menor de 5.50 Å de la posible superficie del ligando teórico a evaluar dentro del sitio de unión. Con ello, originándose una estructura líder, a partir de la cual basar el diseño de nuevas estructuras. La longitud de la cadena principal, facilitó la reducción de distancia entre esta y residuos específicos, todos parte de algunos de los giros de las hélices  $\alpha$  H1, H2, H3, y H6, siendo estos destacados.

Esto pues los residuos TYR-33, VAL-34 y LEU-37 de los últimos 3 giros de la H1, igualmente de TRP-50, VAL-51 y TRP-53 al final de la H2, TYR-64 y SER-69 de los giros 2 y 4 de la H3, así como de TYR-129 y TYR-133 de los giros 3 y 5 de la H6 principalmente; son los que interactúan directamente con la JH III-10R, contribuyendo a la estabilidad dentro del bolsillo de unión interno. El conocimiento de las interacciones de estos residuos con esta hormona favoreció la dirección y creación de más interacciones dirigidas a los anillos aromáticos de las estructuras derivadas del farmacóforo diseñado, así como un aumento teórico de la afinidad hacia esta estructura relativamente apolar, ayudada por la reducción en la presencia de átomos de oxígeno.



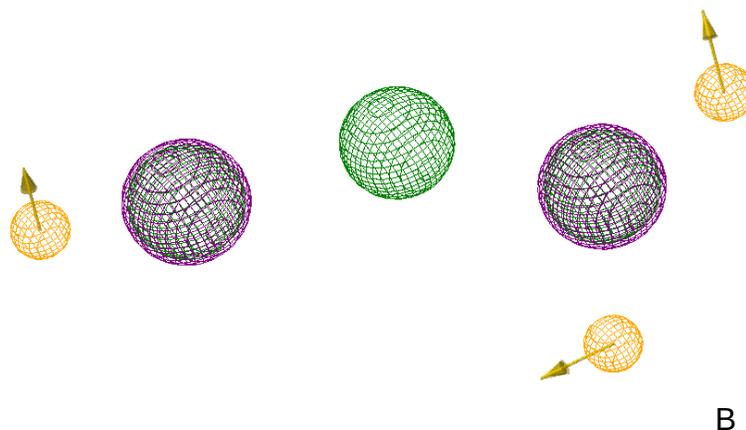


Fig. 16. A. Estructura líder derivada del farmacóforo. Las esferas verdes corresponden a la posición de las características hidrófobas, pero en la posición de las esferas moradas, promotoras de interacciones aromáticas, se encuentran superpuestas con 2 esferas verdes. Las esferas naranjas, que corresponden a aceptores de hidrógeno, se encuentran en posiciones periféricas hacia ambos extremos. En el caso de B, se presenta un resumen de los requerimientos mínimos necesarios para superar la afinidad a la mostrada por la estructura de la JH III-10R.

### **Ligandos diseñados y análisis estructural**

Las estructuras derivadas de la estructura líder, poseen una configuración dirigida a maximizar la estabilidad y afinidad del acoplamiento, mediante la ubicación de estructuras cicladas hacia los extremos, enlazadas a su vez con al menos 3 sustituyentes; portadores de átomos electronegativos como F y O2 principalmente. Esto puesto que el centro molecular hidrófobo favorece la afinidad y reconocimiento molecular por parte del bolsillo de unión interno, demostrado por el número y ubicación espacial de residuos de cadena lateral apolar en dicha cavidad y el análisis *in silico* del acoplamiento e interacciones con la hormona JH III-10R. Sin embargo, la adición de átomos de O2 fomentan cierta polaridad, lo cual es positivo al considerar que estos ligandos tendrían que desplazarse en un medio hemolinfático fuertemente acuoso, facilitando su movilidad y disminuyendo su probable degradación y metabolización antes de reconocer y unirse a su objetivo (Figs. 17, 18 y 19).

Además, el espaciado que generan los átomos de C con el doble enlace entre los ciclos, favorecen la separación de cargas originadas por estos átomos, evitando su repulsión por parte de los residuos encargados del reconocimiento molecular, favoreciendo también, un aumento en el número de residuos implicados en la formación de interacciones tipo van der Waals en el sitio de unión.

Descriptivamente D145 posee 2 anillos aromáticos presentes hacia ambos extremos de la estructura, ambos separados por 2 carbonos unidos por un doble enlace, del C 6 la C 9, lo cual le confiere la longitud necesaria para generar un mayor número de interacciones. Los sustituyentes del primer anillo, poseen 4 átomos de F en posiciones orientadas para externar su electronegatividad, en las posiciones: 19, 20, 22 y 23. Pro estos 2 últimos separados por un O en la posición 21. En el segundo anillo, enlazado al C 13, el C 27 esta enlazado a su vez con un metilo y un O con un doble enlace. Mientras que el sustituyente enlazado a la posición 10, esta constituido de un OH en la posición 26 y un metilo en la 25. El valor arrojado tras la aplicación del coeficiente de Jaccard-Tanimoto entre la presente estructura y la estructura líder fue de 0.46875.

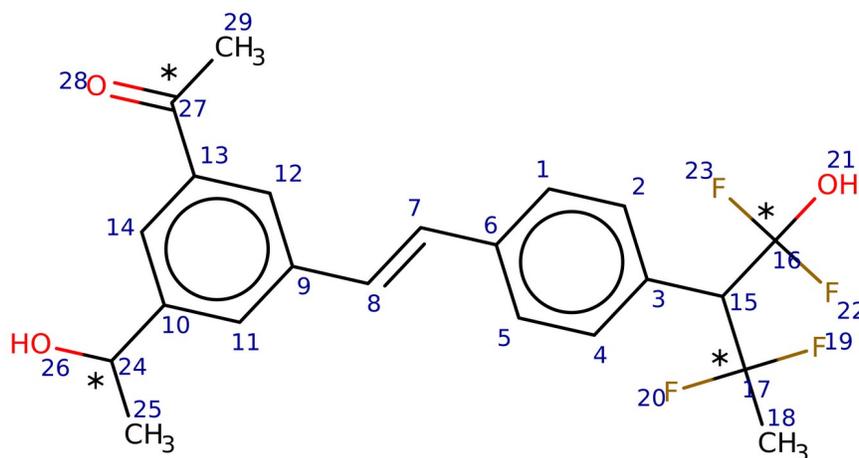


Fig. 17. Estructura del ligando 1-{3-[(1S)-1-hydroxyethyl]-5-[(1E)-2-{4-[(2S)-1,1,3,3-tetrafluoro-1-hydroxybutan-2-yl]phenyl}ethenyl]phenyl}ethan-1-one, según denominación IUPAC, 2021. Está denominada como D145, constituida por 29 átomos.

D180 tiene un grupo indol, enlazado mediante el C de la posición 3, a 2 grupos con F, unidos por un enlace simple al C de la posición 22. El pirrol presenta un NH en la posición 7, mientras el C 8 le une a la cadena principal mediante un enlace sencillo al C 10. Presentando este a su vez, un doble enlace con el C 11, unido a un hexahidronaftaleno, por un enlace sencillo al C 12. En este caso, el valor obtenido del coeficiente de Jaccard-Tanimoto, fue de 0.268293.

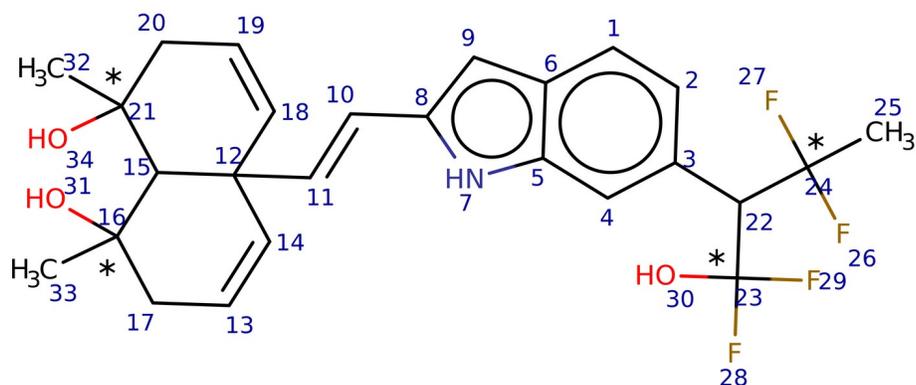


Fig. 18. Estructura (1R,4aR,8R,8aR)-1,8-dimethyl-4a-[(1E)-2-{6-[(2S)-1,1,3,3-tetrafluoro-1-hydroxybutan-2-yl]-1H-indol-2-yl}ethenyl]-1,2,4a,7,8,8a-hexahidronaftaleno-1,8-diol, denominada D180.

En el caso de D194, los 2 anillos aromáticos se encuentran separados por 3 C, para aumentar longitud, estando un enlace doble entre el C 7 y C 8. Ambos anillos con sustituyentes portadores de átomos electronegativos, el primero con enlace al C de la posición 3, con 4 átomos de F en las posiciones 12, 13, 15 y 16. Con un OH en la posición 14 y un metilo en la 17. En el segundo anillo, el C 28 del sustituyente, enlazado a 2 metilos con las posiciones 29 y 30, así como un OH en la 31; se enlaza al C de la posición 22. Mientras que el C 20 se enlaza al C 25 del segundo sustituyente, enlazado también a un metilo en la posición 26 y un OH en la 27. Para esta estructura, el coeficiente de Jaccard-Tanimoto arrojó un valor de 0.484848.

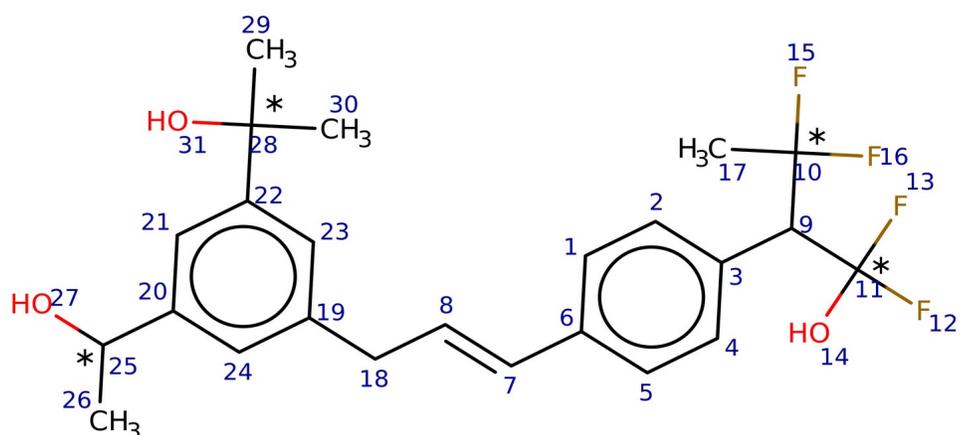


Fig. 19. Átomos numerados de la estructura (2R)-1,1,3,3-tetrafluoro-2-{4-[(1E)-3-{3-[(1S)-1-hydroxyethyl]-5-(2-hydroxypropan-2-yl)phenyl}prop-1-en-1-yl]phenyl}butan-1-ol, denominada D194.

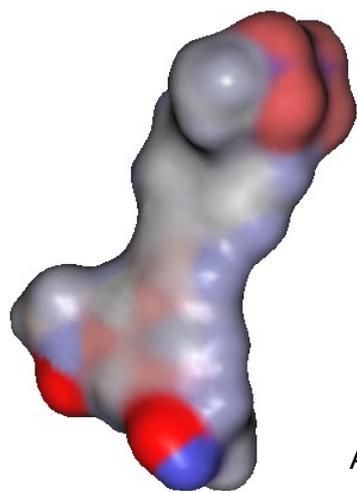
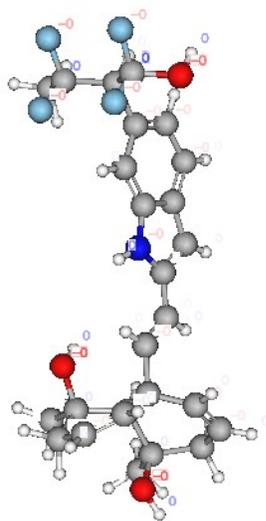
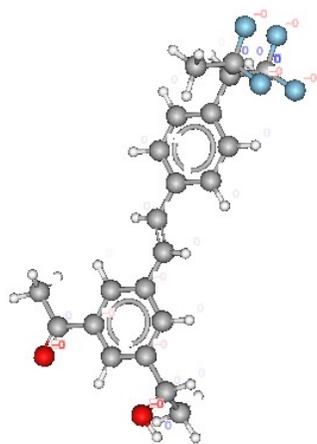
En cuanto a las similitudes estructurales entre estos ligandos y la estructura líder, los resultados arrojados por el coeficiente de Jaccard-Tanimoto, mostraron que D145 y D194 poseen similares rasgos haptofóricos constantes, cuya cadena principal funge como un andamio con capacidad de incluir sustituyentes a una distancia clave de los residuos considerados de interés fundamental para el reconocimiento y desarrollo de interacciones estabilizadoras. No obstante, la estructura D180 arrojó un valor mucho más bajo. Ello debido a que se consideró optimizar algunos rasgos con miras a aumentar la afinidad, como la adición de un grupo indol y cambios en la posición de algunos átomos electronegativos en los sustituyentes. Lo que eventualmente disminuye la similitud estructural y la identidad de la configuración de la cadena principal, para con la estructura líder de la cual derivó.

## Distribución de cargas y momento dipolar

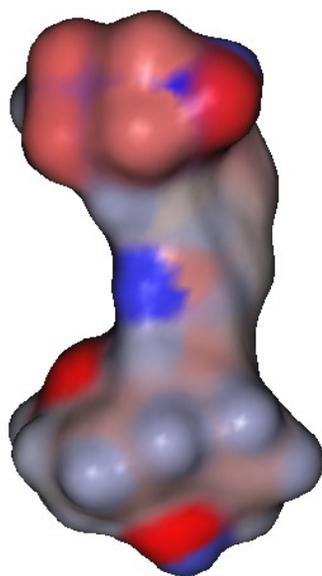
La cuantificación de los efectos de separación de cargas presentados (fig. 20), enmarcan su distribución en un sistema poliatómico asimétrico, que muestra gráficamente la tendencia de diseño hacia el desarrollo de múltiples polos en ambos extremos de las moléculas. Con el fin de presentar ligandos con propiedades relativamente apolares, con dicha propiedad desplazada del centro, el cual debe tener mayor hidrofobicidad, y por tanto, menor carga posible en esa región concreta de la cadena principal (en color gris, abarcando desde el centro, en proximidad a ambos extremos de los 3 ligandos). Ello, ya que teóricamente, esta región actúa como centro de reconocimiento molecular por parte de la proteína objetivo mJHBP.

También es apreciable como en D145 (A), la distribución de cargas es más ubicua y regionalizada, siendo esto medianamente en D180 (B) y ligeramente menor en D194 (C); así como la conformación relativamente curva de las 2 últimas moléculas de mayor longitud, a comparación de C. Se denota la predominancia de un continuo hidrofóbico (Color gris), sobre todo desde el centro de cada molécula. Evidentemente su diseño consideró la ubicación de cargas presentes en ambos extremos de cada estructura, lo cual le confiere relativa polaridad, siendo ubicua la distribución de cargas electronegativas.

En cuanto al cálculo las magnitudes escalar-espacial de cada una de las estructuras representadas en 3D, se determinó que A posee un volumen de  $330.8 \text{ \AA}^3$  y un área de  $346.5 \text{ \AA}^2$ , en B es de  $393.9 \text{ \AA}^3$ , con un área de  $371.4 \text{ \AA}^2$ , y C presenta un volumen de  $367.8 \text{ \AA}^3$ , con un área de  $378.1 \text{ \AA}^2$ . También se muestra que D180 posee mayor volumen, pero D194 es quien presenta mayor área superficial, esto por el ordenamiento de los átomos, que le confieren una superficie molecular más accidentada.



A



B

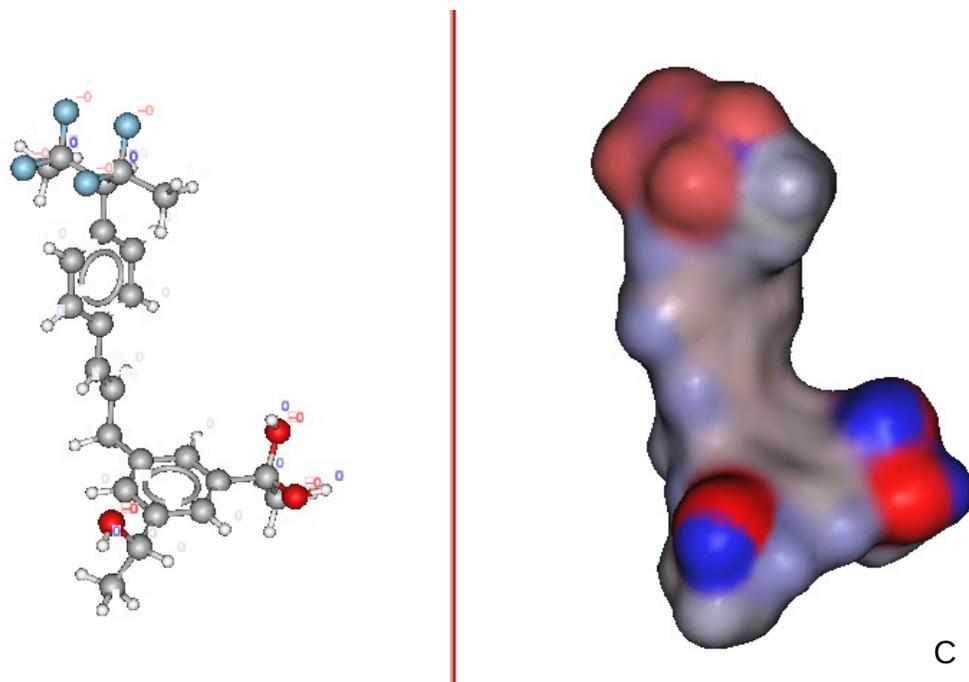


Fig. 20. Distribución de cargas moleculares en la superficie de los ligandos D145 (A), D180 (B) y D194 (C), columna derecha. En la izquierda de forma parcial, se muestran las cargas individuales por átomo enlazado.

Lo anterior tiene cierta relevancia, ya que, a mayor distancia entre las cargas, menor energía global molecular expresada (fig. 21). Esta es determinada a partir de las cargas parciales presentes y la geometría molecular de cada una. A saberse, para A consta de 13.4 D (13.36 X, -0.7 Y y -0.67 Z), para B es de 8.05 D (-5.12 X, 3.34 Y y 5.23 Z), y en el caso de C es de 7.44 D (6.66 X, 2.48 Y y 2.2 Z). Hecho demostrado ya que, A es quien expresa un mayor momento dipolar calculado, mientras que D180 y D194 poseen valores algo más reducidos.

