



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E
INGENIERÍA**

**CENTRO DE INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS**

Evaluación del acoplamiento molecular entre las variantes mexicanas del VPH E6 tipos 16 y 18, contra fármacos, durante la interacción con E6AP.

TESIS

Que presenta

Fernanda Pérez Cortés

Para obtener el título de

BIÓLOGA

Director:

Pablo Octavio Aguilar

Codirector:

Liliana Mireya Aguilar Castro

Mineral de la Reforma, Hidalgo. 2026



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
School of Engineering and Basic Sciences

Mineral de la Reforma, Hgo., a 21 de enero de 2026

Número de control: ICBI-D/120/2026
Asunto: Autorización de impresión.

MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UA EH

Con Título Quinto, Capítulo II, Capítulo V, Artículo 51 Fracción IX del Estatuto General de nuestra Institución, por este medio, le comunico que el Jurado asignado a la egresada de la Licenciatura en Biología **Fernanda Pérez Cortés**, quien presenta el trabajo de titulación **"Evaluación del acoplamiento molecular entre las variantes mexicanas del VPH E6 tipos 16 y 18, contra fármacos, durante la interacción con E6AP"**, ha decidido, después de revisar fundamento en lo dispuesto en el Título Tercero, Capítulo I, Artículo 18 Fracción IV; dicho trabajo en la reunión de sinodales, **autorizar la impresión del mismo**, una vez realizadas las correcciones acordadas.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

Presidente: Dr. Antonio Rafael Tapia Benavides

Secretario: Dra. Liliana Mireya Aguilar Castro

Vocal: Dr. Pablo Octavio Aguilar

Suplente: Dra. Dulce María Galván Hernández

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

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"

Mtro. Gabriel Vergara Rodríguez
Director del ICBI

GVR/MMM

Ciudad del Conocimiento, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184
Teléfono: 771 71 720 00 Ext. 40001
direccion_icbi@uaeh.edu.mx, vergara@uaeh.edu.mx

"Amor, Orden y Progreso"



uaeh.edu.mx

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada a los dos amores de mi vida, mi mamá y mi hermana. Fueron mi soporte durante toda la carrera, en las horas de estudio y preocupación, pero también en los momentos de alegría y éxito. Todo lo que soy es gracias a ustedes y todo lo que quiero llegar a ser, es para ustedes. Las amo.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a mi asesor, el Dr. Pablo Octavio Aguilar, por enseñarme a confiar en mí misma y sembrar la semilla de este maravilloso trabajo. Gracias por aceptarme como su alumna, guiarme en el proceso y escucharme cuando dudaba. Mi más grande admiración y aprecio al mejor profesor que pude tener.

A mi asesora, la Dra. Liliana Mireya Aguilar Castro, porque me brindó lo más importante que un profesor puede darles a sus alumnos, su tiempo y paciencia. Gracias por aprender conmigo y proponerme retos que ahora me enorgullecen. Las horas que pasamos juntas fueron mi motivación.

No menos importante, a mis otros sinodales, la Dra. Dulce María Galván Hernández, por todo su apoyo para la culminación y presentación de este trabajo y al Dr. Antonio Rafael Tapia Benavides, por brindarme su tiempo con la revisión y sus importantes observaciones.

Finalmente, a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y al Centro de Investigaciones Biológicas, por ser un hogar para mí donde pude desarrollarme en una carrera que amo.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
ÍNDICE.....	1
ABREVIATURAS	3
LISTADO DE FIGURAS.....	5
LISTADO DE TABLAS	7
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN.....	13
ANTECEDENTES	14
Mecanismo de infección por VPH.....	14
Variación de VPH.....	16
Variación de E6.....	18
Docking molecular E6	18
Fármacos y compuestos propuestos contra el VPH.....	21
JUSTIFICACIÓN.....	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS PARTICULARES	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
Búsqueda de fármacos con actividad antiviral y anticancerígena	26
Búsqueda estructural de moléculas blanco del VPH	26
Búsqueda de variantes virales	27
Predicción estructural de la proteína E6 para cada variante	28
Docking molecular.....	29
Fase 1. Interacción fármaco-proteína	29
Fase 2. Interacción proteína-proteína	29
Modificación estructural de fármacos.....	30
Docking molecular de las variantes + fármacos modificados	30
Interacción proteína-fármaco modificado-proteína	31
RESULTADOS	31
Listado de fármacos con potencial, estructura y toxicidad	31
Análisis estructural del blanco molecular	33
Descripción y análisis estructural de las variantes de E6	34
Docking molecular fármacos + variantes de E6	40
Interacciones entre variantes y fármacos: VPH-16.....	62
-Interacciones entre las proteínas del VPH-16 y Nelfinavir (b):.....	62
-Interacciones entre las proteínas del VPH-16 e Indinavir (e):.....	63
-Interacciones entre las proteínas del VPH-16 y Bit225 (k):	63
-Interacciones entre las proteínas del VPH-16 y Flumatinib (m):	63
Interacciones entre variantes y fármacos: VPH-18.....	64
-Interacciones entre las proteínas del VPH-18 y Nelfinavir (b):.....	64
-Interacciones entre las proteínas del VPH-18 e Indinavir (e):.....	65

-Interacciones entre las proteínas del VPH-18 y Darapladib (l):	65
-Interacciones entre las proteínas del VPH-18 y Flumatinib (m):	65
-Interacciones entre las proteínas del VPH-18 y Belinostat (o):.....	66
Docking molecular variantes + blanco molecular	76
Modificaciones propuestas de fármacos seleccionados	84
Docking molecular de las variantes + fármacos modificados	86
Interacción proteína-fármaco-proteína.....	89
DISCUSIÓN.....	97
Particularidades para el tratamiento.....	97
Afinidad diferencial	101
Interacciones polares y no polares entre fármacos y E6	102
Interacción proteína viral-proteína blanco	105
Propuestas de modificación farmacológica como un aporte a la medicina personalizada.....	107
Importancia de un análisis proteína viral-fármaco-proteína blanco	109
CONCLUSIONES.....	110
REFERENCIAS	111

ABREVIATURAS

A5/6/7/9: Alphapapilomavirus especie 5/6/7/9

AA: Variante asiático-americana del VPH

AAPF(CMK): succinil -alanina-alanina-prolina-fenilalanina clorometil cetona

ADC: Adenocarcinoma

ADME: Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Af: Variante africana del VPH

Af1: Variante africano 1 del VPH

Af2: Variante africano 2 del VPH

As: Variante asiática del VPH

BAK: *Bcl-2 homologous antagonist/killer* (Proteína destructora del antagonista homólogo bcl-2)

BLASTP: *Align Sequences Protein BLAST* (Alinear Secuencias de Proteínas BLAST)

CaCu: Cáncer Cérvicouterino

CCE: Carcinoma de Células Escamosas

C-H: Enlace carbono-hidrógeno

CPF: Compuestos Polifenólicos

E: *Early* (Región temprana)

E6AP: Ubiquitina-proteína ligasa E3A

EAs: Variante europeo-asiático del VPH

eIF4E: Factor de Iniciación Eucariota E4

Eu: Variante europea del VPH

FADD: *Fas-associated death domain* (Proteína del dominio de muerte asociada a FAS)

FDA: *Food and Drug Administration* (Administración de Alimentos y Medicamentos)

GAGs: *Glycosaminoglycan Chains* (Cadenas de Glicosaminoglicanos)

HATS: Histona Acetiltransferasas

HDAC: Histona Deacetilasa

HR: *High-Risk* (Alphapapilomavirus de alto riesgo)

HSPG: *Heparan Sulfate Proteoglycan* (Proteoglicano de Heparán Sulfato)