Considerado esto, se denota como la diferencia en las cargas de los átomos enlazados en los sustituyentes, son un factor fundamental que tomar en cuenta durante el diseño de estructuras de alta afinidad. Ya que su orientación relativa espacial, puede favorecer contactos más próximos y dirigidos hacia las cadenas laterales aminoacídicas consideradas prioritarias, dada su posición en los motivos supersecundarios (en este caso, típicamente hélices  $\alpha$ ) responsables de la conformación del bolsillo de unión interno. En consecuencia, favoreciendo atracciones o evitando repulsiones entre las superficies

moleculares interactuantes, en función del tipo e intensidad de carga, así como de las distancias. Dado lo anterior, se consideró la colocación de átomos electronegativos en posiciones alejadas del centro de las estructuras diseñadas.

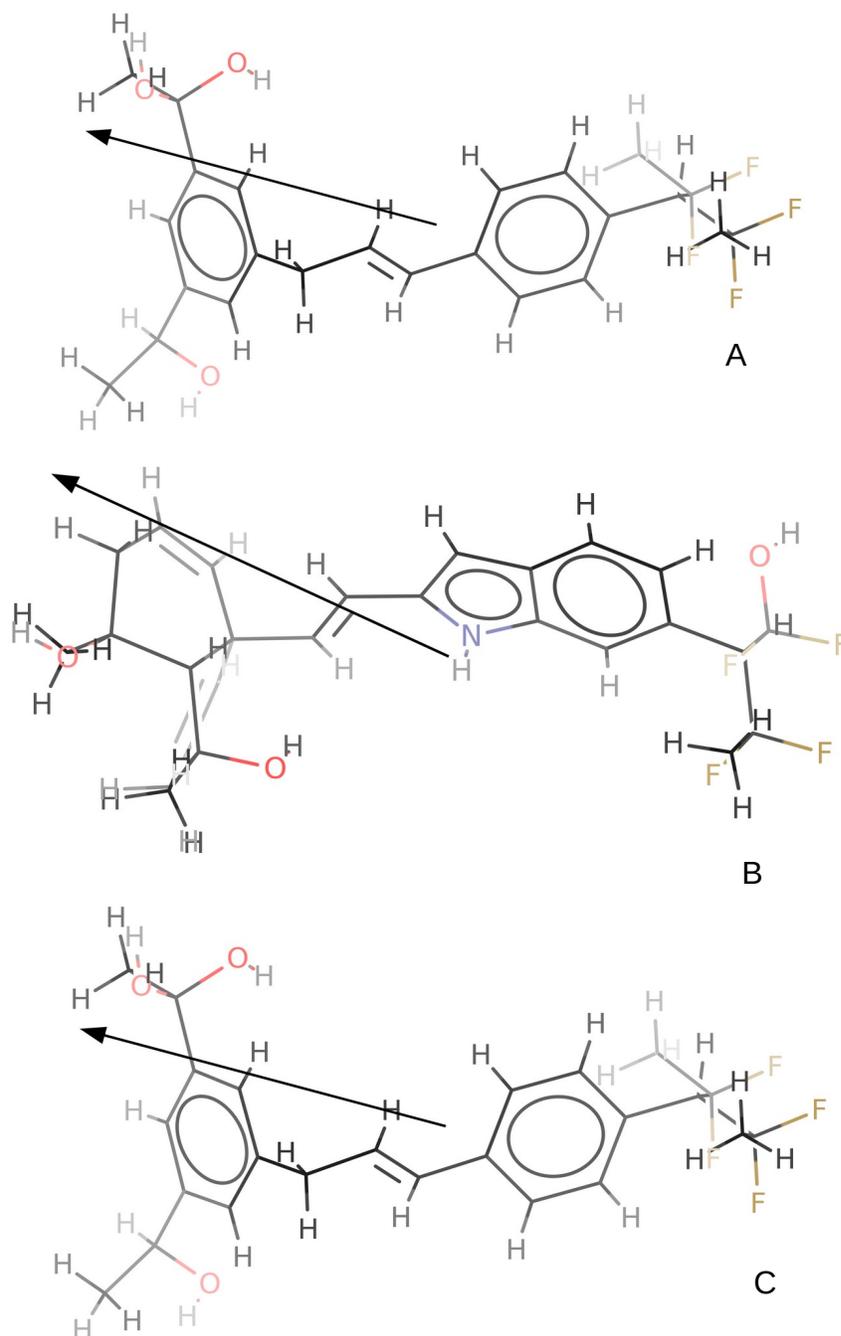


Fig. 21. Momento dipolar de D145 (A), D180 (B) y D194 (C). Al ser una magnitud vectorial son representadas gráficamente con flechas, desde el centro de cada estructura.

## Acoplamiento molecular y validación de estabilidad

El diseño racional basado en las características farmacofóricas derivadas del ligando JH III-10R, busca la elucidación de estructuras con un centro flexible, con el objetivo específico de mantener una relativa facilidad de aparición de cambios conformacionales por parte de las estructuras diseñadas, recíprocas hasta cierto punto, de la disposición espacial y volumen de la cavidad interna para con los residuos a interactuar. Esto con el fin de buscar un empalme o ajuste acorde a su forma en L curvada.

Las interacciones tipo  $\pi$  suelen formarse con los dobles o triples enlaces presentes en las estructuras interactuantes, frecuentemente se complica asumir su formación en enlaces simples, por lo que colocar anillos aromáticos con esta característica enlazados a una cadena carbonada con presencia de dobles enlaces, aumentó la probabilidad de reconocimiento y afinidad entre las estructuras derivadas a partir del farmacóforo para con el sitio de unión donde se encuentran residuos de cadena lateral aromática. Pero al considerar la afinidad, se debe tomar en cuenta que las interacciones tipo  $\pi$ - $\pi$  son menos estables y por tanto, débiles a comparación de las tipo  $\sigma$  (Arendorf, 2011 y Johnson & Hof, 2016).

Lo anterior como consecuencia de una marcada reducción en la distancia entre los orbitales p, resultado de la disposición espacial paralela de los mismos. Sin embargo, a diferencia de las interacciones  $\pi$ - $\pi$ , las tipo  $\sigma$  se presentan directamente entre los núcleos de los átomos interactuantes, es decir, contribuyen a la formación de orbitales intermoleculares, a partir de las nubes electrónicas próximas entre los átomos más cercanos de las distintos residuos interactuantes. Este tipo de interacciones, originan un aumento en la fuerza de atracción y en la superposición de las estructuras, por lo que la formación simultánea de interacciones  $\pi$ - $\sigma$  son marcadamente más estables a comparación del resto (Wheeler & Bloom, 2014).

La recepción de cada uno de los ligandos experimentales por parte del bolsillo de unión interno estuvo supeditada a las atracciones generadas por la distribución de cargas y su relativa apolaridad regionalizada en su parte media, lo cual es apreciable, dado que las interacciones resultantes se intensificaron hacia los átomos dentro de estructuras

cicladadas (desplazadas hacia ambos extremos de la estructura); así como de enlaces dobles. Esto último justificable, ya que la nube de e- en ambas caras de los anillos aromáticos implicados generan en conjunto, un continuo de bandas con diferencias energéticas relativas, producto de múltiples átomos enlazados influenciándose mutuamente, intercompartiendo su nube electrónica, lo que magnifica la diferencia y atracción entre cargas opuestas de 2 o más moléculas estructuralmente independientes, pero lo suficientemente próximas como para interactuar entre sí (por ello, su elección para la formación de estos ligandos).

Ya que los sustituyentes con átomos electronegativos enlazados a los ciclos matizan las fuerzas resultantes de las interacciones  $\pi$  entre estos anillos aromáticos, dado su efecto de desplazamiento sobre la densidad electrónica del sistema. Esto por que los sustituyentes con átomos electronegativos reducen la densidad de e- $\pi$  de los anillos a través de efectos de resonancia  $\pi$ , lo que conlleva a la reducción de la repulsión e-e- entre las nubes de e- $\pi$  del apilamiento entre los 2 anillos y mejora las interacciones  $\pi$  en dicho sistema acoplado (Johnson & Hof, 2016).

La distribución de cargas de ligandos es reconocida por residuos especialmente concatenados en un arreglo concreto que forma un patrón espacial de reconocimiento (en este caso se trata de los residuos ALA-281, TYR-148, PHE-144, VAL-68, TRP-53, TYR-33 y VAL-51 principalmente, presentes con la mayoría de los ligandos evaluados en los acoplamientos moleculares efectuados), gracias a que los residuos se disponen a una distancia específica, insertos en los motivos plegados conformantes del bolsillo de unión, como para permitir la lectura y posterior reconocimiento de un patrón de cargas propio de este tipo de moléculas o ligandos habituales con los cuales coevolcionó. Es decir, actúan como lectores de huellas digitales moleculares estructurales y naturales.

Para tener un índice del umbral biológico de afinidad entre el confórmero JH III-10R y el receptor mJHBP, se realizó un acoplamiento molecular respetando la conformación del ligando con el cual fue cristalizado, generando una afinidad de -9 kcal/mol. Se analizaron las interacciones resultantes y se compararon con las ya vistas en las estructuras co-cristalizadas. Posteriormente de cada una de las estructuras diseñadas con las cuales se realizaron acoplamientos, inicialmente con la cadena A, se analizaron los mapas de interacciones generados. De estas, destacándose 3, las cuales son dadas a conocer en el presente trabajo.



## Acoplamiento con D145

El acoplamiento con D145 (fig. 23), para el sitio de unión de la cadena A, produjo interacciones estabilizadoras tipo  $\pi$ - $\pi$  *Stacked*, como en el caso de TYR-33 con el segundo anillo aromático, a una distancia de 5.02 Å. Mientras que TYR-129 mostró 2 interacciones, una tipo  $\pi$ -alquil a 5.22 Å y un puente de H convencional a 2.93 Å con los 2 F contiguos de los sustituyentes enlazados al primer anillo aromático. El puente de halógeno entre VAL-65 y el F de la posición 19, mantuvo una longitud de 3.51 Å, una interacción débil entre el C-H y el F de la posición 20 a 2.35 Å y una alquil con el C de la posición 17 a una distancia de 3.91 Å, también fueron logradas.

VAL-51 presentó 2 interacciones, un puente de H convencional de 2.84 Å con el H enlazado al O2 de la posición 26. Así como una interacción tipo  $\pi$ -alquil con el segundo anillo, a una distancia de 4.48 Å. Sin embargo, el residuo contiguo VAL-68, mostró interacciones tipo  $\pi$ -alquil y alquil a una distancia de 4.66 Å y 4.21 Å, con el primer anillo y el C de la posición 15 respectivamente. SER-69 desarrolló 2 puentes de H convencional, a una distancia de 2.82 Å y 2.59 Å, con los 2 F enlazados al C de la posición 17. Un total de 13 residuos están implicados directamente en la formación de fuerzas tipo van der Waals, 5 de los cuales son aromáticos (TYR-133, PHE-269, TYR-48, y PHE-284), se encuentran a una distancia mayor a 6.5 Å de la superficie molecular del ligando, como para formar interacciones tipo  $\pi$ .

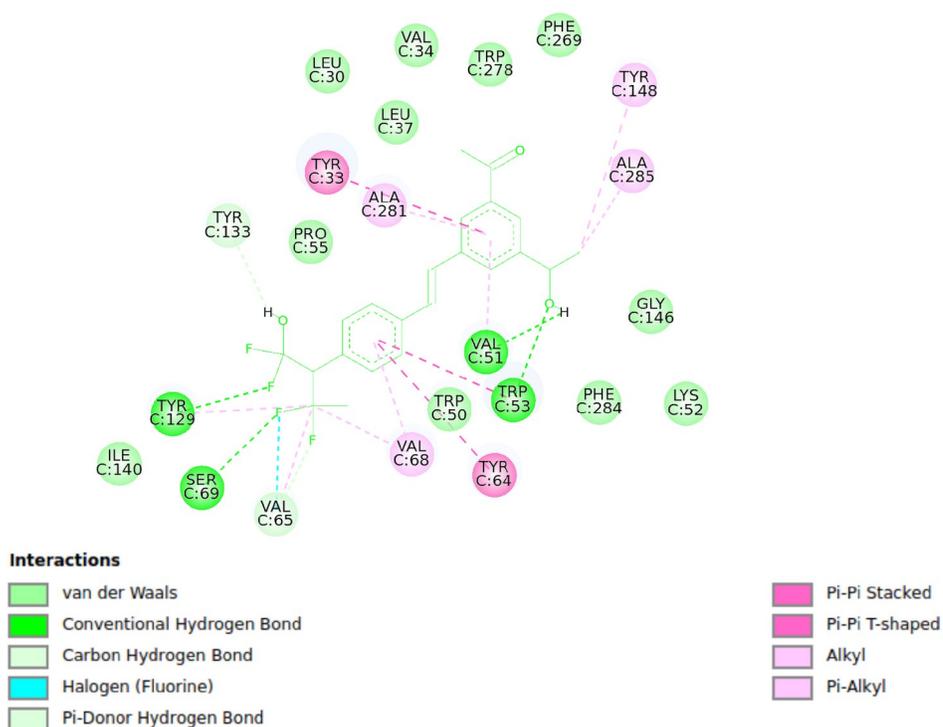


Fig. 23. Mapa de interacciones obtenido tras el acoplamiento entre el ligando D145 con la cadena A de mJHBP.

Su acoplamiento en el bolsillo de unión interno de la cadena B (fig. 24), generó interacciones tipo  $\pi$ - $\pi$  *Stacked* con TYR-33, a una distancia de 5.38 Å y de 4.38 Å con el segundo anillo aromático. Es decir, se presentaron 2 interacciones de este tipo con el mismo anillo, una de las cuales, mostró mayor longitud a comparación de la presentada en la cadena A. TYR-129 formó un puente convencional de H con el F de la posición 22 a una distancia de 2.99 Å y una interacción  $\pi$ -alquil a 5.17 Å.

El residuo VAL-65 siguió manteniendo las 3 interacciones anteriormente descritas, generando una interacción débil entre un C-H a 2.95 Å y el F de la posición 20, un puente de halógeno a una distancia de 4.32 Å con el F de la posición 19, y una interacción alquil a 3.87 Å con el C de la posición 17. Lo que significa que hay una cercanía relativamente más estrecha entre las superficies del ligando D145 y del bolsillo interno de la cadena B, a comparación del sitio de unión en la cadena A. Concretamente entre estos residuos y la región del ligando del C de la

posición 15 hacia su extremo inmediato. Un tercer puente de H convencional fue formado por SER 69 con el F de la posición 19, a una distancia de 2.81 Å. Esto aunado a un último puente de H convencional entre VAL-51 y el H enlazado al O2 de la posición 26, a una distancia de 2.15 Å. Pero también presentó una segunda interacción  $\pi$ -alquil con el segundo anillo aromático a 4.38 Å. Por último, VAL-68 formó 2 interacciones más,  $\pi$ -alquil con el primer anillo y alquil con el C de la posición 17, a distancias de 4.69 Å y 4.19 Å respectivamente. 15 residuos forman interacciones tipo van der Waals, estando TYR-64, TRP-50 y PHE-284 a una cercanía mayor de la periferia entre el primer anillo aromático y la parte central del ligando.

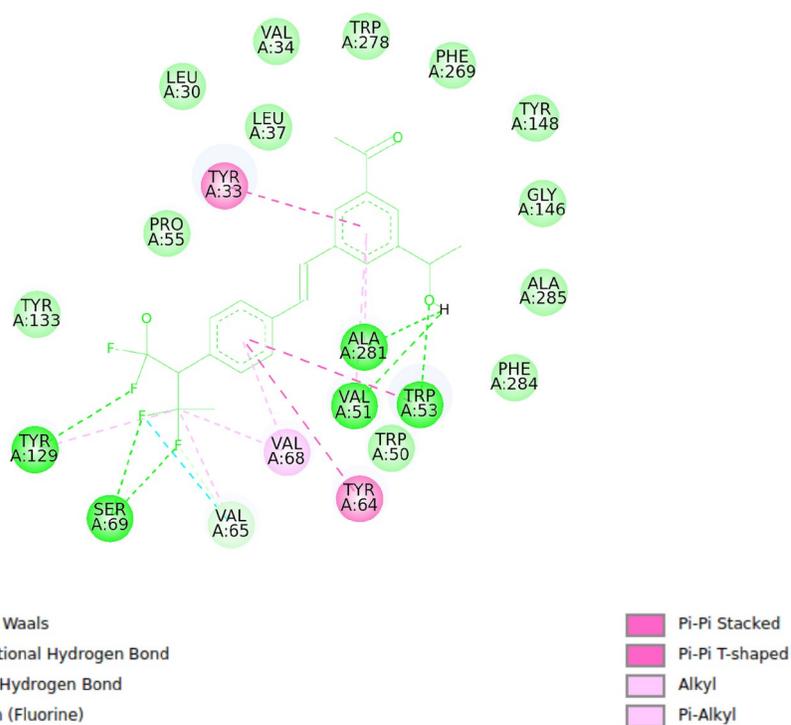


Fig. 24. Mapa de interacciones tras el acoplamiento entre D145 y la cadena B de la mJHBP.

En cuanto al acoplamiento en en la cadena C (fig. 25), el ligando experimental D145 presentó una interacción tipo  $\pi$ - $\pi$  *stacked* entre TYR-33 y el segundo anillo, a una distancia de 5.02 Å y  $\pi$ -alquil con TYR-129 y el C de la posición 17 a 5.24 Å. También este último mantuvo una segunda interacción tipo puente de H convencional, con el F de la posición 22. VAL-65 generó 3 interacciones, a saberse: Un puente de C-H de 2.29 Å con el F de la posición 20, un puente de halógeno de 3.35 Å, con el F de la posición 19 y una interacción alquil de 3.84 Å con el C de la posición 17. Como en los 2 casos anteriores, VAL-51 mantuvo un puente de H convencional con el H enlazado al O2 de la posición 26, a una distancia de 2.20 Å. Mientras VAL 68 generó una interacción  $\pi$ -alquil de 4.76 Å con el primer anillo aromático y una alquil de 4.12 Å de longitud con el C de la posición 17. Finalmente SER-69 presentó un puente de H convencional de 2.77 Å, con el F de la posición 19. Solo 11 residuos forman interacciones van der Waals, encontrándose a mayor cercanía TRP-50, PRO-55, PHE-284, LEU-37 Y TRP-278.

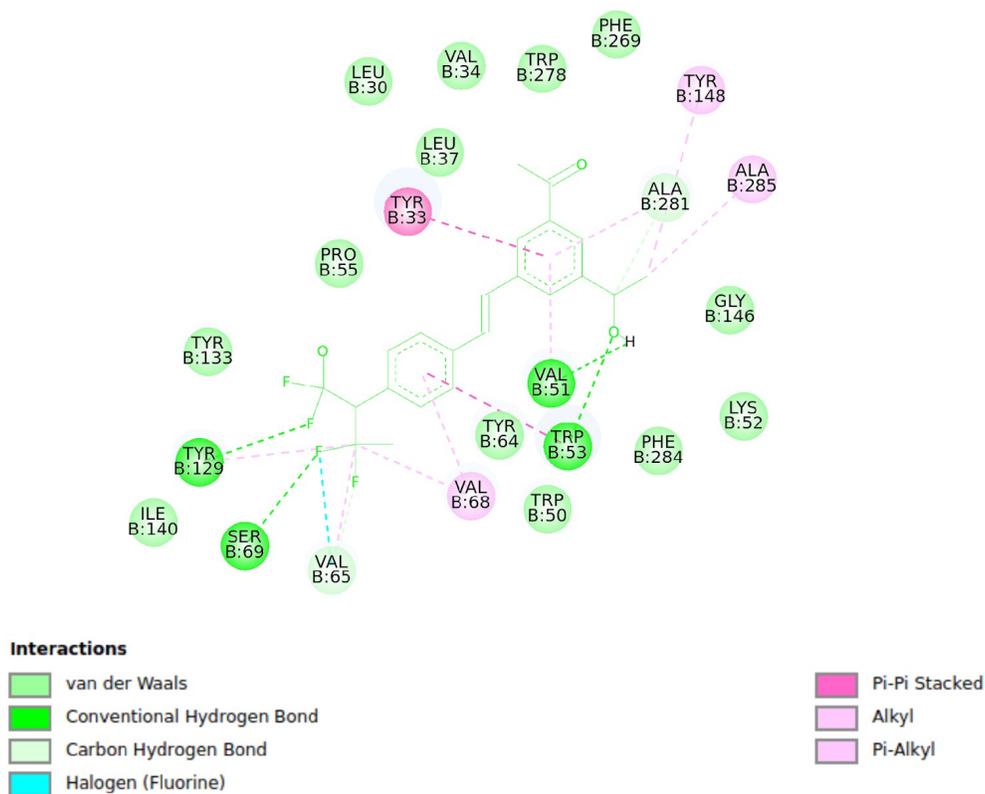


Fig. 25. Mapa de interacciones entre la estructura D145 y el bolsillo de unión de la mHJBP.

Los residuos en común con interacciones mostrados (fig. 26), se toman como fundamentales para generar el requisito mínimo de reconocimiento del ligando. Ello dada su frecuencia en los 3 acoplamiento, así como el tipo y número de interacciones generadas con segmentos estructurales clave del presente ligando. El resto se consideran de estabilidad, al fomentar un aumento en la afinidad con diferente posición, interacción e identidad en cada sitio de unión, pero no son tan críticos como los primeramente descritos. El diferente arreglo espacial disminuyó en 2 décimas la puntuación generada en las cadenas B y C a comparación de la cadena A.

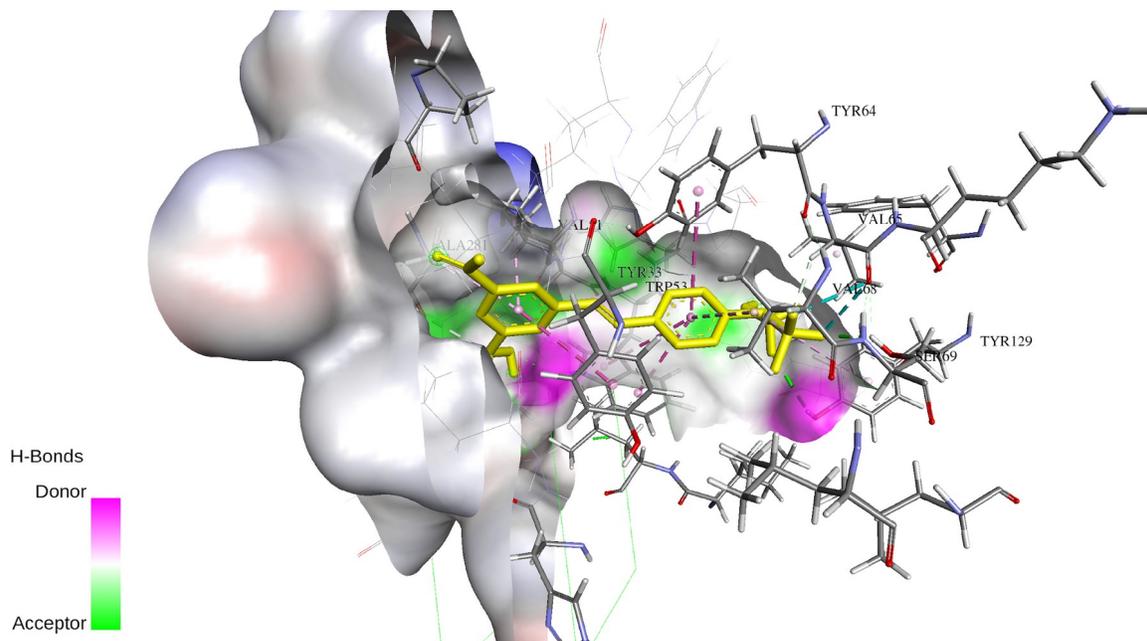


Fig. 26. Disposición espacial del ligando D145, acoplado en la cadena A, en color amarillo, dentro del bolsillo de unión interno de la mJHBP. En color gris se representa parte de la superficie de la pared interna de dicha cavidad, así como de la externa, que habrá de estar en contacto con la hemolinfa, aislando al ligando del medio acuoso.

Se considera que las diferentes afinidades inferiores a la mostrada entre D145 y el sitio de unión de la cadena A (-12 kcal/mol) a comparación de las dos cadenas restantes, es debido concretamente a que en el caso de B, la afinidad global se reduce a -11.5 kcal/mol, pues TYR-64 ya no presenta la interacción  $\pi$ - $\pi$  *T-shaped* que si se encuentra en A y B. Igualmente debido a la reducción en el número de interacciones en TYR-129 (por pérdida de una interacción  $\pi$ -alquil) y en SER-69 (pérdida de un puente de H convencional con uno de los 2 F). Ello a pesar de que TYR-148 y ALA-285 presentan interacciones  $\pi$ -alquil y alquil ausentes en el acoplamiento en la cadena A.

En el caso del acoplamiento en la cadena C, D145 mostró una afinidad de -11.8 kcal/mol, pero prácticamente presenta las mismas interacciones que en el sitio de unión en la cadena A. Excepto por la pérdida de un puente de H convencional con VAL-51, aun así, C generó 2 interacciones ausentes en A pero presentes en B. Se trata de una interacción  $\pi$ -alquil con TYR-148 y una alquil con ALA-285, ambas llevadas a cabo en el C de la posición 25. También mantuvo las interacciones  $\pi$ - $\pi$  *T-shaped* y  $\pi$ - $\pi$  *stacked* con los mismos residuos y a distancias muy similares que en el acoplamiento de la cadena A, por lo que se infiere que la afinidad no se vio tan drásticamente afectada por la presencia de estas 2 interacciones.

### **Acoplamientos con D180**

Los acoplamientos con el ligando D180 realizados en el sitio de unión de la cadena A (fig. 27), lograron un puente de H  $\pi$ -donante entre TYR-33 y el H enlazado al N de la posición 57, con una distancia de 2.30 Å. Además de 2 interacciones más: Una  $\pi$ -alquil de 4.50 Å con uno de los ciclos del hexahidronaftaleno y otra tipo  $\pi$ - $\pi$  *T-shaped* con el pirrol, a una distancia de 4.81 Å. También se logró que VAL-51 generó 2 interacciones  $\pi$ -alquil a distancias de 4.96 Å y 5.18 Å con los 2 ciclos del hexahidronaftaleno, mientras que TRP-53 presentó una interacción  $\pi$ -alquil de 5.08 Å de longitud con el C de la posición 54 plegado detrás de uno de los los ciclos más próximos.

También con el grupo indol se desarrollaron 4 interacciones tipo  $\pi$ - $\pi$  *stacked*, a distancias de 3.99 Å , 5.20 Å, 3.64 Å y 4.26 Å. En este acoplamiento, el único puente de halógeno logrado se presentó entre el

F de la posición 28 y VAL-68, a una distancia de 3.69 Å. Este residuo generó 2 interacciones más, una alquil de 4.34 Å con el C de la posición 40 y otra  $\pi$ -alquil de 5.18 Å de longitud con uno de los anillos aromáticos del indol. Un conjunto de 15 residuos está implicados en la formación de fuerzas de van der Waals para con este ligando, estando PHE-284, LEU-30 e ILE-140 más próximos a la superficie molecular del ligando.

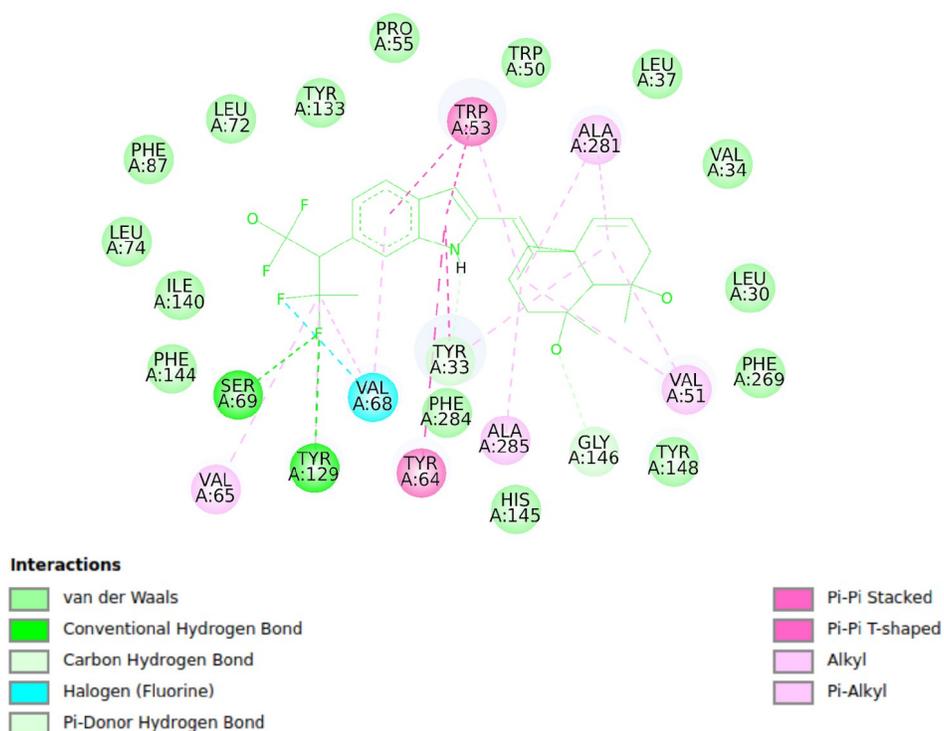


Fig. 27. Mapa de interacciones resultante entre el ligando D180 y la cadena A del receptor mJHBP.

En cuanto a los resultados generados en la cadena B (fig.28), el puente de H  $\pi$ -donante fue de 2.39 Å, ligeramente mayor que en A. El ligando diseñado también mostró más distancia para con TYR-33 en las interacciones restantes,  $\pi$ -alquil a 4.83 Å y  $\pi$ - $\pi$  T-*shaped* a 4.60 Å. Las interacciones con VAL-51 tipo  $\pi$ -alquil, fueron de 4.98 Å y 5.20 Å. TRP-53 mantuvo las mismas interacciones pero a distancias de 5.05 Å para  $\pi$ -alquil, 5.18 Å, 3.60 Å y 4.18 Å para  $\pi$ - $\pi$  *stacked*. En el caso de VAL-51, las interacciones  $\pi$ -alquil con uno de los ciclos del hexahidronaftaleno, mantuvo distancias de 4.98 Å y 5.20 Å. VAL-68 siguió presentando el único puente de halógeno con el F de la posición 38. La interacción alquil con el C de la posición 40, a una distancia de 4.29 Å. SER-69 mostró el

único puente de H convencional de este acoplamiento con el F de la posición 37, a una distancia de 2.48 Å. 16 residuos presentaron interacciones van der Waals, estando los aromáticos PHE-87, PHE-144, PHE-269, TYR-148, PHE-284, TRP-50 y TYR-133, como predominantes.

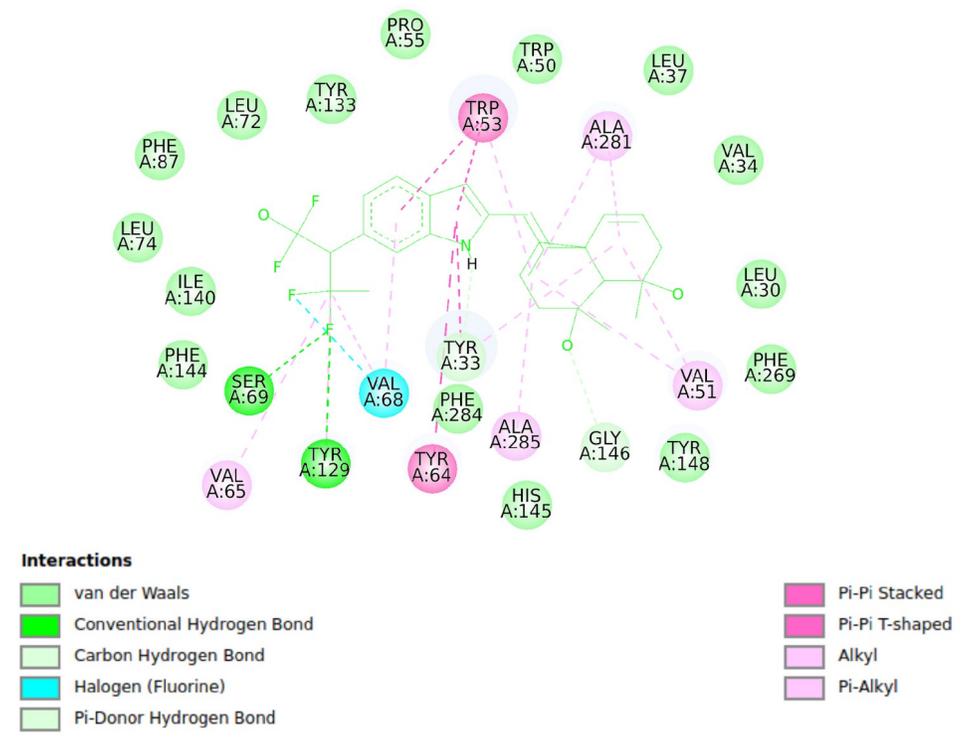


Fig. 28. Mapa de interacciones entre D180 y cadena B.

En el sitio de unión de la cadena C (fig. 29), las interacciones entre TYR-33 y D180 demostraron poca variación, ya que el puente de H  $\pi$ -donante fue de 2.37 Å, el  $\pi$ -alquil de 5,21 Å y el  $\pi$ - $\pi$  T-shaped aconteció a 4.59 Å. Prácticamente el ligando sigue manteniendo la misma conformación que en el resto de los bolsillos analizados, por lo que estas distancias permanecen casi constantes, con muy poca variación. VAL-51 mantiene 2 interacciones  $\pi$ -alquil a 5.19 Å y 4.82 Å con los dos ciclos del hexahidronaftaleno.

La interacción con TRP-53 tipo  $\pi$ -alquil, sucedió a 5.14 Å de distancia, mientras que las  $\pi$ - $\pi$  stacked se formaron a las siguientes distancias: 3.99 Å , 5.19 Å , 3.57 Å y 4.18 Å con el grupo indol. Pero en este acoplamiento se lograron 2 puentes de halógeno, con VAL-65 y VAL-68,

este último de 3.65 Å de distancia, presentando a su vez una interacción alquil a 5.25 Å con uno de los ciclos del hexahidronaftaleno.

Finalmente, SER 69 mostró en este acoplamiento un puente de H convencional, a una distancia de 2.73 Å con el anillo aromático más próximo. El número de residuos responsables de formar interacciones tipo van der Waals fue de 17, presentándose los residuos aromáticos: PHE-144, PHE-87, PHE-269, TYR-148, PHE-284, TRP-50, TYR-64 y TYR-133. Estas interacciones se tornan indispensables para lograr una afinidad mínima en estos sitios de unión. El resto de los residuos favorecen una marcada estabilidad para el acoplamiento, evidenciado por el tipo de interacciones presentes, distancias, así como su número y los grupos funcionales del ligando con los que actúa.

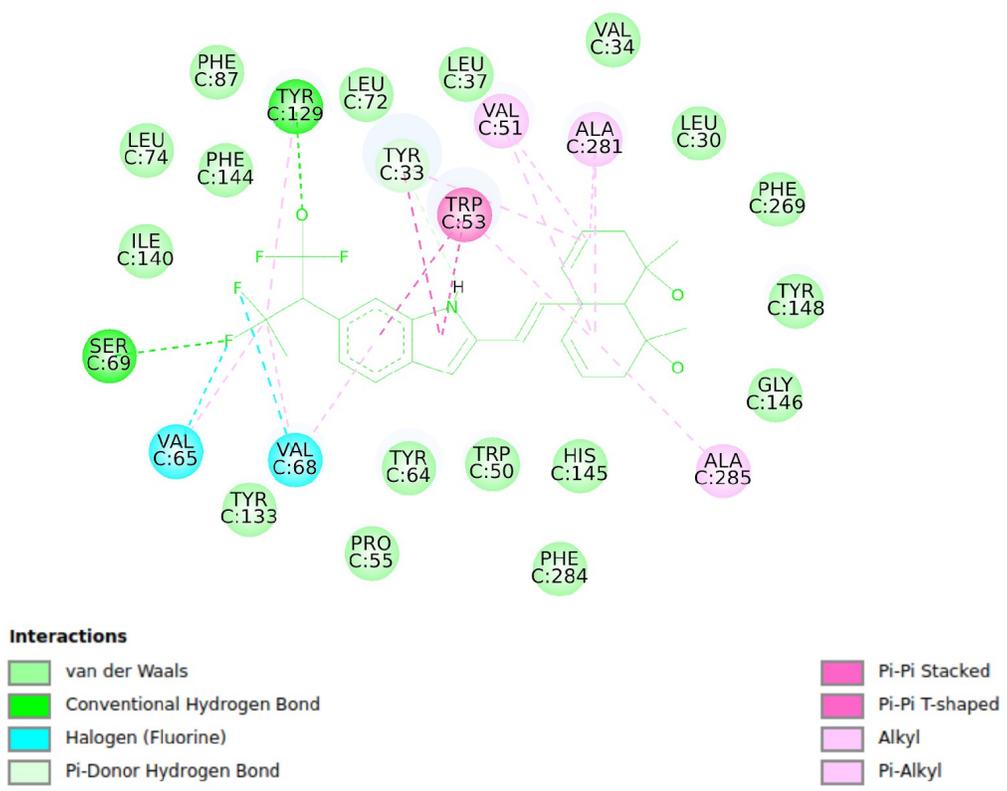


Fig. 29. Mapa de interacciones entre D180 y cadena C.