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry* (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada)

L: *Late* (Región tardía)

LCR: *Long Control Region* (Región de Control Larga)

LR: *Low-Risk* (Alphapapilomavirus de bajo riesgo)

MAGI-1: *Membrane-Associated Guanylate Kinase with inverted organization-1* (guanilato quinasa asociada a la membrana con estructura de dominio invertida-1)

MCM7: *Minichromosome Maintenance Complex Component 7* (Proteína 7 de mantenimiento de mini-cromosomas)

MGMT: *Methylated-DNA-protein-cysteine methyltransferase* (Metil guanina metil transferasa)

MMP: Metaloproteinasas de Matriz

MUPP1: *Multi-PDZ-domain protein 1* (Proteína de dominio múltiple PDZ)

NA/AA: Variante norteamericano/asiático-americano del VPH

NA: Variante norteamericana del VPH

NCIB: *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)

ORF: *Open Reading Frame* (Marco Abierto de Lectura)

PaVE: La Episteme del Virus del Papiloma

PRB: Proteína del Retinoblastoma

RCSB PDB: *The Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank* (Banco de Datos de Proteínas)

Sdc1: HSPG syndecan 1

Sdc4: HSPG syndecan 4

TGN: *Trans-Golgi network* (red Trans-Golgi)

TTD: *Therapeutic Target Database*

VPH: Virus del Papiloma Humano

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Proceso replicativo del VPH. Se observa la infección viral asociada con la diferenciación celular en el epitelio escamoso estratificado, mediante la entrada a través de lesiones tisulares.	16
Figura 2. Estructura de la cadena A de la Ubiquitina-proteína ligasa E3A (E6AP): Se amplía la región del péptido LXXLL que interactúa con E6. En la parte inferior derecha de la imagen se indica la secuencia de aminoácidos que la conforman y se resalta en color rosa el segmento de interés.	34
Figura 3. Modelado en 3D de las seis variantes del VPH-16 con mayor incidencia en México.	35
Figura 4. Empalme de las variantes modeladas de E6 del VPH-16 con relación a la proteína E6 de referencia. A) Sobrelapamiento de las estructuras en 3D con respecto a la referencia en color gris: se señala que el sitio activo de unión permanece a pesar de los cambios en las posiciones de los aminoácidos. B) Tabla de porcentajes de identidad entre la secuencia de referencia y las secuencias de las variantes. C) Alineación de todas las secuencias en color azul. Las letras sin color resaltan las mutaciones no sinónimas.	36
Figura 5. Modelado en 3D de las dos variantes del VPH-18 con mayor incidencia en México.	36
Figura 6. Empalme de las variantes modeladas de E6 del VPH-18 con relación a la proteína E6 de referencia. A) Sobrelapamiento de las estructuras en 3D con respecto a la referencia en color rosa: se señala que el sitio activo permanece como bolsillo de unión a pesar de los cambios en las posiciones de los aminoácidos. B) Tabla de porcentajes de identidad entre la secuencia de referencia y las secuencias de las variantes. C) Alineación de todas las secuencias en color azul. Las letras sin color resaltan las mutaciones no sinónimas.	37
Figura 7. Gráficos de Errat para los modelos E6 del VPH-16, todas las estructuras con un valor de calidad general de 100: A) Evaluación de la variante AA-a; B) Evaluación de la variante AA-c; C) Evaluación de la variante E-A176-G350; D) Evaluación de la variante E-G350; E) Evaluación de la variante E-C188-G350; D) Evaluación de la variante E-G131. 38	
Figura 8. Gráficos de Ramachandran de las estructuras predichas para VPH-16: A) Variante AA-a; B) Variante AA-c; C) Variante E-A176-G350; D) Variante E-G350; E) Variante E-C188-G350; F) Variante E-G131.	39
Figura 9. Gráficos de Errat para los modelos E6 del VPH-18, todas las estructuras con un valor de calidad general >97: a) Evaluación de la variante Af; b) Evaluación de la variante E.	40
Figura 10. Gráficos de Ramachandran de las estructuras predichas para VPH-18: a) Variante Af; b) Variante E.	40

Figura 11. Interacción proteína-proteína entre Af del VPH-18 (esferas) y E6AP (líneas). La zona en color verde corresponde a la superficie de E6 involucrada en la unión. Los residuos de E6AP en color rojo simbolizan la parte del péptido LXXLL que interactúa. El residuo en azul (GLN 375, posición 2 de LXXLL) no participa en la interfaz de unión. 83

Figura 12. Interacción proteína-proteína entre E del VPH-18 (esferas) y E6AP (líneas). La zona en color verde corresponde a la superficie de E6 involucrada en la unión. Los residuos de E6AP en color rojo simbolizan la parte del péptido LXXLL que interactúa. El residuo en azul (GLN 375, posición 2 de LXXLL) no participa en la interfaz de interacción. 84

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Variantes seleccionadas del VPH-16/18 con incidencia en México.	27
Tabla 2. Listado de los fármacos elegidos que tienen potencial anticancerígeno contra los VPH-16/18 y su código de acceso a PubChem.	31
Tabla 3. Regla de Lipinski de similitud con fármacos (*) y perfil de hepatotoxicidad.....	32
Tabla 4. Porcentajes de residuos de aminoácidos en cada región del gráfico de Ramachandran para las variantes del VPH-16.	39
Tabla 5. Porcentajes de residuos de aminoácidos en cada región del gráfico de Ramachandran para las variantes del VPH-18.	40
Tabla 6. Resultados de los valores de afinidad de unión entre los acoplamiento fármaco-proteína de las variantes E6 del VPH-16 a una exhaustividad de 100. Los compuestos aparecen según su clave en la Tabla 2. Las filas en color gris resaltan los fármacos cuya energía de enlace es más fuerte y son candidatos a inhibidores.	41
Tabla 7. Resultados de los valores de afinidad de unión entre los acoplamiento fármaco-proteína de las variantes E6 del VPH-18. Los compuestos aparecen según la clave indicada en la Tabla 2. Las filas en color gris resaltan las interacciones cuya energía de enlace es más fuerte.	42
Tabla 8. Interacciones de la variante AA-c del VPH-16 con sus cuatro fármacos de mayor afinidad. Se muestra el acoplamiento tridimensional, diagrama en 2D de los residuos interactuantes en el sitio activo y el tipo de fuerzas intermoleculares.....	44
Tabla 9. Interacciones de la variante AA-a del VPH-16 con sus cuatro fármacos de mayor afinidad. Se muestra el acoplamiento tridimensional, diagrama en 2D de los residuos interactuantes en el sitio activo y el tipo de fuerzas intermoleculares.....	46
Tabla 10. Interacciones de la variante E-G350 del VPH-16 con sus tres fármacos de mayor afinidad. Se muestra el acoplamiento tridimensional, diagrama en 2D de los residuos interactuantes en el sitio activo y el tipo de fuerzas intermoleculares.....	49