Las afinidades más altas obtenidas para este ligando se lograron con las cadenas A y B (-13.4 kcal/mol), ello a pesar de la diferencia en el tipo de interacción con TYR-129 de un puente de H convencional en el acoplamiento en A, por su reemplazo en el acoplamiento en B por una interacción  $\pi$ -alquil. Sin embargo, los mismos residuos generan prácticamente las mismas interacciones en los acoplamientos analizados de ambas cadenas (fig. 30), y a distancias muy similares, por lo que su afinidad no se ve alterada negativamente.

El acoplamiento entre D180 y el sitio de unión en la cadena C, fue de -13.2 kcal/mol. La diferencia de 2 décimas puede ser adjudicada a que las interacciones tipo puente C-H con GLY 146 y  $\pi$ - $\pi$  T-shaped con TYR-64 no se generaron, sin embargo, en este acoplamiento, VAL 65 generó un puente de Halógeno. Esta interacción ausente en los otros 2 acoplamientos, ayudó a contrarrestar el impacto de la falta de las 2 interacciones anteriormente descritas, evitando una mayor diferencia en las afinidades generadas.

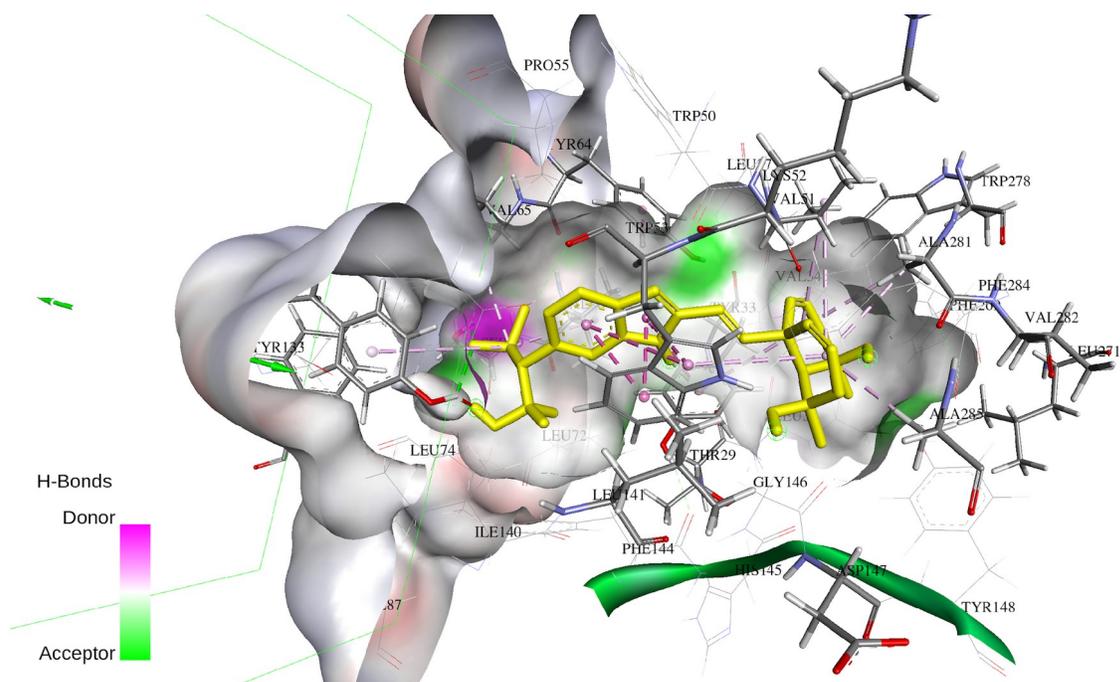


Fig. 30. La mayor aromaticidad presente en el ligando D180, debido al grupo indol, favorece interacciones tipo  $\pi$  hacia la región media de la estructura, lo que aumenta su estabilidad, dada la fuerza implicada en su formación.

## Acoplamiento con D194

El acoplamiento con el ligando D194, efectuado en el bolsillo de unión interno de la cadena A (fig. 31), como es apreciable en la fig. 25, demostró las siguientes distancias con TYR-33: Una interacción  $\pi$ - $\pi$  *stacked* de 4.52 Å de distancia al segundo anillo aromático y una  $\pi$ -alquil también de 4.52 Å al C de la posición 8. TRP-53 mostró 2 interacciones  $\pi$ -alquil a 4.87 Å y 4.88 Å del C de la posición anterior, así como 2 interacciones  $\pi$ - $\pi$  *stacked* de 5.55 Å y 4.14 Å con el primer anillo aromático del ligando. En cuanto a VAL 51, generó una interacción alquil a 4.79 Å con el segundo anillo aromático y otra de 5.07 Å con el C de la posición 26. El residuo PHE-269 mostró una interacción  $\pi$ - $\sigma$  con el C de la posición 26 a 3.83 Å, así como PHE-144 con el C de la posición 17 a 4.09 Å, y otra tipo  $\pi$ -alquil a 4.09 Å. Un total de 13 residuos se encuentran implicados en la formación de fuerzas de van der Waals, identificando los aromáticos PHE-284, TYR-148, TRP-50, PHE-144, TYR-133, PHE-87 y PHE-82.

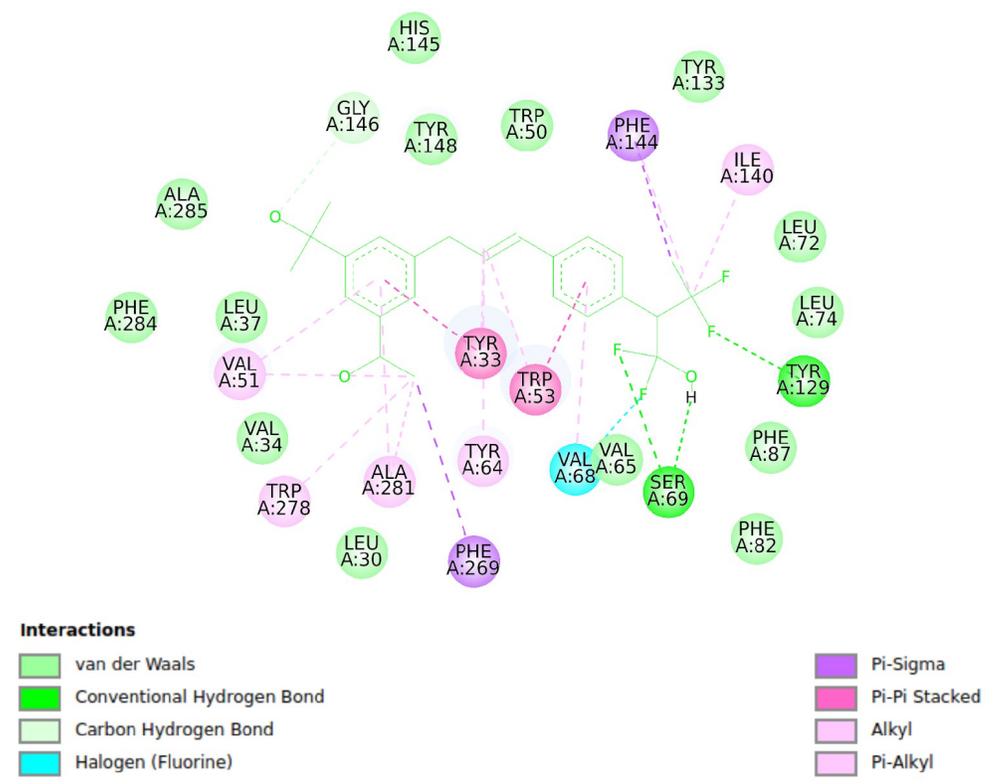


Fig. 31. Mapa de interacciones resultante entre el acoplamiento del ligando D194 y la cadena A del receptor mJHBP.

En el acoplamiento en la cadena B (fig. 32), el residuo TYR-33 mostró una distancia de 4.64 Å, en su interacción  $\pi$ -alquil con el C de la posición 8. Mientras que TRP-53 género 2  $\pi$ -alquil de 4.95 Å y 4.92 Å con el C de la posición 8, 2  $\pi$ - $\pi$  *stacked* de 5.63 Å y 4.21 Å con el primer anillo aromático, así como un puente de H convencional de 2.06 Å con el O2 de la posición 27. En cuanto a VAL-51, mostró una interacción alquil de 5.08 Å con el segundo anillo aromático, y otra  $\pi$ -alquil de 4.48 Å con el C de la posición 25. PHE-144 presentó 2 interacciones, una  $\pi$ -alquil de 4.11 Å, y una  $\pi$ - $\sigma$  de 3.73 Å con el C de la posición 10. Una segunda interacción tipo  $\pi$ - $\sigma$ , se presentó con PHE-269, a una distancia de 3.81 Å, con el C de la posición 26. 16 residuos se encuentran implicados en la formación de interacciones van der Waals en este acoplamiento, destacando por proximidad TYR-133, LEU-72, LEU-74, TYR-129 y GLY-146.

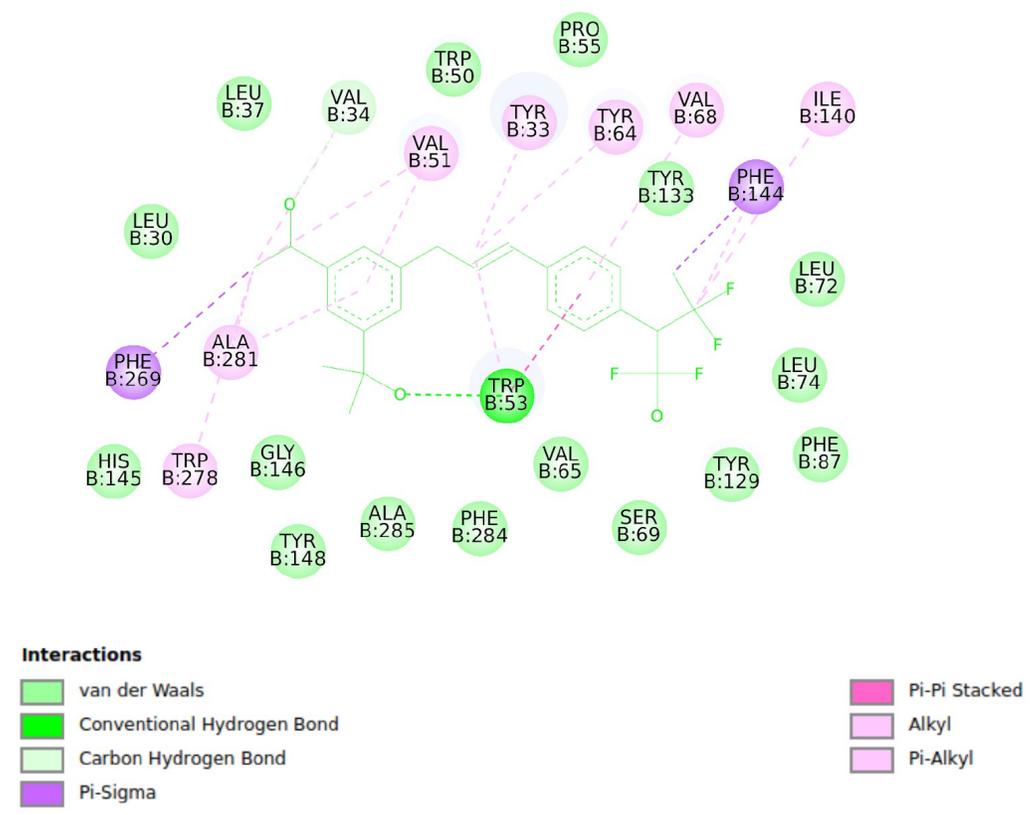


Fig. 32. Mapa de interacciones entre D194 y cadena B.

Por último, el acoplamiento en el sitio de unión en la cadena C (fig. 33), TYR-33 generó una interacción  $\pi$ -alquil de 4.61 Å de distancia, mientras que en este caso, TRP-53 presentó 2 tipo  $\pi$ - $\pi$  *stacked* a una distancia de 5.66 Å y 4.22 Å. En el caso de VAL-51, se presentó un puente de H convencional con el H enlazado al O2 de la posición 31 y una interacción  $\pi$ -alquil de 4.57 Å con el segundo anillo aromático. PHE-144 generó una interacción  $\pi$ - $\sigma$  de 4.10 Å, con el C de la posición 17, y otra tipo  $\pi$ -alquil de 3.71 Å, con el C de la posición 10. Finalmente, PHE-269 mostró una interacción  $\pi$ - $\sigma$  a 3.79 Å, con el C de la posición 26. Un conjunto de 17 residuos, donde destacan TYR-148, ALA-285, LEU-72, LEU-74 y VAL-65, conforman los responsables de las interacciones van der Waals en este acoplamiento.

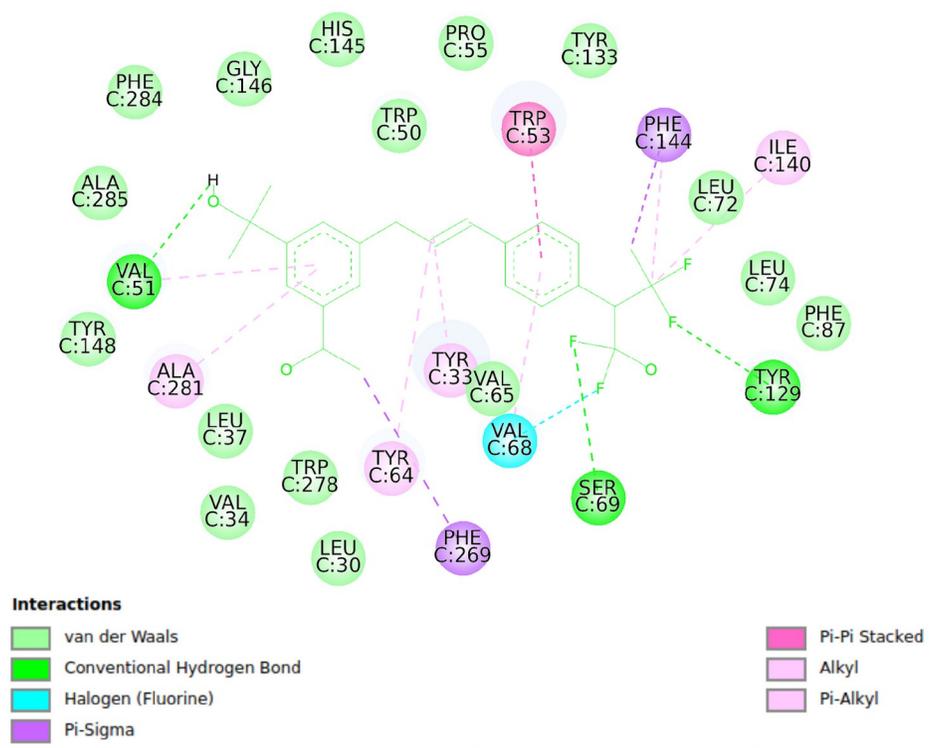


Fig. 33. Mapa de interacciones entre D194 y cadena C.

Las afinidades mostradas entre los acoplamiento con D194, evidenciaron muy poca variación, tomando el sitio de unión A como referencia (fig. 34), los puentes de H convencional con SER-69 y TYR-129, no se lograron en el acoplamiento en B, estos residuos quedaron relegados a interacciones tipo van der Waals. Sin embargo, presentó interacciones tipo alquil y  $\pi$ -alquil con TYR-33, VAL-68, que en A corresponden al tipo  $\pi$ - $\pi$  *stacked*. También el puente de halógeno con VAL-68, no se logró formar, dado que el residuo más próximo para generar dicha interacción es VAL-65, pero se encuentra a mayor distancia.

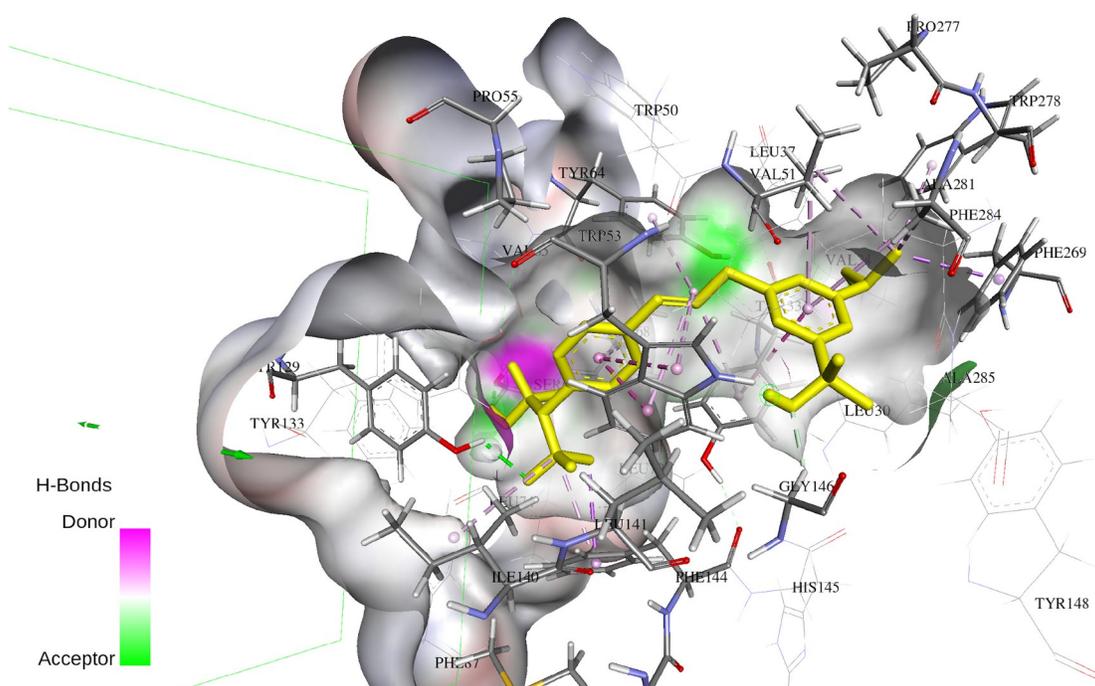


Fig 34. El ligando D194 mostró una conformación más armoniosa acorde con la geometría de la cavidad en la cadena A, lo que facilitó la cercanía hacia los residuos con los cuales presentó interacciones.

En cuanto a C, en VAL-51 la interacción tipo alquil es reemplazada por un puente de H convencional, y en TYR-33 y TRP-53, las interacciones  $\pi$ - $\pi$  *stacked* y  $\pi$  alquil, no lograron formarse debido a una mayor distancia entre ambas superficies moleculares para con estos residuos. El puente C-H desarrollado por GLY-146 y VAL-34 en las cadenas A y B respectivamente, no se logró en este acoplamiento. Aun así, la afinidad global no disminuyó drásticamente (-12.7) a comparación de A (-12.8), pero se mantuvo una décima arriba de B (-12.6).

Evidentemente, las diferencias en el volumen de cada uno de los bolsillos de unión internos en las 3 cadenas son consecuencia de la protrusión de algunos residuos de mayor incidencia hacia adentro o fuera de dicha cavidad, modificando su topología, como lo observado en la fig. 9. Con ello, también las distancias y cambios en la conformación del ligando acoplado, alterando en consecuencia, las interacciones a generarse (figs. 26, 30 y 34 ). Sin embargo, es obvio que persisten cierto tipo de interacciones, resultado de la posición y distancia constantes en la periferia del ligando acoplado dentro de la cavidad.

La disposición espacial ordenada en el acoplamiento ligando-sitio de unión, resultantes de las interacciones intermoleculares, que favorecen un acoplamiento instantáneo-dependiente de fuerzas Van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, etc; varió entre cadenas para con un mismo ligando, y evidentemente entre ligandos. Pero obviamente, se manifestó cierto patrón a considerar para el tipo de interacciones obtenidas y los grupos del ligando interactuante.

En cuanto al segmento hidrófobo de la cadena principal, se fomentaron interacciones dirigidas a esta región (sobre todo puentes de H, alquil y  $\pi$ -alquil), estos últimos, debido a la presencia de enlaces dobles mayormente energéticos, los cuales se inducen sustancialmente desde la nube  $\pi$  de las tirosinas más cercanas (dependiendo del ligando experimental acoplado) principalmente; y los átomos más próximos implicados en el doble enlace, dadas las diferencias en la magnitud de la energía de dispersión generada por la disparidad de cargas. Esto actuó como factor discriminante a considerar para el desarrollo de las subsecuentes estructuras derivadas, tomado como rasgo de importancia estructural.

Gracias a la adición de átomos de F en los extremos de cada estructura se lograron generar puentes de halógeno con el O enlazado de los residuos Val-65 (D145 y D194) y Val-68 (D180) con alta frecuencia. Ello de la forma más racional posible, pues su correcta disposición favoreció un aumento en la estabilidad y afinidad entre los ligandos diseñados y los residuos de cadena lateral apolar más próximos según la conformación de estas estructuras dentro del bolsillo de unión (Hosny & Sherif, 2020; Metrangolo *et al.*, 2007 y Metrangolo & Resnati, 2008),

También, debido a la formación de puentes de H favorecidos por la electronegatividad de los F en los respectivos sustituyentes, se pudo generar una mayor atracción entre las superficies, resultado de diferencias en el potencial de carga promovido en cada acoplamiento (Das *et al.*, 2021 y Grabowski, 2006).

En el caso de los anillos aromáticos, las interacciones tipo  $\pi$ - $\sigma$ ,  $\pi$ - $\pi$  *stacked* y  $\pi$ - $\pi$  *T-shaped*, con los residuos de cadena lateral aromática más próximos, fueron los implicados en las formaciones de estas interacciones consideradas de gran importancia, dado que aumentan las puntuaciones tras cada acoplamiento donde se logren estas. También frecuentemente los residuos apolares se encontraron implicados en la generación de puentes C-H, y tirosinas en la formación de puentes de H  $\pi$  donantes.

### **Evaluación ADME y predicción de toxicidad de las estructuras generadas**

Cada una de las estructuras diseñadas fueron sometidas a análisis predictivos *in silico* de farmacocinética y toxicidad, posterior a cada acoplamiento, mediante el uso de las *webtools* descritas en el procedimiento, luego se seleccionaron aquellas estructuras que expresaron una mayor afinidad y estabilidad en cada acoplamiento analizado, siendo estos los resultados que se presentan (Tabla 1). En cuanto al análisis con Swiss ADME, para el criterio de lipofilicidad se tomó Log Po/w (XLOGP) como indicador principal (cuyo rango óptimo es -0,7 y +5,0), aunque 2 estructuras se acercan demasiado al límite superior, D145 presenta un valor algo más permisible (4.57), mientras que D180 lo sobrepasa por 0.07 décimas.

El peso molecular para estas 3 estructuras se encuentra por debajo de los rangos permisibles de 150-500 g/mol, por lo que sí cumplen satisfactoriamente este criterio, aunque todos superan los 400 g/mol (D180 presentó un valor a 20.49 g/mol del límite permitido, siendo la más próxima). En cuanto al área de superficie polar, con rangos de 20-130 Å<sup>2</sup>, las presentes estructuras mostraron valores entre 50 y 80 Å<sup>2</sup>, cumpliendo con ello, sin embargo; D194 es quien menos se desvía del valor medio por 4.31 Å<sup>2</sup>, le sigue D145 con 7.47 Å<sup>2</sup>, y por último D180 con 11.48 Å<sup>2</sup>. Para cuantificar la solubilidad, se utilizó Log S (ESOL) como indicador, con valores no mayores a 6. Las 3 presentan insolubilidades relativamente altas, estando D180 prácticamente en el límite permisible (-5.87), mientras que D145 es la más alejada (-5.11). En el caso de la fracción de carbonos en la hibridación sp<sup>3</sup>, que admite valores de 0.25 a 1, D180 y D194 están muy cercanos a el valor medio, sólo D145 se aleja por un valor de 0.32.

Su flexibilidad, expresada en un número menor a los 9 enlaces rotables, D194 presenta un valor más cercano al límite superior, seguido por D145. No obstante, D180 fue quien presentó un valor más cercano al valor medio. Ninguna de los 3 ligandos presenta permeabilidad a la barrera hematoencefálica, pero D145 y D194 presentaron absorción gastrointestinal alta. Los 3 ligandos son reconocidos por glicoproteínas P, por lo que teóricamente, son excretadas activamente del sistema nervioso central. También se cuantificó la probabilidad de inhibición a miembros de la superfamilia citocromo p450 (CIP), mostrando mayor afinidad D194 (CYP1A2, CYP2D6 y CYP3A4). D145 mostró menor afinidad, excepto por CYP1A2 y CYP3A4, mientras que D180, sólo presentó afinidad a CYP3A4.

La similitud a fármaco de cada compuesto también fue registrada. Ello ya que las reglas aplicadas pueden actuar como parámetros de orientación para la exclusión de estructuras demasiado tóxicas para organismos no objetivo, considerando la posible afección a seres humanos. Para este caso D145 y D194 mostraron un menor número de violaciones, exceptuando D180. Se toma en cuenta que estos 2 ligandos son estructuralmente más afines a la estructura líder diseñada. Igualmente se consideró el criterio de compuestos de interferencia de ensayo panorámico (PAINS). Fue de 0 para estas 3 estructuras filtradas, lo que muestra que al parecer no tiende a interactuar con receptores no objetivo (compuestos no promiscuos).

Empero, D180 Y D145 presentaron una violación al índice de Brenck por la presencia de un alqueno y estilbeno parte del andamio básico. Solo D194 pasó satisfactoriamente esta regla. Aun así, para el criterio de leadlikeness (compuestos con características estructurales mínimas para derivar en mejores ligandos de mayor especificidad), D145 y D180 mostraron las mismas faltas, peso molecular superiora 350 g/mol y un criterio de lipofilicidad (XLOGP3) mayor a 3.5. Para D194 fueron los 2 anteriores más un número de rotores mayor a 7. El análisis también generó un valor de aproximación sobre la probabilidad de sintetizabilidad de los compuestos teóricos sometidos, siendo de 1 (fácil) a 10 (muy difícil). Técnicamente estas 3 estructuras mostraron valores medios, pero D145 parece ser una estructura más factible en este rubro (Daina et al., 2017).

Tabla 1. Resultados del análisis ADME.

Ligandos	D145	D180	D194
Propiedades fisicoquímicas			
Fórmula	C22H22F4O3	C26H29F4NO3	C22H22F6O3
Peso molecular	410.0 g/mol	479.51 g/mol	448.40 g/mol
N.º átomos pesados	29	34	31
N.º arom. Átomos pesados	12	9	12
Fracción Csp3	0.32	0.46	0.36
N.º de rotámeros	7	5	8
N.º de aceptores de H	7	7	9
N.º de donadores de H	2	4	3
Refractividad molar	103.77	123.87	103.7
TPSA	57.53 Å²	76.48 Å²	60.69 Å²
Lipofiliicidad			
Log Po/w (LOGP)	3.41	3.49	3.63
Log Po/w (XLOGP3)	4.57	5.07	5.03
Log Po/w (MLOGP)	6.58	7.1	7.34
Log Po/w (MLOGP)	3.69	3.53	4.24
Log Po/w (SILICOS-IT)	6.06	5.5	6.21
Log Po/w consenso	4.86	4.94	5.29
Hidrosolubilidad			
Log S (ESOL)	-5.11	-5.87	-5.55
Solubilidad	3.20e-03 mg/ml ; 7.80e-06 mol/l	6.42e-04 mg/ml ; 1.34e-06 mol/l	1.27e-03 mg/ml ; 2.84e-06 mol/l
Clase			
	Moderadamente soluble	Moderadamente soluble	Moderadamente soluble
Log S (All)	-5.5	-6.42	-6.05
Solubilidad	1.29e-03 mg/ml ; 3.15e-06 mol/l	1.89e-04 mg/ml ; 3.82e-07 mol/l	4.04e-04 mg/ml ; 9.01e-07 mol/l
Clase			
	Moderadamente soluble	Pobremente soluble	Pobremente soluble
Log S (SILICOS-IT)	-6.19	-5.49	-6.025
Solubilidad	2.66e-04 mg/ml ; 6.47e-07 mol/l	1.54e-03 mg/ml ; 3.22e-06 mol/l	4.04e-04 mg/ml ; 9.01e-07 mol/l
Clase			
	Pobremente soluble	Moderadamente soluble	Pobremente soluble

<b>Farmacocinética</b>			
Absorción Gastrointestinal (GI)	Alta	Baja	Baja
Permeabilidad Barrera hematoencefálica (BBB)	No	No	No
P-gp substrato	Si	Si	Si
Inhibidor CYP1A2	Si	No	Si
Inhibidor CYP2C19	No	No	No
Inhibidor CYP2C9	No	No	No
Inhibidor CYP2D6	No	No	Si
Inhibidor CYP3A4	Si	Si	Si
Log Kp (Permeabilidad cutánea)	-5.56 cm/s	-5.63 cm/s	-5.46 cm/s
<b>Drogabilidad</b>			
Lipinski	Si, 0 violaciones	Si, 0 violaciones	Si, 1 violación: MLOGP>4.15
Ciase	No, 1 violación: WLOGP>5.6	No, 1 violación: WLOGP>5.6	No, 1 violación: WLOGP>5.6
Veber	Si	Si	Si
Egan	No, 1 violación: WLOGP>5.88	No, 1 violación: WLOGP>5.88	No, 1 violación: WLOGP>5.88
Muegge	Si	No, 1 violación: XLOGP>5	No, 1 violación: XLOGP>5
Puntuación de bioabilidad	0.55	0.55	0.55
<b>Química medica</b>			
PAINS	0 Alertas	0 Alertas	0 Alertas
Brenk	1 Alerta: Estilbenos	1 Alerta: 1 alqueno aislado	0 Alertas
Leadlikeness	No, 2 violaciones: MM>350, XLOGP>3-3.5	No, 2 violaciones: MM>350, XLOGP>3-3.5	No, 3 violaciones: MM>350, Rotores>7, XLOGP>3-3.5
Sintetizabilidad	3.78	4.97	4.3

La información generada por el servidor web consultado Swiss ADME, para los 3 ligandos de mayor afinidad y estabilidad obtenidos, demuestra su farmacocinética y características fisicoquímicas de importancia.

La estimación de toxicidad llevado a cabo con el servidor web ProTox II (tabla 2), mostró que D180 y D194 poseen actividad teórica inmunotóxica e inhibidora de proteínas implicadas en el potencial de membrana mitocondrial, en ese orden. Con una probabilidad bastante alta en D180 y media en D194. Aunque D145 se muestra inactivo para los objetivos analizados, la predicción del valor LD50 de cada ligando, mostró obvia peligrosidad a relativamente bajas concentraciones.

Para D145 fue de 1600 mg/kg, por lo que se le considera nocivo por ingestión (clase 4). A manera de ejemplo, para generar toxicidad en un individuo de 65 kg, se requeriría la administración de 104 gramos. Cuestión que considerar para una posible toxina de dispersión aérea. En el ligando D194, el valor fue de 500 mg/kg, también considerado nocivo por ingestión (clase 4). Para teorizar el grado de toxicidad, se requeriría de 32.5 gramos para generar toxicidad en un individuo del mismo peso. En el caso de D180, mostró una concentración de LD50: 4mg/kg, lo que le cataloga como fatal en clase de ingestión (clase 1), 0.26 gramos serían fatales en un sujeto de 65 kg.

Tabla 2. Resultados de actividad toxicológica

Estructura	D145		D180		D194	
OBJETIVO	PREDICCIÓN	PROBABILIDAD	PREDICCIÓN	PROBABILIDAD	PREDICCIÓN	PROBABILIDAD
Hepatotóxico	Inactivo	0.57	Inactivo	0.6	Inactivo	0.71
Carcinogénico	Inactivo	0.66	Inactivo	0.62	Inactivo	0.68
Inmunotóxico	Inactivo	0.88	Activo	0.81	Inactivo	0.94
Mutagénico	Inactivo	0.83	Inactivo	0.62	Inactivo	0.8
Citotóxico	Inactivo	0.78	Inactivo	0.73	Inactivo	0.81
Receptor Ail hidrocarbónico	Inactivo	0.82	Inactivo	0.72	Inactivo	0.84
Receptor andrógeno	Inactivo	0.97	Inactivo	0.89	Inactivo	0.97
Receptor androgénico con dominio de unión a ligando	Inactivo	0.96	Inactivo	0.88	Inactivo	0.97
Aromatasa	Inactivo	0.84	Inactivo	0.71	Inactivo	0.84
Receptor estrogénico alfa	Inactivo	0.67	Inactivo	0.74	Inactivo	0.64
Receptor estrogénico con dominio de unión a ligando	Inactivo	0.77	Inactivo	0.9	Inactivo	0.79
Receptor gamma activador de proliferación de peroxisomas	Inactivo	0.84	Inactivo	0.89	Inactivo	0.85
Factor nuclear/elementos de respuesta antioxidantes	Inactivo	0.87	Inactivo	0.88	Inactivo	0.83
Elementos de respuesta a shock térmico	Inactivo	0.87	Inactivo	0.88	Inactivo	0.83
Potencial de membrana mitocondrial	Inactivo	0.5	Inactivo	0.52	Activo	0.58
PS3 (Supresor tumoral)	Inactivo	0.72	Inactivo	0.75	Inactivo	0.66
Dominio AAA de TAD5, familia ATPasa	Inactivo	0.94	Inactivo	0.91	Inactivo	0.96

Se resumen los productos de las evaluaciones toxicológicas in silico de las estructuras experimentales D145, D180 y D194. El tipo de toxicidad está dividido en clases, determinado por el sistema GHS (sistema globalmente armonizado de clasificación de etiquetado de productos químicos) (Banerjee *et al*; 2018)

## Acoplamiento molecular de control

Para corroborar la posible afinidad a proteínas no objetivo expresadas por otros organismos, en concreto con insectos y su posible toxicidad en humanos, se eligieron estructuras proteicas obtenidas del PDB, procedentes de 2 polillas de especies distintas y 3 expresadas en humanos. En el caso de las polillas, las proteínas 2RQF y 2RCK funcionan como transportadoras de hormonas JH, por lo que se esperaría cierta afinidad a los ligandos diseñados concretamente para el sitio de unión de 5V13. Sin embargo, no fue el caso, puesto que ninguno de los 3 ligandos acoplados generó una afinidad superior a  $-9$  kcal/mol, es decir, no superaron el umbral de afinidad biológica para con el ligando natural (tabla 3). Aun así, D194 obtuvo la afinidad más elevada para estos acoplamientos, de  $-8.5$  kcal/mol con 2RQF. No obstante, teóricamente no podrían competir con dichas hormonas, de tal forma que puedan llegar a presentar actividad tóxica. En el caso de las estructuras humanas: 2OBD, 4EWS y 1BP1, que reconocen ligandos hidrófobos, con rasgos estructurales relativamente similares a esta hormona; los acoplamientos generados obtuvieron valores de afinidad más altos.

Ello debido a que algunos de sus bolsillos de unión son más grandes (Estas 3 estructuras poseen secuencias aminoacídicas casi el doble de largas que la correspondiente para 5V13), lo que permite un número mayor de interacciones y cambios conformacionales por parte de los ligandos acoplados en cuestión, dentro de dichos bolsillos. Además, los bolsillos de estas proteínas de prueba poseen residuos similares que permiten conformar el sitio de unión, reconocer e interactuar concretamente con ligandos de característica hidrofóbica. El valor más alto fue de  $-10.9$  en el primer sitio de unión identificado, entre el ligando D194 y el receptor 1BP1.

Aunque la morfogeometría espacial entre los sitios de unión de las 3 cadenas conformantes del receptor mJHBP exhiben variaciones, el bolsillo de unión está constituido en los 3 casos por los mismos residuos, por lo que las interacciones en estos acoplamientos con la hormona JH III-10R son constantes. En su mayoría de cadena lateral aromática, destacando 2 por las interacciones desarrolladas: TYR-129, que forma un puente de H convencional con el O de la posición 16 y TRP-53, el cual genera 5 interacciones con distintos átomos del ligando en cuestión. Ambos residuos importantes para la estabilidad del acoplamiento, ya

que el resto conllevan sólo interacciones de menor energía y van der Waals (Kim *et al.*, 2017).