Tabla 11. Interacciones de la variante E-A176/G350 del VPH-16 con sus tres fármacos de mayor afinidad. Se muestra el acoplamiento tridimensional, diagrama en 2D de los residuos interactuantes en el sitio activo y el tipo de fuerzas intermoleculares.....	51
Tabla 12. Interacciones de la variante E-C188/G350 del VPH-16 con sus tres fármacos de mayor afinidad. Se muestra el acoplamiento tridimensional, diagrama en 2D de los residuos interactuantes en el sitio activo y el tipo de fuerzas intermoleculares.....	53
Tabla 13. Interacciones de la variante E-G131 del VPH-16 con sus dos fármacos de mayor afinidad. Se muestra el acoplamiento tridimensional, diagrama en 2D de los residuos interactuantes en el sitio activo y el tipo de fuerzas intermoleculares.....	55
Tabla 14. Interacciones de la variante Af del VPH-18 con sus cinco fármacos de mayor afinidad. Se muestra el acoplamiento tridimensional, diagrama en 2D de los residuos interactuantes en el sitio activo y el tipo de fuerzas intermoleculares.....	56
Tabla 15. Interacciones de la variante E del VPH-18 con sus cinco fármacos de mayor afinidad. Se muestra el acoplamiento tridimensional, diagrama en 2D de los residuos interactuantes en el sitio activo y el tipo de fuerzas intermoleculares.....	59
Tabla 16. Aminoácidos involucrados en el sitio interactuante de las variantes E6 del VPH.16 con su propuesta farmacológica. C-H: interacción carbono-hidrógeno. NF: Interacción No favorable. Pi-Pi Stacked: de Apilamiento π	66
Tabla 17. Aminoácidos involucrados en el sitio interactuante de las variantes E6 del VPH.18 con su propuesta farmacológica. C-H: interacción carbono-hidrógeno. NF: Interacción No favorable. Pi-Pi Stacked: de Apilamiento π	73
Tabla 18. Acoplamiento proteína-proteína entre las variantes del VPH-16 Y E6AP. En la imagen de la izquierda se identifica el péptido de unión LXXLL y la derecha muestra la superficie de interacción completa entre ambas proteínas.	77
Tabla 19. Acoplamiento proteína-proteína entre las variantes del VPH-18 Y E6AP: En la columna izquierda se muestra la superficie de interacción del complejo con la variante Af y a la derecha la superficie del complejo con la variante E.....	79
Tabla 20. Resultados de la interacción proteína viral-proteína blanco con las variantes del VPH-16: Se reporta el número de interacciones favorables no covalentes en el complejo y los residuos que interactúan por puentes de hidrógeno. El primero siempre corresponde a la	

proteína viral y el segundo a la proteína blanco (en negritas se señalan aquellas uniones que se conservan en todas las variantes). 80

Tabla 21. Resultados de la interacción proteína viral-proteína blanco con las variantes del VPH-18: Se reporta el número de interacciones favorables no covalentes en el complejo y los residuos que interactúan por puentes de hidrógeno. El primero siempre corresponde a la proteína viral y el segundo a la proteína blanco. Se destaca que no hay interacciones comunes entre complejos..... 81

Tabla 22. Modificación estructural de los fármacos de mayor afinidad Primera columna: nombre del compuesto seleccionado. Segunda columna: estructura química original. Tercera columna: fármaco modificado. 84

Tabla 23. Regla de Lipinski de similitud con fármacos (*) y perfil de hepatotoxicidad. Clave M1 es el modificado de Darapladib, M2 modificado de Flumatinib y M3 modificado de Nelfinavir..... 85

Tabla 24. Resultados de los valores de afinidad de unión entre los fármacos modificados y las variantes del VPH-16. Clave M1 es el modificado de Darapladib, M2 modificado de Flumatinib y M3 modificado de Nelfinavir. En color gris resaltan los resultados cuya energía de enlace es más fuerte. En la última fila se indica nuevamente el valor de acoplamiento con el fármaco original..... 86

Tabla 25. Resultados de los valores de afinidad de unión entre los fármacos modificados y las variantes del VPH-18. Clave M1 es el modificado de Darapladib, M2 modificado de Flumatinib y M3 modificado de Nelfinavir..... 87

Tabla 26. Interacciones de las variantes del VPH-16 con las estructuras modificadas de los fármacos de mayor afinidad: Se muestra el diagrama en 2D de las interacciones en el sitio activo y el tipo de fuerzas intermoleculares. 88

Tabla 27. Comparación entre complejos triméricos. En la columna izquierda la interacción entre la proteína viral del VPH-16-fármaco original-proteína blanco y en la columna derecha la proteína viral del VPH-16-fármaco modificado-proteína blanco. Se observa el sitio y la superficie de bloqueo entre por el fármaco seleccionado, así como el número de residuos involucrados. 91

Tabla 28. Interacción en trimérica de la proteína viral del VPH-18-fármaco-proteína blanco. Se observa el sitio y la superficie de bloqueo entre la proteína viral y la proteína blanco por el fármaco seleccionado..... 93

Tabla 29. Residuos implicados en la interacción del trímero de las variantes del VPH-16. Se muestra cada complejo con dos columnas, la primera enlista los posibles aminoácidos que se unen con mayor fuerza al fármaco modificado y la segunda indica la cadena a la que pertenece el residuo. 94

Tabla 30. Residuos implicados en la interacción del trímero de las variantes del VPH-18. Se muestra cada complejo con dos columnas, la primera enlista los posibles aminoácidos que se unen con mayor fuerza al fármaco Darapladib y la segunda indica la cadena a la que pertenece el residuo. 96

RESUMEN

El cáncer Cérvicouterino (CC) es la neoplasia maligna asociada al VPH más común, particularmente causada por los tipos 16 y 18 de alto riesgo, tanto a nivel mundial como en México. Se han descrito variantes de estos tipos con alteraciones que afectan su interacción con proteínas de la célula huésped, la persistencia viral y la progresión del cáncer. La oncoproteína viral E6 es crucial para la infección debido a su interacción con diversos blancos celulares, lo que la convierte en un objetivo terapéutico clave para la prevención y el tratamiento de fenotipos cancerosos. E6 se une al péptido LXXLL de la enzima celular E6AP para promover la degradación de P53. Sin embargo, las diferencias estructurales de E6, específicas de las variantes 16 y 18 del VPH no se han considerado en el desarrollo de tratamientos personalizados que inhiban la interacción E6-E6AP; este es el objetivo principal de este estudio. Se utilizan modelos moleculares de la interacción entre variantes y sus blancos, junto con la triple interacción con fármacos conocidos y fármacos modificados diseñados para mejorar la capacidad inhibitoria. Se seleccionaron dos variantes del VPH-16 y dos variantes del VPH-18 con base en su prevalencia global y presencia en México. Flumatinib muestra una amplia afinidad por todas las variantes del VPH-16 (AA-a, AA-c, E-G131, E-G350, E-A176/G350 y E-C188/G350), mientras que nelfinavir se considera solo para las variantes asiático-americanas (AA-a y AA-c). Para el VPH-18, el fármaco darapladib se utiliza independientemente de la variante (Af o E). La modificación de flumatinib para aumentar los enlaces de hidrógeno con el dímero E6-E6AP resultó en una mayor afinidad contra todas las variantes del VPH-16 en comparación con el fármaco original. Sin embargo, para el VPH-18, ninguna modificación farmacológica mejoró la afinidad en relación con los fármacos originales. En conclusión, el estudio experimental de cada variante podría permitir un tratamiento personalizado, ya que interactúan con sus dianas a diferentes intensidades. Proponemos modificar dos fármacos para mejorar su afinidad contra las variantes del VPH-16 como estrategia para el desarrollo de fármacos, basándonos en la bioestructura de los complejos proteína viral-fármaco-proteína diana.

ABSTRACT

Cervical cancer (CC) is the most common HPV-associated malignancy, particularly caused by high-risk types 16 and 18, both worldwide and in Mexico. Variants of these types with alterations affecting their interaction with host cell proteins, viral persistence, and cancer progression have been described. The viral oncoprotein E6 is crucial for infection due to its interaction with various cellular targets, making it a key therapeutic target for preventing and treating cancerous phenotypes. E6 binds to the LXXLL peptide of the cellular E6AP enzyme to promote P53 degradation. However, the structural differences of E6 specific to HPV variants 16 and 18 have not been considered in developing personalized treatments that inhibit the E6-E6AP interaction; this is the main goal of this study. Molecular models of the interaction between variants and their targets are used, along with the triple interaction with known drugs and modified drugs designed to improve inhibitory capacity. Two HPV-16 variants and two HPV-18 variants were selected based on their global prevalence and presence in Mexico. Flumatinib shows broad affinity for all HPV-16 variants (AA-a, AA-c, E-G131, E-G350, E-A176/G350, and E-C188/G350), while nelfinavir is considered only for Asian-American variants (AA-a and AA-c). For HPV-18, the drug darapladib is used regardless of the variant (Af or E). Modifying flumatinib to increase hydrogen bonds with the E6-E6AP dimer resulted in greater affinity against all HPV-16 variants compared to the original drug. However, for HPV-18, no pharmacological modifications improved affinity relative to the original drugs. In conclusion, studying each variant experimentally could allow for personalized treatment, as they interact with their targets at different intensities. We propose modifying two drugs to enhance their affinity against HPV-16 variants as a strategy for drug development, based on the biostructure of viral protein-drug-target protein complexes.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el Cáncer Cérvicouterino (CaCu) ocupa el cuarto lugar como el cáncer más común en mujeres (Muñoz-Bello *et al*, 2022). En Estados Unidos, para 2021, se estimó que 295,748 mujeres vivían con CaCu, aunado a que aproximadamente 0.6% de las mujeres serían diagnosticadas con este tipo de cáncer en algún momento de su vida, según datos estadísticos obtenidos en The website of the National Cancer Instituto (<https://www.cancer.gov>). El CaCu en México, durante el 2020 fue el segundo más diagnosticado (+9,000 casos), y la segunda causa de muerte en mujeres (+4,000 muertes). Para 2021, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), reportó 1,155 casos nuevos y 1,059 defunciones, concluyendo con una tasa de incidencia de 2.26 y una mortalidad de 5.7 por 100 mil (Medrano-Guzmán, 2022).

Los VPH tipo 16 y 18, son los más prevalentes en pacientes con el virus, seguidos de los tipos 45, 31, 33, 52, 58 y 35. El VPH-16 tiene una prevalencia de más del 50% y el VPH-18 tiene 15% a nivel mundial (Muñoz *et al*, 2003). La proteína E6 del VPH, interviene en funciones reguladoras del ciclo celular y aumenta la proliferación de los queratinocitos infectados. En los tipos de alto riesgo (HR), E6 se expresa continuamente transformando las células hacia la tumorigénesis. Por lo anterior, se estudia cómo inhibir la acción de E6 mediante fármacos candidatos a tratamientos para la infección por VPH. En el presente trabajo, además de realizar un modelado *in silico* entre los fármacos reportados con acción competitiva respecto a E6 y su blanco molecular principal, la ligasa E3 E6AP, se analizó la variación natural de dicha proteína en los tipos de alto riesgo, específicamente 16 y 18.

El trabajo tiene como objetivo determinar si existen cambios en los puntos de unión de las variantes modeladas que sean susceptibles de inhibición, comparar las interacciones entre la proteína viral y la proteína blanco y probar fármacos contra cada variante de E6, con el fin de proponer tratamientos de mayor especificidad mediante un acoplamiento molecular. Proponer este tipo de tratamientos parte de la premisa de que cada variante responde de forma única a determinados compuestos. Además, analizar las interacciones de las variantes con mayor actividad oncogénica contra los fármacos propuestos, permite proponer mejoras a sus estructuras químicas para aumentar la obstrucción entre la unión E6-E6AP.

ANTECEDENTES

Mecanismo de infección por VPH

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es un grupo de virus especialista de epitelios cutáneos y mucosos, que completan su ciclo de vida en las capas superiores de estos. La evolución de este grupo ha derivado en más de 200 tipos de VPH. Algunos de ellos tienen la capacidad de producir lesiones benignas como verrugas en la piel, hasta causar diversos tipos de cáncer como CaCu, que es el más consistente entre la población mundial y de las principales afecciones relacionadas con este virus (Jenkins & Bosch, 2020).

A nivel mundial, se ha informado que más del 99% de los pacientes que presentan lesiones cervicales son positivos a marcadores de ADN del VPH, por lo que se considera un serio problema de salud pública (Kolluru *et al*, 2019). Otros tipos de cáncer también tienen relación con este virus, como son los de vagina, vulva, pene, cabeza y cuello, cavidad oral y orofaríngeo (Juneja *et al*, 2021).

Los VPH son virus de ADN de doble cadena circular, sin envoltura, que contienen aproximadamente 8,000 pb. Su única molécula de ADN contiene secuencias homólogas a segmentos génicos del hospedero, asociadas con histonas y está contenida en una cápside proteica de 72 capsómeros pentaméricos. El genoma de estos virus codifica aproximadamente ocho marcos de lectura abiertos (ORF, "Open Reading Frame"), divididas en tres secciones *A*) una región temprana (E, "Early"), que codifica las proteínas E1 a E7, necesarias para la replicación; *B*) una región tardía (L, "Late"), que codifica las proteínas L1 y L2 necesarias para el ensamblaje del virión; y por último *C*) que es una sección no codificante llamada región de control larga (LCR, "Long Control Region") con elementos necesarios para la replicación y transcripción del ADN viral (IARC, 2007).

Una infección producida por VPH se da en el epitelio diferenciado. Sin embargo, para que sea eficiente, debe presentarse una herida o una microabrasión del tejido. Las capas celulares que brindan protección y defensa contra agentes externos, son las mismas que al presentar una ruptura, permiten el acceso de los viriones a las células basales. La infección únicamente se dará en estas células mitóticamente activas porque el virus no codifica ninguna polimerasa para su autorreplicación, por lo que depende completamente de las células del huésped para replicar su genoma. En el caso específico del cuello uterino, las células basales

se encuentran más expuestas en la zona de transformación, que es un área donde se unen células epiteliales del endocérnix (parte interna), con epitelio escamoso estratificado del ectocérnix (parte externa). En esta zona es posible no requerir de una herida para establecer la infección siempre que existan condiciones patológicas o fisiológicas, como la menstruación o coinfecciones fúngicas (Ozbun, 2019; Pippa *et al*, 2021).

La interacción inicial entre el virus y los queratinocitos se produce a través de cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs, “Glycosaminoglycan Chains”) del receptor Proteoglicano de Heparán Sulfato (HSPG, “Heparan Sulfate Proteoglycan”), que se expresan en la superficie celular o secretadas hacia la matriz extracelular. Las cadenas de GAG están unidas a proteínas centrales que facilitan la unión con el VPH, el cual se adhiere específicamente a los HSPG sindecano 1 y sindecano 4 (Sdc1 y Sdc4, respectivamente) de los queratinocitos. La unión promueve cambios conformacionales en las proteínas de cápside, principalmente en L1 que es la más abundante, y que a su vez es fundamental para que sea transferido a receptores de entrada secundarios (Ozbun, 2019).

El virus se endocita, el endosoma se une al lisosoma donde ocurre el desensamble de la cápside viral promovida por un bajo pH. La proteína de cápside L2 permanece asociada al ADN viral y media el tráfico de este por la vía red Trans-Golgi (TGN, “Trans-Golgi network”). De esta manera tiene acceso al núcleo del huésped. El virus evade el reconocimiento inmunológico de la célula gracias a que su material genético permanece en el lumen del TGN (Pippa *et al*, 2021).