Tabla 3. Resultados de los acoplamientos moleculares de control por ligando

Ligando/ Objetivo	20BD	4EWS	1BP1	2RQF	2RCK	5V13
Cadenas	A y B	A y B	A, con 2 sitios	A	A y B	A
D145	1: -9; 2: -9.8 kcal/mol	1: -9.1; 2: -8.8 kcal/mol	1: -10.5; 2: -9.6 kcal/mol	1: -5.8 kcal/mol	1: -6; 2: -6.1 kcal/mol	-12 kcal/mol
D180	1: -10.4; 2: -9.9 kcal/mol	1: -10.6; 2: -10 kcal/mol	1: -9.9; 2: -10 kcal/mol	1: -5.9 kcal/mol	1: -6.5; 2: -6.5 kcal/mol	-13.4 kcal/mol
D194	1: -9.1; 2: -10.2 kcal/mol	1: -9.3; -10.3 kcal/mol	1: -10.9; 2: -10.3 kcal/mol	1: -8.5 kcal/mol	1: -6.7; 2: -7 kcal/mol	-12.8 kcal/mol

Para ello, solo se consideró la cadena A de cada uno. Todos mostraron 2 sitios de unión probables, excepto 2RQF. Los resultados se contrastan con los generados en mJHBP (5V13).

A partir de las interacciones entre cada átomo de la JH III10-R y de los residuos conformantes del bolsillo de unión, se pudo resolver junto con los visualizadores moleculares, la distribución de los puntos de anotación y cada rasgo haptofórico generado a partir de esta hormona, con miras al desarrollo de un farmacóforo funcional. Con ello, la posibilidad de optimizar dichos rasgos, para favorecer el desarrollo de un mayor número de interacciones con los residuos del bolsillo. Evidentemente dichas modificaciones resultaron en la generación de un farmacóforo cuya distribución espacial de rasgos, permitió la creación de una estructura líder, con los requisitos necesarios para derivar en estructuras de afinidad superior a comparación del ligando natural (Abdolmaleki, Shiri, & Ghasemi, 2019). Sin embargo, dichas nuevas estructuras tuvieron que ser modificadas en cuanto a la posición y orden de átomos de los sustituyentes, ello pues al elegir los conformeros más estables, la afinidad tras los acoplamientos se veían drásticamente afectada de forma negativa. Lo anterior debido a que las distancias incrementaban entre los sustituyentes de los ligandos diseñados y los residuos objetivo, dificultando el desarrollo de interacciones estables.

Conforme se fueron diseñando estructuras nuevas, se fueron obteniendo identidades moleculares con mejores puntuaciones. Esto generó que algunas estructuras tuviesen una configuración distinta entre sí y para con el farmacóforo del cual derivaron. Aun así, es reconocible un patrón básico, el cual es especialmente evidente por la ubicación de los anillos aromáticos y la longitud de la cadena principal, así como la ubicación de los sustituyentes portadores de átomos electronegativos. Entendido esto, las estructuras D145, D180 y D194 son diseños específicos para el receptor mJHBP y por tanto, diseños nuevos.

Durante la planeación de los acoplamientos, hay que considerar que las interacciones desfavorables o afinidades relativamente bajas, no implican necesariamente incompetencia como inhibidor de una proteína específica. Lo anterior ya que la flexibilidad y por tanto, los leves cambios conformacionales que pueden experimentar los motivos estructurales implicados en la formación del sitio de unión, no son tomados en cuenta como tal durante los acoplamientos efectuados (Wheeler & Bloom, 2014). Esto, debido a que Autodock Vina realiza

acoplamiento semirrígido, es decir, toma al ligando como flexible, no así a la proteína en su totalidad, ni a los dominios implicados.

Sin embargo, se pueden considerar ciertos residuos interactuantes durante el acoplamiento, con miras a mejorar la puntuación (Abreu *et al.*, 2012). La dinamicidad en cuanto a cambios conformacionales es dirigida hacia el ligando y en algunos casos, hacia las cadenas laterales de los residuos interactuantes más cercanos. Estos modelos teóricos se deben tomar como aproximaciones, ya que, en condiciones biológicas reales, el bolsillo de unión interno presenta alta dinamicidad con el ligando acoplado, debido a los constantes subestados globales que exhibe la proteína receptora.

Además, hay que atender que el *software* usado para los acoplamientos podría no generar interacciones correctas, debido a un muestreo conformacional escaso, o no llegar a la puntuación más alta posible para ese sitio de unión concreto. Incluso es plausible que la estructura teórica generada, posea una modalidad de acción inesperada (Schwede & Peitsch, 2009).

No se consideró realizar acoplamiento con moléculas de agua, ya que su presencia podría disminuir el volumen interno de la cavidad de interés, y por tanto; afectar negativamente la entrada o el acoplamiento con los ligandos de diseño, al actuar como un obstáculo o desviar interacciones desestabilizando la unión. También interferiría en el diseño estructural del ligando, al restringir teóricamente su tamaño a menos átomos, por el volumen ocupado. A pesar de ello, evidentemente al tratarse de una proteína transportadora que se mueve en un ambiente molecular altamente acuoso, los acoplamientos teóricos con los ligandos diseñados podrían presentar variaciones en el tipo y número de interacciones y por tanto; en sus afinidades (Kim *et al.*, 2017).

Sin embargo, el diseño estructural básico de los ligandos derivados, pudo pasar el umbral de discriminación por parte de la distribución de cargas de la superficie de la cavidad interna. Ya que la cadena carbonada mantuvo a distancia admisible los anillos aromáticos enlazados a los sustituyentes con átomos fuertemente electronegativos, lo que dispuso estas cargas en extremos parcialmente opuestos, para dejar un centro apolar, similar a la hormona JH III-10R (Jablonka *et al.*, 2019). Indudablemente la distribución e intensidad de las cargas,

dirigidas a buscar interacciones puntuales con las valinas presentes, así como los triptófanos a proximidad con los anillos aromáticos y puentes de H estando en el acoplamiento, mantuvo relativamente una afinidad mayor al umbral biológico estimado entre este receptor y la mJHBP.

Las interacciones generadas entre los anillos aromáticos de las cadenas laterales de estos residuos y los 2 anillos presentes en la estructura líder derivada del farmacóforo, contribuyeron a aumentar la afinidad mutua entre las estructuras diseñadas y los residuos de interés. Esto dado que en sistemas moleculares envueltos en contextos biológicos, las consecuencias mostradas por interacciones  $\pi$  conllevan un aumento en la entalpía de unión entre las moléculas interactuantes (Pickett, 2006).

Es por ello que, suelen existir residuos aromáticos concatenados en posiciones específicas, integrantes de los motivos estructurales proteicos implicados en la formación de sitios de unión a ligandos. Es decir, los sistemas generados por interacciones tipo  $\pi$ , favorecen reconocimientos y ensamblajes supramoleculares entre las superficies de los participantes, consecuencia de las interacciones no covalentes altamente afines con los distintos grupos funcionales presentes en un ligando o grupo concreto de ligandos reconocidos en los bolsillos de unión (Böhn, 2006 y Makwanan & Mahalakshmi, 2015).

Concretamente, con los acoplamiento con D145, D180 y D194, se buscó y se logró generar interacciones los mas frecuente posible con los resoduos: TYR-33, VAL-51, TRP-53, VAL-68, PHE-144, TYR-148 y ALA-281. Cuyas cadenas laterales fueron capaces de entablar las interacciones de estabilidad buscadas (puente de H convencional, puentes C-H, puentes de halógeno, interacciones  $\pi$  y  $\sigma$ ) para maximizar la afinidad entre estos y el receptor, superando el umbral de afinidad -9 kcal/mol de la hormona JhIII-10R. Sin embargo, dada las diferentes conformaciones, ordenamiento de los átomos, distribución de cargas, etc; el tipo de interacciones con estos residuos no fue siempre el mismo número y tipo. Ello ya que las diferentes posturas de los ligandos, cambiaban su orientación espacial a tal grado que, estos no podían interactuar a la misma distancia y orientación con estos (Kneuer *et al.*, 2018). Aun así, si se generaron interacciones constantes con los residuos ya mencionados en cada acoplamiento.

La información sobre la farmacocinética de un compuesto, es importante de considerar al permitir a partir de este, inferir los riesgos relativos que

implican para la salud de distintos organismos, incluido el ser humano; el uso o contacto con estos. Los posibles efectos negativos que podría conllevar el uso o aplicación de un compuesto dado, viene de la función de su concentración en su posible forma bioactiva para con un receptor en el cual desencadena algún efecto. Considerado esto, la duración y el nivel de intensidad de la respuesta tóxica dependen de la concentración de la fracción bioactiva que interactúe con dicho receptor o sistema, así como su tiempo de permanencia (Aliferis & Jabaj, 2011). Por ello, la aplicación de estimadores *in silico* permite evaluar la dinámica en su distribución, interacciones con receptores proteicos considerados prioritarios, etc. expresados en organismos comúnmente usados como control y en el ser humano, de nuevos compuestos químicos diseñados. Esto con el fin de generar resultados que puedan avalar o rechazar su consideración en un estudio, o incluso su síntesis (Daina *et al.*, 2017 y Kneuer *et al.*, 2018).

El uso del servidor web Swiss ADME para este caso, buscó la aplicación de modelos predictivos concretos y robustos para propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y su similitud con compuestos farmacológicos aceptados o de reportada toxicidad, lo que brinda parámetros teóricos sobre su posible comportamiento y reactividad para con un sistema biológico. Las 3 vías básicas de exposición a tóxicos como pesticidas, suelen ser dérmica, por ingestión e inhalación.

En la piel humana, el estrato córneo esta constituido por células epiteliales altamente unidas y cubiertas por una capa sebosa. Por ello, para predecir la posible absorción cutánea de compuestos tóxicos, se utiliza el valor  $\log K_p$ , el cual define la tasa de penetración a través del estrato córneo de un determinado compuesto. Entre más negativo es el valor, menor permeabilidad tendrá. Como se observa en la tabla 1, las 3 estructuras poseen un valor entre -5.4 y -5.6 por consiguiente, de relativamente poca absorción cutánea (de -7 a 0). Destacando que D194 posee un valor de -5.46 cm/s, siendo este el más bajo. El resto de estimadores usados por el servidor, los coloca en rangos equivalentes (Brand & Mueller, 2002; Daina *et al.*, 2017 y Burli *et al.*, 2020).

No obstante, para declarar el grado de absorción cutánea en un contexto real, se suelen utilizar roedores para su evaluación, pero se debe tomar en cuenta que la piel de los roedores suele ser más permeable a diversos xenobióticos que la piel humana (Poet, 2000).

El ingreso gastrointestinal de esta clase de compuestos a través del tracto, es común en contaminantes presentes en agua y alimentos. Las propiedades físico químicas de estos compuestos condicionan su absorción por el epitelio gastrointestinal, dependientes de las variables que el medio pueda presentar. Cabe recalcar que el intestino delgado, dada su superficie de absorción y sus componentes superficiales, suele experimentar absorción con alta frecuencia de tóxicos ingeridos (Zhao *et al.*, 2021). En este rubro, el valor de absorción gastrointestinal (GI) fue baja para todas excepto D145, que fue alta.

Ya sea a través del epitelio intestinal o respiratorio, el compuesto incorporado en el torrente sanguíneo, se distribuye por todo el organismo, por lo que se debe considerar también que su capacidad de distribución en el sistema circulatorio esta dada por la tasa de perfusión, y por la tasa a la que estos compuestos salen de dicho sistema. Aunque algunos compuestos tóxicos tienen gran capacidad de unión a proteínas plasmáticas, por lo que la unión a estas proteínas impide su salida del torrente sanguíneo, dificultando seriamente la capacidad de expulsión o eliminación (Fu *et al.*, 2018). Este acoplamiento factiblemente puede llegar a neutralizar su actividad tóxica, pero pueden volverse acumulativos y podrían extender sus efectos adversos a lo largo del tiempo (Dixit, Ahsan & Khan, 2021).

En cuanto a los compuestos lipofílicos, estos suelen ser bioacumulados en tejido adiposo, de donde son liberados lenta y progresivamente. Los valores arrojados por el Índice de lipofilidad XLOGP3. Mostró que D145 tiene un valor por debajo del límite  $4.57 < 5$  permisible. Aun así, estos 3 ligandos se consideran lipofílicos, por consiguiente, es muy probable que sea depositado y acumulado en tejido adiposo. Pero referente a su hidrosolubilidad, los valores de Log s (ESOL) fueron relativamente bajos, sobre todo para D180 (-5.87), por lo que su flujo a través de tejidos internos podría ser lento (Delaney, 2004).

Dados los valores presentados en la tabla 1, se infiere que los ligandos diseñados tendrían mayor probabilidad de absorción epitelial a través de ingesta o inhalación, según lo precedido para organismos experimentales o humanos, por lo que si poseen absorción y distribución. Empero, estas estructuras son reconocidas según los estimadores, por enzimas CIP, así como glicoproteínas P, por ende; metabolizadas y expulsadas (Daina *et al.*, 2017).

A pesar de los valores arrojados, se ha demostrado que experimentalmente, los análisis *in silico* pueden fallar al representar los resultados, a pesar de los reajustes en los cálculos, pues se basan en supuestos. No obstante, estas reglas de filtrado son un apoyo útil para la evaluación predictiva de riesgos al anteponerse a ensayos *in vitro* o en sistemas biológicos y (Eleftheriadou *et al.*, 2019 y Kneuer *et al.*, 2018).

Con el servidor de Pro Tox II, se buscó obtener la probabilidad de afección a receptores específicos prioritarios, así como el posible tipo de toxicidad de las 3 estructuras presentadas, mediante aplicación de algoritmos de aprendizaje automático; los cuales analizan, buscan y comparan simultáneamente en múltiples bases de datos, la identidad total de la molécula y fragmentos de las mismas, contra otras ya existentes. Posteriormente, desarrolla clasificaciones optimizadas para cada estructura en particular, mediante el uso de huellas dactilares moleculares y de Morgan. Seguidamente, ejecuta un sobremuestreo en el cual, selecciona y comprueba las similitudes halladas para completar el modelo de predicción. Básicamente, este método se basa en la comparación de fragmentos para la identificación de alertas estructurales implicadas en determinadas consecuencias biológicas, con bases de datos categorizadas en patrones estructurales según su bioactividad reportada. (Hert *et al.*, 2004; Reutlinger *et al.*, 2013 y Westermayr *et al.*, 2021).

De las estructuras analizadas, D145 resultó ser teóricamente más inocua a comparación de D194 y D180, como se puede apreciar en la tabla 2. Es decir, mostró menor probabilidad de unión a los receptores sensibles a toxicidad usados como indicadores durante el análisis predictivo. También dado su tamaño, menor peso molecular, su configuración, entre otras características estructurales; exhibió mayor especificidad con el bolsillo de unión de mJHBP, lo que le excluyó de la probable afinidad a proteínas no objetivo (Kneuer *et al.*, 2018 y Satpathy, 2018). También enfatizando en la presencia y disposición de átomos electronegativos en los sustituyentes de D180 y D194, responsables de conferirle mayor afinidad y en consecuencia, menos discriminantes. Evidentemente estas aproximaciones están orientadas a actuar como filtros tempranos, para la selección las moléculas con menor o nula toxicidad estimada.

La puntuación de confianza para la toxicidad predecida para estas estructuras supera el 0.70 en su gran mayoría, lo que indica un grado de certeza admisible, pero también Banerjee *et al.*, 2018, mencionan que la comparación simultánea y ejecución de los predictores al unísono, puede acarrear problemas en la interpretación de los distintos umbrales de probabilidad arrojados. No obstante, sus algoritmos de aprendizaje automático proporcionan precisión en el rendimiento durante la ejecución de cada análisis.

En un ligando diseñado, el aumento en la afinidad para con la proteína objetivo, suele implicar un incremento en el número de sustituyentes de alta afinidad para con los residuos constituyentes del sitio de unión. Sin embargo, esas secuencias aminoacídicas suelen ser análogas a otras presentes en proteínas muy diferenciadas estructuralmente, incluso provenientes de organismos evolutivamente muy distintos (Jablonka *et al.*, 2019 y Kriehuber *et al.*, 2010), por lo que el aumento de afinidad de una estructura a un sitio concreto, implica también cierto aumento de afinidad para con sitios de unión de proteínas distintas no objetivo (Anantharaman & Aravind, 2003).

Lo cual acarrea problemas de posible toxicidad colateral. Esto incluso, aunque estos residuos generen motivos de muy distinto plegamiento, pues si la flexibilidad de la estructura del ligando y/o su longitud son lo suficiente como para reducir la distancia entre los residuos presentes y generar las interacciones necesarias para favorecer cierto contacto entre superficies moleculares se podría generar la estabilidad suficiente entre este ligando sintético y la proteína no objetivo, como para superar la afinidad con su ligando natural o habitual, actuando como un disruptor en las funciones de dicha proteína, comprometiendo la salud y en consecuencia la vida de otros organismos (Akkentli *et al.*, 2012; Bisbal & Sanchez, 2019 y Kumar, Moura y Cordeiro, 2019).

Por otro lado, se debe tomar en cuenta que estos ligandos fueron diseñados para poseer gran afinidad a un receptor proteico únicamente expresado en culícidos, por lo que es de esperar una reducida o nula toxicidad colateral. Lo que eventualmente permitiría la aplicación de un compuesto capaz de generar afinidad altamente focalizada y su actuar como disruptor del acoplamiento entre el receptor mJHBP y la hormona JH III-10R, destacándose para ello la estructura D145.

## CONCLUSIONES

-Los ligandos diseñados para el receptor mJHBP poseen características estructurales que les confiere una configuración y conformación de específica para con el bolsillo de unión de la mJHBP.

-Destacable tomar en cuenta las limitaciones tecnológicas para la ejecución de acoplamiento moleculares (Como en los modelos semirrígidos), pues no suelen tomar en cuenta la alta dinamicidad estructural que experimentan las proteínas al interactuar con distintos ligandos (Empero hay excepciones según el *software* a usar y los recursos computacionales a disposición).

- También considerar que las bases de datos generadas para la identificación de estructuras con potencial inhibidor suelen englobar cierto número de estructuras con diferentes grados de toxicidad, sin embargo; a partir de ellas se pueden aplicar conceptos de mejora continúa atendiendo y valorando la actividad de los grupos funcionales que presentan efectos no deseados.

-Además, la inocuidad teórica generada para algunos compuestos tras cada análisis *in silico*, debe ser tomada como indicadores relativos, pues evidentemente, no toma en cuenta una gran cantidad de posibles proteínas con las cuales podría interactuar actuando como disruptores de su función normal.