El ciclo productivo se entiende en tres fases, el cual está ligado a la diferenciación celular: *A)* la primera es el establecimiento, donde se da la transcripción viral y la replicación del genoma en el núcleo celular; para la amplificación del genoma están involucradas las proteínas E1 y E2, que mantienen la expresión de este regulada y en su forma episomal (ADN viral circular no agregado al genoma del hospedero) (50 a 100 episomas por célula). *B)* La segunda fase es de mantenimiento, donde el número de episomas virales es constante para lograr una infección persistente. En esta fase, los episomas pueden permanecer durante varios años en las células epiteliales basales, generando lesiones premalignas y displasias que se pueden revertir o progresar a un cáncer invasivo. *C)* la última fase es la replicación productiva, la cual se presenta en las células diferenciadas en la superficie del epitelio. Estas células mantienen la síntesis de ADN porque su maquinaria de replicación continúa activa

gracias a las proteínas virales E6 y E7, incluso cuando no son mitóticamente activas bajo condiciones normales. El ensamblaje, la maduración y la liberación del virus está relacionado con la expresión de las proteínas L1 y L2, que se da en las capas más externas de forma no lítica (Pippa *et al*, 2021).

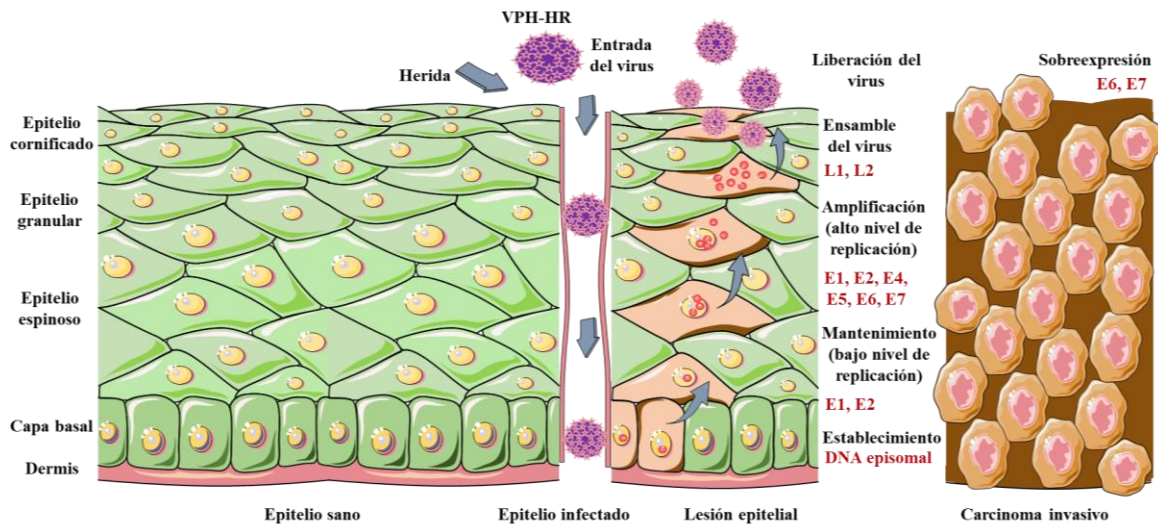


Figura 1. Proceso replicativo del VPH. Se observa la infección viral asociada con la diferenciación celular en el epitelio escamoso estratificado, mediante la entrada a través de lesiones tisulares.

Variación de VPH

Los diferentes papilomavirus se describen como “tipos”. El ORF L1 es la región más conservada dentro del genoma viral, por lo que es empleada para determinar nuevos tipos de papilomavirus. Se reconoce un nuevo tipo cada que se hace una clonación del genoma completo y esa secuencia varía en más del 10% del tipo conocido más cercano (IARC, 2007). Con ello, los VPH se clasificaron en 5 géneros: Alphapapilomavirus (α) (los que generalmente infectan la mucosa epitelial), Betapapillomavirus (β), Gammapapillomavirus (γ), Mupapillomavirus (μ) y Nupapillomavirus (ν). De igual manera, de acuerdo con su potencial oncogénico, los Alphapapilomavirus se pueden clasificar en HR (“High-Risk”), o bajo riesgo (LR, “Low-Risk”) (Muñoz-Bello *et al*, 2022). Los LR incluyen los tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81, que pueden causar lesiones genitales (condilomas/verrugas) pero no de tipo cancerosas, mientras que los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 59, 68, 73 y 82 están clasificados como HR por ser cancerígenos y

principalmente asociados al CaCu (Juneja *et al*, 2021). Estos tipos oncogénicos de Alphapapilomavirus se agrupan en especies como alpha-5 (A5), alpha-6 (A6), alpha-7 (A7) y alpha-9 (A9) (Burk *et al*, 2013).

El VPH-16, perteneciente al grupo de especies A9, causa más de la mitad de los casos de CaCu en el mundo. Tiene variantes intratípicas asociadas con la progresión de lesiones premalignas, siendo el más patógeno y el de mayor importancia médica (Burk *et al*, 2013; Antaño-Arias *et al*, 2021). Trabajos como el de Ho *et al*, (1993), fueron de los primeros en clasificar al tipo 16 en 4 linajes principales de acuerdo al origen geográfico de las poblaciones con mayor prevalencia: europea (Eu), asiática (As), asiático-americana (AA) y dos linajes africanos (Af1 y Af2). Posteriormente, Yamada *et al*, (1997) identificaron el linaje norteamericano (NA). Actualmente, con el uso de genomas completos, se identifican 4 linajes: A (europeo-asiático, EuAs), B (africano 1, Af1), C (africano 2, Af2) y D (norteamericano/asiático-americano, NA/AA) y 9 sublinajes: A1, A2, A3 (Eu), A4 (As), B1 (Af1a), B2 (Af1b), D1 (NA), D2 (AA1) y D3 (AA2) (Burk *et al*, 2013; Cornet *et al*, 2012). Los linajes son nombrados mediante códigos alfanuméricos, y el clado “A” contiene el genoma de referencia de cada tipo; se establece uno nuevo cuando las diferencias en el genoma son de 1% o más, mientras que para los sublinajes el rango de diferencias va de 0.5% a 1% (Burk *et al*, 2013).

En cuanto al VPH-18, perteneciente al grupo de especies A7, es el segundo tipo más común asociado al CaCu. Tiene presencia en 16% de los cánceres de cuello uterino a nivel mundial, aunque es menos prevalente que HPV-16 (Burk *et al*, 2013). Anteriormente, sus variantes se clasificaron de acuerdo a cambios de nucleótidos en el gen L1: europea (Eu), asiática-amerindia (AA) y africana (Af) (Ong *et al*, 1993). Después, con trabajos donde utilizaron el LCR completo y el gen E6 para análisis filogenéticos, las variantes se agruparon en tres linajes: A, B y C, con sublinajes adicionales: A1 a A5 y B1 a B3. En la nomenclatura histórica A1 y A2 corresponden a AA; A3 a A5 corresponden a E; B/C corresponden a Af (Chen *et al*, 2015).

Variación de E6

Dentro de las ocho proteínas que codifican el VPH, E6 y E7 son denominadas oncoproteínas debido a su expresión en todos los tipos, además de que sus mutaciones se asocian con una mayor progresión al cáncer. (Juneja *et al*, 2021 y Antaño-Arias *et al*, 2021).

Debido a las interacciones de E6 con diversas proteínas celulares del hospedero, estas se pueden dividir en cuatro clases: coactivadores transcripcionales, se unen a p300, myc y el factor regulador del interferón 3; proteínas implicadas en la polaridad, motilidad y muerte celular como MAGI-1 y MUPP1, supresores tumorales e inductores de apoptosis como p53 y BAK; y finalmente factores de replicación y reparación del ADN como mcm7 y MGMT (IARC, 2007).

A nivel mundial, las variantes representativas por continente ya se han identificado. Clifford *et al*, (2019) analizaron frotis cervicales positivos a VPH-16 de mujeres de 57 países, incluyendo Europa, América, Asia (parte Sur) y Oceanía. El sublinaje A1 es el más extendido, mientras que las pruebas correspondientes a África fueron las únicas donde se identificaron los sublinajes B y C. De igual manera, reportan que los sublinajes A3, A4 y D representan un mayor riesgo de desarrollar CaCu en comparación con A1. Se probó que las variantes no europeas son clave en las lesiones premalignas de alto grado (Muñoz-Bello *et al*, 2022).

Para México, se rescatan variantes de E6 del VPH-16. Específicamente en la Ciudad de México, algunos estudios reportan las siguientes: E-G131 (A1); E-G350, E-C188, E-A176 (A2); NA1 (D1), AA-a y AA-c (D2) (Berumen *et al*, 2001; Pérez-Quintanilla, 2020; Escobar-Escamilla, 2019). En estados del sur del país, como Yucatán, se reportan las variantes E-G131 (A1), E-G350 (A2), Af2 (C) y AA (D2) (González-Losa *et al*, 2004). Otro estudio realizado en Guerrero reportó 27 variantes, siendo predominantes E-G350 E-C188/G350, E-176/G350 (A2); AA-a y AA-c (D2) (Ortíz-Ortíz *et al*, 2015).

Docking molecular E6

Recientemente, los trabajos se centran en el uso del acoplamiento molecular para proponer inhibidores potenciales de la proteína E6 del VPH, tales como moléculas pequeñas con alta afinidad con miras al desarrollo de fármacos. El acoplamiento molecular, es un método bioinformático que busca aleatoriamente la mejor posición de interacción entre un ligando y

una macromolécula (blanco) a partir de sus representaciones tridimensionales. Se encuentran blancos terapéuticos (ácidos nucleicos o proteínas) en unión con posibles ligandos (fármacos, compuestos aislados, hormonas) que promuevan una actividad biológica, ya sea de activación o inhibición (Ballón-Paucara & Grados-Torrez, 2019).

Otro campo para la evaluación de moléculas interactuantes es el desarrollo de vacunas. La aplicación de vacunas contra el VPH actualmente se basa en dos tipos: las profilácticas y las terapéuticas; las primeras inducen una respuesta inmune humoral preventiva, mediada por anticuerpos específicos contra las proteínas de cápside L1 y L2 que destruyen el virus antes de que pueda penetrar en las células de la membrana basal. El segundo tipo de vacuna se basa en la inducción de componentes celulares del sistema inmune que atacan a las células infectadas por el virus, utilizando las proteínas E6 y E7 por estar constantemente expresadas en las células cancerígenas (Sanclemente, 2003). Sin embargo, en el caso de las vacunas profilácticas, estas no presentan utilidad alguna en pacientes ya infectados, y en el caso de las vacunas terapéuticas, muchas todavía se encuentran en fase experimental o son de difícil acceso para la mayoría de la población por su alto costo (Kolluru *et al*, 2019). Cabe mencionar que el aislamiento de las proteínas de cápside requiere garantizar el plegamiento adecuado para la generación de epítopes, por lo que el docking facilita la elección y ahorra tiempo en pruebas.

El costo y acceso universal a estas vacunas representa un reto en la búsqueda de nuevas terapias efectivas para la infección crónica por VPH, y es por ello que para encontrar alternativas farmacéuticas o inhibidores que actúen en las principales oncoproteínas del virus, se evalúan diferentes sustancias mediante trabajos de docking.

Actualmente, los fármacos citotóxicos, así como los tratamientos quirúrgicos, se centran en tratar verrugas genitales y lesiones precancerosas cervicales que limiten rápidamente el daño. Sin embargo, un medicamento antiviral que trate la infección de forma eficaz no ha sido descrito, lo que es fundamental para que los pacientes no desarrollen un cáncer invasivo (He *et al*, 2023).

Uno de los blancos principales de E6, es el gen supresor de tumores p53. En las primeras etapas infectivas de los VPH de alto riesgo, E7 interactúa con la proteína del retinoblastoma (PRB) para aumentar la proliferación celular, y en respuesta, p53 se sobreexpresa para detener el ciclo celular e inducir la apoptosis. Sin embargo, E6 se une a

ella con ayuda de la proteína celular E6AP (ubiquitina-proteína ligasa E3A), responsable de mediar la ubiquitinación y degradación de p53 en el proteosoma (Jave-Suárez *et al*, 2015). La unión además, es facilitada por la ubiquitina ligasa E3, a la cual se une E6 en un dominio con secuencia Lxx ϕ Lsh (L es lisina, x es cualquier aminoácido, ϕ un residuo hidrófobo, s un aminoácido con cadena lateral pequeña y h es un aminoácido con múltiples interacciones de enlaces de hidrógeno en su cadena lateral). En la interacción E6/E6-AP, el dominio LXXLL, propio del dímero, media la unión con las oncoproteínas. Este dominio contiene leucina de cinco residuos, tres de ellas de forma conservada. Cuando E6 se une con E6-AP, el complejo es capaz de juntarse con otras proteínas (además de p53), como Bak, MCM7, E6TP1 y -myc (la mayoría ya mencionadas anteriormente) y degradarlas (Tungteakkhun & Duerksen-Hughes, 2008).

Otro de los objetivos de los trabajos de docking molecular, es la identificación de posibles sitios de unión de oncoproteínas virales y el potencial terapéutico al inhibir dichas uniones. Por ejemplo, Kolluru *et al*, (2019), identificaron un dominio de unión en E6 del VPH-16 que inhibe la apoptosis en células infectadas al interactuar con la molécula adaptadora FADD (dominio de muerte asociado a Fas) y procaspasa 8 mediante la vía apoptótica extrínseca; por lo tanto la inhibición de E6-FADD/procaspasa 8 representa un posible tratamiento profiláctico. En el estudio se propone un dominio de unión de flavonol en E6 a partir de seis inhibidores previamente reportados en el estudio de Yuan *et al*, (2012). En un principio, identificaron 28 sitios de unión, pero redujeron el número de acuerdo a los valores de afinidad de los acoplamientos. Observaron que algunos de ellos se superponen entre sí y presentan aminoácidos en común; de estos, se concluyó que Leu50 y Cys51 son clave en E6 por interactuar con la mayoría de ligandos, aunque Arg102 y Arg131 también fueron interacciones frecuentes. En conclusión los aminoácidos Cys51, Leu50, Arg102, Arg131, Leu67, Val62 y Gln107 de E6 son los principales blancos de evaluación. Curiosamente, estos se superponen con los aminoácidos del dominio LXXLL; los inhibidores de este péptido inducen la apoptosis.

Wang *et al*, (2024), desarrollaron una estructura de una sola partícula del complejo ternario E6AP con E6 (VPH-16) y p53 del VPH-16; identificaron una gran interfaz de interacción proteína-proteína entre VPH-16 E6 y E6AP (que conduce a una proliferación celular descontrolada y tumorigénesis), para posteriormente incorporar el dominio central de

p53. El estudio se basó en que no se contaba con un amplio conocimiento de las interacciones E6AP y E6 fuera del péptido LXXLL, el cual estabiliza las secciones N y C- terminales de la proteína viral mediante la unión a un surco hidrofóbico en interacciones con la triada de leucina de E6AP en L(409)XXLL(413). Por ello, describieron interacciones alternativas entre E6 y E6AP más allá de las conocidas para el dominio LXXLL.