-Concretamente basado en la evidencia, la estructura D145 fue la que mejor relación afinidad-ADME-toxicidad presentó, así como menor afinidad a las proteínas analizadas no objetivo. Ello, aunado a sus características fisicoquímicas, reducido tamaño y alta afinidad para con el receptor mJHBP, podría (sometida a más análisis de respaldo y a mayor profundidad) considerarse un ligando del cual derivar nuevas estructura.

-Dada toda la evidencia anterior, de estas aproximaciones teóricas diseñadas, la denominada D145 factiblemente podría ser sintetizada para ser probada *in vitro* y si es el caso; validada, para considerar su probable aplicación en contextos reales.

## REFERENCIAS

- Abdolmaleki, A, Shiri, F; & Ghasemi, J. B. (2019). Computational Multi-Target Drug Design. In K. Roy. (Ed.), Multi-target drug design using chem-bioinformatic approaches. (pp. 1-22) *Springer New York*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8733-7>
- Abreu, R. M., Froufe, H. J., Queiroz, M. J. R., & Ferreira, I. C. (2012). Selective Flexibility of Side-Chain Residues Improves VEGFR-2 Docking Score using AutoDock Vina. *Chemical biology & drug design*, 79(4), 530-534. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2011.01313.x>
- Akkentli, F., Tan, Y. P., & Saybasili, H. (2012). Common Pesticide Rotenone Interference with Neuronal Transmission in Hippocampus. *American Journal of Biomedical Engineering*, 2(6), 212-17. DOI: 10.5923/j.ajbe.20120206.01
- Akram, M., Waratchareeyakul, W., Hauptenthal, J., Hartmann, R. W., & Schuster, D. (2017). Pharmacophore modeling and *in silico/in vitro* screening for human cytochrome P450 11B1 and cytochrome P450 11B2 inhibitors. *Frontiers in chemistry*, 5, 104. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00104>
- Aliferis, K. A., & Jabaji, S. (2011). Metabolomics—a robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: a review. *Pesticide Biochemistry and physiology*, 100(2), 105-117. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.03.004>
- Alkuriji, M. A., Al-Fageeh, M. B., Shaher, F. M., & Almutairi, B. F. (2020). Dengue Vector Control: A Review for Wolbachia-Based Strategies. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 17(3), 507-515. <https://dx.doi.org/10.13005/bbra/2854>
- Alout, H., Berthomieu, A., Hadjivassilis, A., & Weill, M. (2007). A new amino-acid substitution in acetylcholinesterase 1 confers insecticide resistance to *Culex pipiens* mosquitoes from Cyprus. *Insect biochemistry and molecular biology*, 37(1), 41-47. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.10.001>

- Alva, V., & Lupas, A. N. (2016). The TULIP superfamily of eukaryotic lipid-binding proteins as a mediator of lipid sensing and transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(8), 913-923. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2016.01.016>
- Amaral, M., Kokh, D. B., Bomke, J., Wegener, A., Buchstaller, H. P., Eggenweiler, H. M., ... & Frech, M. (2017). Protein conformational flexibility modulates kinetics and thermodynamics of drug binding. *Nature communications*, 8(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02258-wamaral>
- Anantharaman, V., & Aravind, L. (2003). Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes. *Genome biology*, 4(2), 1-12. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-2-r11>
- Areiza, M., Nouzova, M., Rivera, C., & Noriega, F. G. (2014). Ecdysis triggering hormone ensures proper timing of juvenile hormone biosynthesis in pharate adult mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 54, 98-105. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.09.006>
- Arendorf, J. R. T. (2011). *A study of some non-covalent functional group  $\pi$  interactions*. (Doctoral dissertation. University College London, London, England). Open Access Theses and Dissertations <https://discovery.ucl.ac.uk/id/eprint/1334083/>
- Atoni, E., Zhao, L., Karungu, S., Obanda, V., Agwanda, B., Xia, H., & Yuan, Z. (2019). The discovery and global distribution of novel mosquito-associated viruses in the last decade (2007-2017). *Reviews in Medical Virology*, 29(6), e2079. <https://doi.org/10.1002/rmv.2079>
- Banerjee, P., Eckert, A. O., Schrey, A. K., & Preissner, R. (2018). ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic acids research*, 46(W1), W257-W263. <https://doi.org/10.1093/nar/gky318>
- Barbera, N. A., Minke, B., & Levitan, I. (2019). Comparative docking analysis of cholesterol analogs to ion channels to discriminate between stereospecific binding vs. stereospecific response. *Channels*, 13(1), 136-146. [https://doi: 10.1080/19336950.2019.1606670](https://doi.org/10.1080/19336950.2019.1606670)

- Bisbal, M., & Sanchez, M. (2019). Neurotoxicity of the pesticide rotenone on neuronal polarization: a mechanistic approach. *Neural Regeneration Research*, 14(5), 762. DOI: 10.4103/1673-5374.249847
- Bisset, J. A. (2002). Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 54(3), 202-219.
- Bohart, R., & Washino, R. (1978). Mosquitoes of California (Vol. 4084). *Agriculture and Natural Resources*. University of California. California.
- Böhn, H. J. (2006). Prediction of Non-bonded Interactions in Drug Design. In R. Mannhold, H. Kubinyi, & G. Folkers. *Protein-ligand interactions: from molecular recognition to drug design*. (pp. 3-17). John Wiley & Sons.
- Bowen, M. F. (1991). The sensory physiology of host-seeking behavior in mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, 36(1), 139-158. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.36.010191.001035>
- Brady, J., & Hay, I. (2020). The global expansion of dengue: How *Aedes aegypti* mosquitoes enabled the first pandemic arbovirus. *Annual Review of Entomology*, 65, 191-208. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-024918>
- Brand, R. M., & Mueller, C. (2002). Transdermal penetration of atrazine, alachlor, and trifluralin: effect of formulation. *Toxicological Sciences*, 68(1), 18-23. <https://doi.org/10.1093/toxsci/68.1.18>
- Burli, A., Law, R. M., Rodriguez, J., & Maibach, H. I. (2020). Organic compounds percutaneous penetration in vivo in man: Relationship to mathematical predictive model. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 112, 104614. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104614>
- Buxbaum, E. (2007). *Fundamentals of protein structure and function* (Vol. 31). Springer. New York. ISBN : 978-3-319-19919-1
- Calvo, E., Mans, B. J., Andersen, J. F., & Ribeiro, J. M. (2006). Function and evolution of a mosquito salivary protein family. *Journal of Biological Chemistry*, 281(4), 1935-1942. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510359200>

- Caro, J. A., Harpole, K. W., Kasinath, V., Lim, J., Granja, J., Valentine, K. G., ... & Wand, A. J. (2017). Entropy in molecular recognition by proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(25), 6563-6568. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621154114>
- Cattel, J., Haberkorn, C., Laporte, F., Gaude, T., Cumer, T., Renaud, J., ... & Nous, C. (2020). A genomic amplification affecting a carboxylesterase gene cluster confers organophosphate resistance in the mosquito *Aedes aegypti*: from genomic characterization to high-throughput field detection. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1111/eva.13177>
- Chaverra, D; Jaramillo, N; & Fonseca, I. (2012). Selección artificial de resistencia a lambda-cialotrina en *Aedes aegypti* y resistencia cruzada a otros insecticidas. *Rev Colomb Entomol*, 38(1), 100-107.
- CHEMAXON. (2021). *MarvinSketch*. <https://chemaxon.com/products/marvin>
- Chung, N. C., Miasojedow, B., Startek, M., & Gambin, A. (2019). Jaccard/Tanimoto similarity test and estimation methods for biological presence-absence data. *BMC bioinformatics*, 20(15), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3118-5>
- Clifton, M. E., Correa, S., Rivera-Perez, C., Nouzova, M., & Noriega, F. G. (2014). Male *Aedes aegypti* mosquitoes use JH III transferred during copulation to influence previtellogenic ovary physiology and affect the reproductive output of female mosquitoes. *Journal of insect physiology*, 64, 40-47. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.03.006>
- Colón, F., Sewe, M. O., Tompkins, A. M., Sjödin, H., Casallas, A., Rocklöv, J., ... & Lowe, R. (2021). Projecting the risk of mosquito-borne diseases in a warmer and more populated world: a multi-model, multi-scenario intercomparison modelling study. *The Lancet Planetary Health*, 5(7), e404-e414. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(21\)00132-7](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(21)00132-7)
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific reports*, 7(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/srep42717>

- Das, S., Sarmah, S., Lyndem, S., & Singha Roy, A. (2021). An investigation into the identification of potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease using molecular docking study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(9), 3347-3357. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1763201>
- DASSAULT SYSTEMES. (2021). *BIOVIA Discovery Studio*. <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>
- Delaney, J. S. (2004). ESOL: estimating aqueous solubility directly from molecular structure. *Journal of chemical information and computer sciences*, 44(3), 1000-1005. <https://doi.org/10.1021/ci034243x>.
- Denlinger, D. L., & Armbruster, P. A. (2014). *Mosquito diapause*. *Annual Review of Entomology*, 59, 73-93.
- Denlinger, D. L., & Armbruster, P. A. (2016). Molecular physiology of mosquito diapause. *Advances in Insect Physiology*, 51, 329-361. <https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2016.05.002>
- Desdouits, N., Nilges, M., & Blondel, A. (2015). Principal component analysis reveals correlation of cavities evolution and functional motions in proteins. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 55, 13-24. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2014.10.011>
- Dixit, S., Ahsan, H., & Khan, F. H. (2021). Pesticides and plasma proteins: unexplored dimensions in neurotoxicity. *International Journal of Pest Management*, 1-10. <https://doi.org/10.1080/09670874.2021.1917725>
- DOF [Diario Oficial de la Federación]. (2014). Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014, Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores. *Laboratorios de la Secretaria de Salud*, p 255.
- Du, X., Li, Y., Xia, Y. L., Ai, S. M., Liang, J., Sang, P., ... & Liu, S. Q. (2016). Insights into protein-ligand interactions: mechanisms, models, and methods. *International journal of molecular sciences*, 17(2), 144. <https://doi.org/10.3390/ijms17020144>
- Duan, L. L., Feng, G. Q., & Zhang, Q. G. (2016). Large-scale molecular dynamics simulation: Effect of polarization on thrombin-ligand binding energy. *Scientific reports*, 6(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/srep31488>

- Dupas, S., Neiers, F., Granon, E., Rougeux, E., Dupont, S., Beney, L., ... & Charles, J. P. (2020). Collisional mechanism of ligand release by *Bombyx mori* JHBP, a member of the TULIP/Takeout family of lipid transporters. *Insect biochemistry and molecular biology*, 117, 103293. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.103293>
- Duvall, L. B. (2019). Mosquito host-seeking regulation: targets for behavioral control. *Trends in parasitology*, 35(9), 704-714. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.06.010>
- Dzul, F. A., Penilla, R., & Rodríguez, A. D. (2007). Susceptibilidad y mecanismos de resistencia a insecticidas en *Anopheles albimanus* del sur de la Península de Yucatán, México. *Salud pública de México*, 49(4), 302-311.
- Elanga, E., Nouage, L., Ndo, C., Binyang, A., Assatse, T., Nguiffo, D., ... & Wondji, C. S. (2019). The G119S Acetylcholinesterase (Ace-1) Target Site Mutation Confers Carbamate Resistance in the Major Malaria Vector *Anopheles gambiae* from Cameroon: A Challenge for the Coming IRS Implementation. *Genes*, 10(10), 790. <https://doi.org/10.3390/genes10100790>
- Eleftheriadou, D., Luethe, S., & Kneuer, C. (2019). *In silico* prediction of dermal absorption of pesticides—an evaluation of selected models against results from *in vitro* testing. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 30(8), 561-585. <https://doi.org/10.1080/1062936X.2019.1644533>
- Esfahani, S. N., Damavandi, M. S., Sadeghi, P., Nazifi, Z., Salari-Jazi, A., & Massah, A. R. (2021). Synthesis of some novel coumarin isoxazol sulfonamide hybrid compounds, 3D-QSAR studies, and antibacterial evaluation. *Scientific reports*, 11(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99618-w>
- Evans, B. R., Kotsakiozi, P., Costa, A. L., Ioshino, R. S., Garziera, L., Pedrosa, M. C., ... & Powell, J. R. (2019). Transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes transfer genes into a natural population. *Scientific reports*, 9(1), 1-6. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49660-6>
- Fagbohun, I. K., Idowu, E. T., Otubanjo, O. A., & Awolola, T. S. (2020). First report of AChE1 (G119S) mutation and multiple resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* ss in Nigeria. *Scientific Reports*, 10(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64412-7>

- Foley, D. H., Ruedas, M., & Wilkerson, R. (2007). Insight into Global Mosquito Biogeography from Country Species Recors. *Journal of Medical Entomology*, 44(4): 554-564. <https://doi.org/10.1093/jmedent/44.4.554>
- Fonseca, I., & Quiñones, M. L. (2005). Insecticide resistance in mosquitoes (Diptera: Culicidae): mechanisms, detection and monitoring in public health. *Revista Colombiana de Entomología*, 31(2), 107-115.
- Foster, W. A. (1995). Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. *Annual review of entomology*, 40(1), 443-474. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.40.010195.002303>
- Fu, X., Sluka, J. P., Clendenon, S. G., Dunn, K. W., Wang, Z., Klaunig, J. E., & Glazier, J. A. (2018). Modeling of xenobiotic transport and metabolism in virtual hepatic lobule models. *PLoS one*, 13(9), e0198060. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198060>
- Gang, F., Li, X., Yang, C., Han, L., Qian, H., Wei, S., ... & Zhang, J. (2020). Synthesis and Insecticidal Activity Evaluation of Virtually Screened Phenylsulfonamides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(42), 11665-11671. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02153>
- Gary Jr, R. E., & Foster, W. A. (2004). *Anopheles gambiae* feeding and survival on honeydew and extra-floral nectar of peridomestic plants. *Medical and veterinary entomology*, 18(2), 102-107. <https://doi.org/10.1111/j.0269-283X.2004.00483.x>
- Gasca, V. M. C., Medina, R. B., & Novelo, C. C. (2011). Los plaguicidas y su impacto sobre la fauna silvestre de la Península de Yucatán. *Bioagrocencias*, 4(2), 4-8.
- Giese, M; & Albrecht, M. (2020). Alkyl-Alkyl Interactions in the Periphery of Supramolecular Entities: From the Evaluation of Weak Forces to Applications. *ChemPlusChem*, 85(4), 715-724. <https://doi.org/10.1002/cplu.202000077>.
- Gogoi, D., Chaliha, A. K., Sarma, D., Kakoti, B. B., & Buragohain, A. K. (2017). Identification of potential type 4 cAMP phosphodiesterase inhibitors via 3D pharmacophore modeling, virtual screening, DFT and structural bioisostere design. *Medicinal Chemistry Research*, 26(11), 3000-3014. <https://doi.org/10.1007/s00044-017-1998-3>

- González, G. (2013). *Resistencia a insecticidas en el mosquito vector del dengue Aedes aegypti (L) en dos épocas de transmisión de la enfermedad en Mérida, Yucatán*. (Doctoral dissertation. Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México). Repositorio académico digital <http://eprints.uanl.mx/3488/#:~:text=http%3A//eprints.uanl.mx/id/eprint/3488>
- Goulart, T. L. S., Boyle, R. T., & Souza, M. M. (2015). Cytotoxicity of the association of pesticides Roundup Transorb® and Furadan 350 SC® on the zebrafish cell line, ZF-L. *Toxicology in vitro*, 29(7), 1377-1384. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.06.007>
- Grabowski, S. J. (Ed.). (2006). *Hydrogen bonding: new insights* (Vol. 3). Dordrecht: Springer.
- Gulia, M., Elliot, A., Brown, M. R., & Strand, M. R. (2015). Multiple factors contribute to anautogenous reproduction by the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of insect physiology*, 82, 8-16. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.08.001>
- Hagedorn, H. (2004). Mosquito Endocrinology. In W. Marquardt, (Ed). *Biology of disease vectors*, (pp.317-329). Elsevier Academic Press.
- Hansen, I. A., Attardo, G. M., Rodriguez, S. D., & Drake, L. L. (2014). Four-way regulation of mosquito yolk protein precursor genes by juvenile hormone-, ecdysone-, nutrient-, and insulin-like peptide signaling pathways. *Frontiers in physiology*, 5, 103. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00103>
- Hemingway, J., Hawkes, N. J., McCarroll, L., & Ranson, H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34(7), 653-665. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.018>
- Hernández, S., Rivera, C., Nouzova, M., & Noriega, F. G. (2015). Coordinated changes in JH biosynthesis and JH hemolymph titers in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of insect physiology*, 72, 22-27. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.11.003>
- Hernández, S., Cardoso, V., Nouzova, M., Michalkova, V., Ramirez, C. E., Fernandez-Lima, F., & Noriega, F. G. (2019). Juvenile hormone controls ovarian development in female *Anopheles albimanus*

- mosquitoes. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-38631-6>
- Hert, J., Willett, P., Wilton, D. J., Acklin, P., Azzaoui, K., Jacoby, E., & Schuffenhauer, A. (2004). Comparison of topological descriptors for similarity-based virtual screening using multiple bioactive reference structures. *Organic & biomolecular chemistry*, 2(22), 3256-3266. DOI: 10.1039/B409865J
- Hosny, N. M., & Sherif, Y. (2020). Molecular docking study on some isonicotinoyl hydrazide derivatives as potential inhibitors of COVID-19. *Lett. Appl. NanoBioSci*, 9, 1217-1224.  
<https://doi.org/10.33263/LIANBS93.12171224>
- Huang, H., Zhang, D., Weng, Y., Delaney, K., Tang, Z., Yan, C., ... & Zhao, Y. (2021). The regulatory enzymes and protein substrates for the lysine  $\beta$ -hydroxybutyrylation pathway. *Science Advances*, 7(9), eabe2771. DOI: 10.1126/sciadv.abe2771
- Ishak, I. H., Riveron, J. M., Ibrahim, S. S., Stott, R., Longbottom, J., Irving, H., & Wondji, C. S. (2016). The Cytochrome P450 gene CYP6P12 confers pyrethroid resistance in *kdr*-free Malaysian populations of the dengue vector *Aedes albopictus*. *Scientific reports*, 6, 24707.  
<https://doi.org/10.1038/srep24707>
- Jablonka, W., Kim, I. H., Alvarenga, P. H., Valenzuela, J. G., & Andersen, J. F. (2019). Functional and structural similarities of D7 proteins in the independently-evolved salivary secretions of sand flies and mosquitoes. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-41848-0>
- Johnson, D. W., & Hof, F. (Eds.). (2016). *Aromatic Interactions: Frontiers in Knowledge and Application*. Royal Society of Chemistry.
- Jones, C. G., Martynowycz, M. W., Hattne, J., Fulton, T. J., Stoltz, B. M., Rodriguez, J. A., ... & Gonen, T. (2018). The CryoEM method MicroED as a powerful tool for small molecule structure determination. *ACS central science*, 4(11), 1587-1592.  
<https://doi.org/10.1021/acscentsci.8b00760>
- Kamita, S. G., & Hammock, B. D. (2010). Juvenile hormone esterase: biochemistry and structure. *Journal of Pesticide Science*, 35(3), 265-274. <https://doi.org/10.1584/jpestics.R10-09>