Aunque E6 y E6AP forman una interfaz contigua, Wang *et al*, (2024) la dividieron en tres segmentos: A) Sitio uno (entre los residuos E403–D426 de E6AP que incluye el dominio LXXLL), B) Sitio 2 (entre los residuos S503–Q515 de E6AP) y C) Sitio 3 (entre los residuos F467–N473 de E6AP). Al incorporar en el modelo p53, indicaron que las principales interacciones son enlaces de hidrógeno e interacciones iónicas con E6AP en R417 y R418 y con p53 en D148 y R110. Dirigir la atención a los sitios descritos, además de tomar en cuenta que hay residuos específicos de E6AP que median la ubiquitinación de p53 al mismo tiempo que se une con E6, es una propuesta para futuras terapias contra el VPH.

Fármacos y compuestos propuestos contra el VPH

Varios fármacos, así como compuestos naturales, han sido probados para inhibir las infecciones por el VPH, que apuntan principalmente a la proteína E6. Análisis *in vivo* e *in vitro* apoyan los tratamientos con compuestos naturales como la dihidrotanshinona 1, compuestos polifenólicos (CPF), el pterostilbeno, resveratrol, witaferina A, quercetina y tanshinona IIA; todos ellos con un potencial inhibitorio alto de E6 y con acción en diferentes vías celulares (Sahu *et al*, 2022). De igual manera, varios flavonoides como la luteolina han sido propuestos para inhibir la acción de p53 (Cherry *et al*, 2013). Pal & Kundu, (2019), recopilan varios compuestos naturales que se han probado son inhibidores directos de E6 y E7, como la curcumina, la berberina, la jaceosidina, la wogonina y el ácido nordihidroguaiarético. Finalmente, mediante el uso de docking molecular, Jeque *et al*, (2012) destacan la nicandrenona como potencial contra el CaCu debido a su interacción molecular con las proteínas supresoras de tumores y las oncoproteínas E6 y E7.

Sahu *et al*, (2022) hacen un recuento de algunos compuestos con potencial terapéuticos como el trióxido de arsénico (Trisenox), que provoca una desregulación de E6, pero a su vez una regulación de p53 y desencadena la detención del ciclo celular en las etapas S, G2 y M. Mencionan también que la proteína E6 regula la traducción del Factor de

Iniciación Eucariota 4E (eIF4E), que causa su sobreexpresión y una transformación tumorigénica en las células. Al respecto, fármacos como Indinavir, Ribavirin y Cidofovir inhiben eIF4E, e incluso análisis *in vitro* muestran que promueven la apoptosis y una disminución en las secreciones de las Metaloproteinasas de Matriz (MMP). En esta misma literatura se mencionan otros antivirales como el Ritonavir, Saquinavir y Nelfinavir, los cuales regulan negativamente las proteínas E6 y E7 y aumentan la expresión de p53 y la apoptosis.

En el artículo de Tan *et al*, (2012), se menciona el bortezomib (o Velcade), como un medicamento con acción en el bloqueo del proteosoma. E6, al unirse con p53 para su degradación, lo hace mediante la vía ubiquitina-proteasoma, por lo que este tipo de inhibidores son candidatos para incrementar la expresión de p53, y por lo tanto promover la apoptosis en células de carcinoma cervical. También se menciona que el lopinavir y el compuesto succinil-alanina-alanina-prolina-fenilalanina clorometil cetona (AAPF(CMK)) son inhibidores del proteasoma e inhibidores del crecimiento de queratinocitos. Además, en células SiHa infectadas por VPH-16, AAPF(CMK) inhibió su crecimiento (Duncan *et al*, 2009).

Tan *et al*, (2012) igual indican que el Valproato y la Tricostatina A son inhibidores de la Histona Deacetilasa (HDAC). Se buscan fármacos con acción sobre esta enzima porque las regiones promotoras de genes, además de ser reguladas por fosforilaciones y metilaciones, son reguladas por acetilaciones de las histonas presentes en los nucleosomas de la cromatina.

Gorshkov *et al*, (2019) enfatiza en la importancia de identificar compuestos dirigidos a los cánceres de tipo ginecológico debido a la baja supervivencia por la falta de tratamientos, aunque el CaCu usualmente se identifica en etapas tempranas y por ello se obtienen resultados más favorables que en otros. La terapia utilizada incluye agentes quimioterapéuticos como gemcitabina, cisplatino y doxorubicina, así como algunas con topotecan (inhibidor de la topoisomerasa) y bevacizumab (anticuerpo monoclonal). El problema de fármacos como el cisplatino, es que los pacientes suelen desarrollar resistencia al platino. En el estudio, se identificó el mocetinostat y entinostat como inhibidores de HDAC tanto para CaCu, cáncer de ovario y cáncer de placenta, y otros compuestos específicos del CaCu y cáncer ovario como el TG-89 y el Fredatinib; este último es un inhibidor que ha completado ensayos clínicos en tumores sólidos.

Las células con un crecimiento rápido, son más susceptibles a interrupciones del crecimiento. Distintos fármacos interrumpen la progresión en algunas etapas del ciclo, por ejemplo: 5-fluorouracilo (interrupción en la fase S), docetaxel (interrupción de la fase M) y seliciclib (interrupción de la fase G1) (Gorshkov *et al*, 2019; Focaccetti *et al*, 2015; Hennequin *et al*, 1995; Khalil *et al*, 2015). Sin embargo, aunque estos fármacos pueden ser prometedores para el tratamiento general de la expresión de oncogenes, no son blancos para la evaluación del acoplamiento molecular por la complejidad en sus interacciones. Probar reguladores de expresión (metil transferasas, HDAC, inhibidores de topoisomerasa o moduladores de la progresión del ciclo celular), implica la evaluación simultánea de cientos de blancos, por lo que son excluidos de este análisis sin demeritar su potencial terapéutico. Para este trabajo, se utilizarán bloqueadores específicos de la unión E6 con blancos celulares.

Dentro de este marco, algunos trabajos recientes utilizan metodologías *in silico* con el fin de identificar compuestos dirigidos a la inhibición entre las interacciones específicas de E6 con otras proteínas celulares, como lo son E6AP y p53. Se realizan búsquedas de compuestos estructuralmente relacionados a fármacos con actividad en células positivas a VPH (Ricci-López *et al*, 2019; Soumia *et al*, 2022), o bien, se recopilan aquellos que van dirigidos a sitios conservados en las proteínas (He *et al*, 2023). Mediante programas computacionales de docking molecular, se proponen compuestos que evitan potencialmente las interacciones y la proliferación celular. Aunado a esto, la urgencia por desarrollar tratamientos ante enfermedades emergentes derivó en nuevas estrategias como la reutilización de fármacos ya aprobados para acelerar este proceso. Los modelados de proteínas diana y la identificación de un espacio en 3D tienen un papel importante en las primeras etapas del desarrollo de medicamentos (Chen *et al*, 2024).

Chen *et al*, (2024) identificaron antivirales, fármacos reutilizados y moléculas de colorante como propuesta contra E6, que al mismo tiempo son activos contra otras proteínas como 3a y E del SARS-CoV y SARS-CoV-2. En el acoplamiento general de este estudio, los principales candidatos para E6 fueron la Suramina y el Isometamidio en la categoría de ligandos colorantes; Lopinavir y Pradimicina A en la categoría de fármacos reutilizados; y Benzamilo como el mejor antiviral.

Además del docking molecular, otros métodos computacionales son útiles para identificar candidatos contra el VPH. Ahmed *et al*, (2023) mediante una construcción de

redes fármaco-diana, reportaron 142 posibles fármacos que atacan diferentes vías del CaCu, además de proponer 13 combinaciones con actividad anticancerígena. Mencionaron que 51 compuestos de los 147 ya son utilizados como terapia contra este tipo de cáncer y 33 tienen actividad antiviral y son propuestas de tratamiento.