- Karam, M. Á., Ramírez, G., Montes, L. P. B., & Galván, J. M. (2004). Plaguicidas y salud de la población. *CIENCIA ergo-sum*, Revista Científica Multidisciplinaria de Prospectiva, 11(3), 246-254.
- Kaulenas, M. S. (2012). *Insect accessory reproductive structures: function, structure, and development* (Vol. 31). Springer Science & Business Media.
- Kim, I. H., Pham, V., Jablonka, W., Goodman, W. G., Ribeiro, J. M., & Andersen, J. F. (2017). A mosquito hemolymph odorant-binding protein family member specifically binds juvenile hormone. *Journal of Biological Chemistry*, 292(37), 15329-15339. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.802009>
- Kneuer, C., Charistou, A., Craig, P., Eleftheriadou, D., Engel, N., Kjaerstad, M., ... & Buist, H. (2018). Applicability of *in silico* tools for the prediction of dermal absorption for pesticides. *EFSA Supporting Publications*, 15(10), 1493E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2018.EN-1493>
- Knutsson, S., Engdahl, C., Kumari, R., Forsgren, N., Lindgren, C., Kindahl, T., ... & Linusson, A. (2018). Noncovalent inhibitors of mosquito acetylcholinesterase 1 with resistance-breaking potency. *Journal of medicinal chemistry*, 61(23), 10545-10557. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01060>
- Koes, D., & Camacho, C. (2012). ZINCPharmer: pharmacophore search of the ZINC database. *Nucleic acids research*, 40(W1), W409-W414. <https://doi.org/10.1093/nar/gks378>
- Kołodziejczyk, R., Kochman, M., Bujacz, G., Dobryszycycki, P., Ożyhar, A., & Jaskolski, M. (2003). Crystallization and preliminary crystallographic studies of juvenile hormone-binding protein from *Galleria mellonella* haemolymph. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 59(3), 519-521. <https://doi.org/10.1107/S0907444902022904>
- Kriehuber, T., Rattei, T., Weinmaier, T., Bepperling, A., Haslbeck, M., & Buchner, J. (2010). Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins. *The FASEB Journal*, 24(10), 3633-3642. <https://doi.org/10.1096/fj.10-156992>

- Kumar, R., & Mukherji, S. (2018). Amenaza que plantean los persistentes plaguicidas organoclorados y su movilidad en el medio ambiente. *Química Orgánica Actual*, 22(10), 954-972.
- Kumar, A; Moura, A; & Cordeiro, N. (2019). Advanced Chemometric Modeling Approaches for the Design of Multitarget Drugs Against Neurodegenerative Diseases. In K. Roy. (Ed.), *Multi-target drug design using chem-bioinformatic approaches*. (pp. 155-186) Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8733-7>
- Labbé, P., Berthomieu, A., Berticat, C., Alout, H., Raymond, M., Lenormand, T., & Weill, M. (2007). Independent duplications of the acetylcholinesterase gene conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Molecular Biology and Evolution*, 24(4), 1056-1067. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm025>
- Laskowski, R. A., Jabłońska, J., Pravda, L., Vařeková, R. S., & Thornton, J. M. (2018). PDBsum: Structural summaries of PDB entries. *Protein science*, 27(1), 129-134. <https://doi.org/10.1002/pro.3289>
- Lenormand, T., Bourguet, D., Guillemaud, T., & Raymond, M. (1999). Tracking the evolution of insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Nature*, 400(6747), 861-864. <https://doi.org/10.1038/23685>
- Lešnik, S., Štular, T., Brus, B., Knez, D., Gobec, S., Janezic, D., & Konc, J. (2015). LiSiCA: a software for ligand-based virtual screening and its application for the discovery of butyrylcholinesterase inhibitors. *Journal of chemical information and modeling*, 55(8), 1521-1528. <https://doi:10.1021/acs.jcim.5b00136>
- Li, Y., Hernandez-Martinez, S., & Noriega, F. G. (2004). Inhibition of juvenile hormone biosynthesis in mosquitoes: effect of allatostatic head factors, PISCF-and YXFGL-amide-allatostatins. *Regulatory peptides*, 118(3), 175-182. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2003.12.004>
- Li, M., Mead, E. A., & Zhu, J. (2011). Heterodimer of two bHLH-PAS proteins mediates juvenile hormone-induced gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(2), 638-643. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013914108>
- Li, W., Cheng, T., Hu, W., Peng, Z., Liu, C., & Xia, Q. (2016). Genome-wide identification and analysis of JHBP-domain family members in

- the silkworm *Bombyx mori*. *Molecular Genetics and Genomics*, 291(6), 2159-2171. <https://doi.org/10.1007/s00438-016-1245-5>
- Liebschner, D., Afonine, P. V., Baker, M. L., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Croll, T. I., ... & Adams, P. D. (2019). Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in Phenix. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 75(10), 861-877. <https://doi.org/10.1107/S2059798319011471>
- López, M. A., & Neira, M. (2016). Influencia del cambio climático en la biología de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquito transmisor de arbovirosis humanas. *Revista Ecuatoriana de medicina y ciencias biológicas*, 37(2), 11-21. ISSN-e 2477-9148
- Loza, M. A., Salazar, J. R., & Sánchez, J. F. (2018). *In Silico* studies on compounds derived from calceolaria: phenylethanoid glycosides as potential multitarget inhibitors for the development of pesticides. *Biomolecules*, 8(4), 121. <https://doi.org/10.3390/biom8040121>
- Maia, E. H. B., Assis, L. C., de Oliveira, T. A., da Silva, A. M., & Taranto, A. G. (2020). Structure-based virtual screening: from classical to artificial intelligence. *Frontiers in chemistry*, 8, 343. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00343>
- Makwana, K. M., & Mahalakshmi, R. (2015). Implications of aromatic-aromatic interactions: From protein structures to peptide models. *Protein Science*, 24(12), 1920-1933. <https://doi.org/10.1002/pro.2814>
- Main, A. R., Hladik, M. L., Webb, E. B., Goyne, K. W., & Mengel, D. (2020). Beyond neonicotinoids—Wild pollinators are exposed to a range of pesticides while foraging in agroecosystems. *Science of the Total Environment*, 742, 140436. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140436>
- Mans, B. J., Calvo, E., Ribeiro, J. M., & Andersen, J. F. (2007). The crystal structure of D7r4, a salivary biogenic amine-binding protein from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(50), 36626-36633. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706410200>
- Manzanares, J. L. (2018). Distribución espacial de egresos hospitalarios de casos por infección vírica por picadura de mosquito en México

entre 2004 y 2014. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 41, e30. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2017.30>

Martín, D., Wang, S. F., & Raikhel, A. S. (2001). The vitellogenin gene of the mosquito *Aedes aegypti* is a direct target of ecdysteroid receptor. *Molecular and cellular endocrinology*, 173(1-2), 75-86. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(00\)00413-5](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(00)00413-5)

Martin, I., Paige, A., Leon, P. C. V., Gittis, A. G., Kern, O., Bonilla, B., ... & Calvo, E. (2020). ADP binding by the *Culex quinquefasciatus* mosquito D7 salivary protein enhances blood feeding on mammals. *Nature communications*, 11(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16665-z>

Metrangolo, P., Resnati, G., Pilati, T., Liantonio, R., & Meyer, F. (2007). Engineering functional materials by halogen bonding. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 45(1), 1-15. <https://doi.org/10.1002/pola.21725>

Metrangolo, P., & Resnati, G. (Eds.). (2008). *Halogen bonding: fundamentals and applications*. Springer.

Meuti, M. E., & Short, S. M. (2019). Physiological and environmental factors affecting the composition of the ejaculate in mosquitoes and other insects. *Insects*, 10(3), 74. <https://doi.org/10.3390/insects10030074>

Miller, T. A. (1988). Mechanisms of resistance to pyrethroid insecticides. *Parasitology Today*, 4(7), S8-S12. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(88\)90080-4](https://doi.org/10.1016/0169-4758(88)90080-4)

Fernando, F. (2014). Juvenile Hormone Biosynthesis in Insects: What Is New, What Do We Know, and What Questions Remain?, *International Scholarly Research Notices*. <https://doi.org/10.1155/2014/967361>

Ndii, M., & Supriatna, A. (2021). An application of nonstandard finite-difference scheme for solving autonomous and non-autonomous mathematical model for Wolbachia-carrying mosquito population dynamics. *Journal of Mathematical and Computational Science*, 11(1), 1039-1052. <https://doi.org/10.28919/jmcs/5296>

- Noriega, F. G., & Nouzova, M. (2020). Approaches and Tools to Study the Roles of Juvenile Hormones in Controlling Insect *Biology*. *Insects*, 11(12), 858. <https://doi.org/10.3390/insects11120858>
- Ogunlade, S. T., Adekunle, A. I., Meehan, M. T., Rojas, D. P., & McBryde, E. S. (2020). Modeling the potential of w Au-Wolbachia strain invasion in mosquitoes to control Aedes-borne arboviral infections. *Scientific Reports*, 10(1), 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73819-1>
- Opo, F., Rahman, M. M., Ahammad, F., Ahmed, I., Bhuiyan, M. A., & Asiri, A. M. (2021). Structure based pharmacophore modeling, virtual screening, molecular docking and ADMET approaches for identification of natural anti-cancer agents targeting XIAP protein. *Scientific reports*, 11(1), 1-17. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83626-x>
- Orth, A., Doll, S., & Goodman, W. (2003). Sequence, structure and expression of the hemolymph juvenile hormone binding protein gene in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 33(1), 93-102. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00180-7](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00180-7)
- Özkara, A., Akyıl, D., & Konuk, M. (2016). Pesticides, environmental pollution, and health. In M. L. Larramendy & S. Soloneski, (Eds.), *Environmental Health Risk-Hazardous Factors to Living Species*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/63094>
- Pan, S., Zhou, S., Gao, H., Yu, L., Zhang, S., Tang, K., ... & Ko, K. (2013). New perspectives on how to discover drugs from herbal medicines: CAM's outstanding contribution to modern therapeutics. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1-25. <https://doi.org/10.1155/2013/627375>
- Pérez, V. I. (2009). *Herramientas de cribado virtual aplicadas a inhibidores de entrada del VIH. Diseño de nuevos compuestos anti-VIH* (Doctoral dissertation, Universitat Ramon Llull, Barcelona, España). <https://www.tdx.cat/handle/10803/9311#page=1>
- Petchampai, N., & Scaraffia, P. Y. (2016). Nitrogen Metabolism in Mosquitoes. In A. S. Raikhel. *Progress in Mosquito Research*, (pp. 363-361). <https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2016.04.002>

- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (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>
- Pickett, S. (2006). The Biophore Concept. In R. Mannhold, H. Kubinyi, & G. Folkers. *Protein-ligand interactions: from molecular recognition to drug design*. (pp. 73-100). John Wiley & Sons.
- Pinzi, L., & Rastelli, G. (2019). Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery. *International journal of molecular sciences*, 20(18), 4331. <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>
- Plattner, N., & Noé, F. (2015). Protein conformational plasticity and complex ligand-binding kinetics explored by atomistic simulations and Markov models. *Nature communications*, 6(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/ncomms8653>
- Poet, T. S. (2000). Assessing dermal absorption. *Toxicological Sciences*, 58(1), 1-2. <https://doi.org/10.1093/toxsci/58.1.1>
- Prieto, F., & Medina, J. (2019). Diseño de fármacos asistido por computadora: cuando la informática, la química y el arte se encuentran. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 21(2), 124-134. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.2.6>
- Reutlinger, M., Koch, C. P., Reker, D., Todoroff, N., Schneider, P., Rodrigues, T., & Schneider, G. (2013). Chemically advanced template search (CATS) for scaffold-hopping and prospective target prediction for 'orphan' molecules. *Molecular informatics*, 32(2), 133. DOI: 10.1002/minf.201200141
- Satpathy, R. (2018). Quantitative structure-activity modelling of toxic compounds. *Nanotechnology, Food Security and Water Treatment*. 313-331. DOI: 10.1007/978-3-319-70166-0\_10
- Schwede, T., & Peitsch, M. C. (2009). Protein Structure Modeling and Docking at the Swiss Institute of Bioinformatics. In Ron Appel & Ernst Feytmans, (Eds.). *Bioinformatics: a swiss perspective*. (pp. 219-246). World Scientific.

- Seo, M. J., Heo, J., Kim, K., Chung, K. Y., & Yu, W. (2021). Coevolution underlies GPCR-G protein selectivity and functionality. *Scientific reports*, 11(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87251-6>
- Seidel, T., Wieder, O., Garon, A., & Langer, T. (2020). Applications of the pharmacophore concept in natural product inspired drug design. *Molecular Informatics*, 39(11), 2000059. <https://doi.org/10.1002/minf.202000059>
- Scaraffia, P. Y. (2016). Disruption of mosquito blood meal protein metabolism. In Z. Adelman. (Ed.). *Genetic Control of Malaria and Dengue* (pp. 253-275). *Academic Press*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800246-9.00012-0>
- Schaller, D., Šribar, D., Noonan, T., Deng, L., Nguyen, T. N., Pach, S., ... & Wolber, G. (2020). Next generation 3D pharmacophore modeling. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 10(4), e1468. <https://doi.org/10.1002/wcms.1468>
- Shi, M., Gao, J., & Zhang, M. Q. (2017). Web3DMol: interactive protein structure visualization based on WebGL. *Nucleic acids research*, 45(W1), W523-W527. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx383>
- Sieglaff, D. H., Duncan, K. A., & Brown, M. R. (2005). Expression of genes encoding proteins involved in ecdysteroidogenesis in the female mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 35(5), 471-490. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.01.011>
- Salmaso, V., & Moro, S. (2018). Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: an overview. *Frontiers in pharmacology*, 9, 923. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00923>
- Sponsler, D. B., Grozinger, C. M., Hitaj, C., Rundlöf, M., Botías, C., Code, A., ... & Douglas, M. R. (2019). Pesticides and pollinators: A socioecological synthesis. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.016>
- Sun, J. S., Xiao, S., & Carlson, J. R. (2018). The diverse small proteins called odorant-binding proteins. *Royal Society Open Biology*, 8(12), 180208. <https://doi.org/10.1098/rsob.180208>
- Suzuki, R., Fujimoto, Z., Shiotsuki, T., Tsuchiya, W., Momma, M., Tase, A., ... & Yamazaki, T. (2011). Structural mechanism of JH delivery in

- hemolymph by JHP of silkworm, *Bombyx mori*. *Scientific reports*, 1(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/srep00133>
- Swevers, L., Latrou K. (2009). Ecdysteroids and Ecdysteroid Signaling Pathways During Insect Oogenesis. In G. Smagghe. (Ed.) *Ecdysone: Structures and Functions*.(pp. 127-164) Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9112-4\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9112-4_5)
- Tian, W., Chen, C., Lei, X., Zhao, J., & Liang, J. (2018). CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic acids research*, 46(W1), W363-W367. <https://doi.org/10.1093/nar/gky473>
- Tiekink, E. R., & Zukerman-Sc, J. (Eds.). (2012). *The importance of pi-interactions in crystal engineering: Frontiers in Crystal Engineering*. John Wiley & Sons.
- Trott, O., Olson, A. J. (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>
- Vrzal, E. M., Allan, S. A., & Hahn, D. A. (2010). Amino acids in nectar enhance longevity of female *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Journal of insect physiology*, 56(11), 1659-1664. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.06.011>
- Wang, Y., Qiu, L., Ranson, H., Lumjuan, N., Hemingway, J., Setzer, W. N., ... & Chen, L. (2008). Structure of an insect epsilon class glutathione S-transferase from the malaria vector *Anopheles gambiae* provides an explanation for the high DDT-detoxifying activity. *Journal of structural biology*, 164(2), 228-235. DOI: 10.1016/j.jsb.2008.08.003
- Weedall, G. D., Mugenzi, L. M., Menze, B. D., Tchouakui, M., Ibrahim, S. S., Amvongo-Adjia, N., ... & Riveron, J. M. (2019). A cytochrome P450 allele confers pyrethroid resistance on a major African malaria vector, reducing insecticide-treated bednet efficacy. *Science translational medicine*, 11(484). DOI: 10.1126/scitranslmed.aat7386
- Westermayr, J., Gastegger, M., Schütt, K. T., & Maurer, R. J. (2021). Perspective on integrating machine learning into computational chemistry and materials science. *The Journal of Chemical Physics*, 154(23), 230903. <https://doi.org/10.1063/5.0047760>

- Wheeler, S. E., & Bloom, J. W. (2014). Toward a more complete understanding of noncovalent interactions involving aromatic rings. *The journal of physical chemistry A. ACS publications*, 118(32), 6133-6147. <https://doi.org/10.1021/jp504415p>
- aWorld Health Organization. (2 marzo 2020). *Vector-borne diseases*. World Health Organization. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
- bWorld Health Organization. (2020). *World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges*. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. ISBN 978-92-4-001579-1. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240015791>
- World Health Organization. (2021). *Guidance framework for testing genetically modified mosquitoes*. (2° ed.). Geneva: World Health Organization. ISBN: 978-92-4-002523-3. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/341370/9789240025233-eng.pdf?sequence=1>
- Wu, Z., Yang, L., He, Q., & Zhou, S. (2021). Regulatory mechanisms of vitellogenesis in insects. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 1863, 2-11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.593613>
- Zhao, G. P., Wang, X. Y., Li, J. W., Wang, R., Ren, F. Z., Pang, G. F., & Li, Y. X. (2021). Imidacloprid increases intestinal permeability by disrupting tight junctions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 222, 112476. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112476>
- Zhu, J., Busche, J. M., & Zhang, X. (2010). Identification of juvenile hormone target genes in the adult female mosquitoes. *Insect biochemistry and molecular biology*, 40(1), 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.12.004>
- Zhu, J., & Noriega, F. G. (2016). The role of juvenile hormone in mosquito development and reproduction. *Advances in insect physiology*, 51, 93-113. <https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2016.04.005>