JUSTIFICACIÓN

El VPH, específicamente los tipos 16 y 18, se han relacionado con la mayoría de los casos de cáncer Cérvicouterino en el mundo. La mayor patogénesis se produce por la acción de las proteínas E6 y E7 durante la fase temprana, ya que pueden inhibir la presentación de antígenos en el complejo mayor de histocompatibilidad I, eliminar la capacidad pro-apoptótica del sistema inmunológico mediante interacción con P53 y otros promotores, además de inducir la división celular de los epitelios infectados para incrementar la carga viral con consecuencias neoplásicas. E6 es uno de los principales objetivos farmacológicos en el desarrollo de vacunas contra el VPH, así como de tratamientos que buscan la inhibición en su interacción con otras proteínas de las células huésped. Sin embargo, no se ha considerado ampliamente la variación en las secuencias de estos genes ni los cambios estructurales en la proteína que pudieran modificar su capacidad infecciosa. Analizar las diferentes variantes y su acoplamiento con distintos fármacos, propone mejorar sustancialmente la eficiencia de los tratamientos al considerar las interacciones y la afinidad puntual para cada una.

Por ello, este trabajo aportará información relevante para el desarrollo de tratamientos que puedan inhibir la neoplasia desde los primeros indicios de lesiones Cérvicouterinas al ser más específicas para cada variante, así como enfocarse en aquellas que circulan y tienen mayor relación con una progresión al cáncer entre la población. Por lo tanto, las principales beneficiarias, en el largo plazo, son pacientes femeninas diagnosticadas con lesiones cervicales de alto y bajo grado, y en el corto plazo doctores que requieran un tratamiento diferencial y fabricantes de fármacos, ya que se hacen modificaciones en el diseño de antivirales y medicamentos como propuesta farmacológica asociada al tratamiento por VPH.

HIPÓTESIS

La medicina personalizada propone métodos diferenciales de tratamiento dependiendo de la variación en el paciente, el ambiente o el agente etiológico. Sin embargo, poco se conoce del efecto de las variaciones del gen E6 de los VPH de alto riesgo en su interacción con los blancos moleculares durante los procesos de infección viral. Es por ello, que si estas proteínas en complejo con distintos fármacos de acción antiviral muestran una relación diferencial, entonces el comportamiento particular de estas moléculas dada su variación permitiría proponer un tratamiento específico para el agente etiológico, y permitirá proponer mejoras en la conformación química del fármaco al contemplar las interacciones biológicas con sus dianas celulares.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la variación natural de la proteína E6 del VPH 16-18 en sus variantes mexicanas sobre el acoplamiento molecular de fármacos y el ligando celular más estudiado susceptible de inhibición E6AP, mediante modelado *in silico* para establecer posibles tratamientos personalizados.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener todas las variantes estructurales reportadas para la proteína E6 de los tipos de VPH mayormente asociados a oncogénesis (16 y 18) en México, mediante una búsqueda exhaustiva en bases de datos que permita establecer la totalidad de variantes en circulación de estas moléculas.
2. Obtener la estructura tridimensional de fármacos propuestos contra VPH mediante investigación bibliográfica, así como una recopilación en distintas bases de datos que permita establecer las interacciones moleculares entre estas sustancias y la proteína viral y proponer un tratamiento específico para cada una.
3. Evaluar la interacción entre E6AP y las variantes de E6 mediante modelado de acoplamiento molecular, para realizar modificaciones de los fármacos antivirales que potencien la inhibición entre E6 y la molécula diana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Búsqueda de fármacos con actividad antiviral y anticancerígena

Se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica exhaustiva con el fin de hacer una selección de fármacos con actividad antiviral y/o anticancerígena conocida. La recopilación se centró en fármacos previamente utilizados en el tratamiento de pacientes con CaCu, así como en medicamentos potencialmente candidatos para el tratamiento contra el VPH o que presentan reacción cruzada por utilizarse como tratamiento con otros virus. La estructura tridimensional de dichos fármacos y algunas moléculas con actividad asociada, se obtuvieron en la base de datos PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Todos los compuestos evaluados están aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés). Sin embargo, aun así se realizó un análisis con base en la “Regla de cinco” de Lipinski y una predicción de toxicidad para cada uno. Ambos análisis se llevaron a cabo en el servidor ProTox-II (<https://tox.charite.de/protox3/>).

La regla de Lipinski establece 5 parámetros para que una molécula tenga una biodisponibilidad oral beneficiosa: ≤ 5 donantes de enlaces de hidrógeno, ≤ 10 aceptores de enlaces de hidrógeno, peso molecular < 500 Daltons y lipofilicidad (Log P) < 5 . Estas pautas ayudan a cumplir con los parámetros ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción), ya que se centran en mejorar la solubilidad y permeabilidad de la membrana (Hajji *et al*, 2022). Por otro lado, la predicción de toxicidad evalúa los rubros de hepatotoxicidad, carcinogenicidad, inmunotoxicidad, mutagenicidad y citotoxicidad.

Búsqueda estructural de moléculas blanco del VPH

Mediante una búsqueda exhaustiva en la literatura, se identificaron una serie de blancos celulares conocidos a los que E6 de los VPH-16 y 18 se unen para modular la apoptosis y el ciclo celular, entre ellas proteínas con un dominio PDZ (MAG-1, MUPP1), USP15, BAK, E6AP, P53, FADD y AIF, algunas de ellas ya reportadas previamente (Kolluru *et al*, 2019; Lee *et al*, 2000; Vos *et al*, 2009; Thomas & de Lawrence, 1998; Shimada *et al*, 2020; Wang *et al*, 2024). Sin embargo, para este estudio se trabajó únicamente con el blanco proteico E6AP, debido a que se ha estudiado ampliamente cómo la interacción de E6 con E6AP es clave para destruir p53 y promover la proliferación celular (Sahu & Khare, 2022).

La estructura de la proteína se obtuvo mediante la base de datos RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>). Sin embargo, debido a que se encuentran en complejo con la oncoproteína E6 (ID [4GIZ](#)), se limpió la estructura en el programa UCSF Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) para únicamente obtener la cadena de interés.

Búsqueda de variantes virales

Mediante una recopilación en la literatura, se consideraron variantes genómicas de los tipos de VPH-HR (16 y 18) con mayor incidencia en México, asociadas con el desarrollo de lesiones premalignas o con una fuerte tendencia al cáncer. La información obtenida se contrastó con las variantes reportadas en el portal de “La Episteme del Virus del Papiloma” (PaVE)(<https://pave.niaid.nih.gov/index>), específicamente de las especies de Alphapapilomavirus 7 y 9, donde se encuentran algunos IDs de las secuencias reportadas por Burk, Harari & Chen (2013). Seis y dos secuencias (VPH 16 y 18 respectivamente) se tomaron directamente de la página de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), las cuales se alinearon y compararon entre sí en el programa UCSF Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>), con el fin de identificar las regiones o residuos que cambian con respecto a las proteínas de referencia. Las variantes se seleccionaron y se abordaron en consonancia con la nomenclatura previa de linajes, aunque se conoce y se hace referencia a lo largo del trabajo a la clasificación actual con análisis filogenéticos del genoma completo y la proteína E6 que agrupa y nombra de forma diferente los linajes principales.

Tabla 1. Variantes seleccionadas del VPH-16/18 con incidencia en México.

VARIANTES VPH-16		
Variante	Código de acceso	Citas
E-G350	AGS42265.1	Ortiz-Ortiz <i>et al</i> , 2015. Muñoz-Bello <i>et al</i> , 2022. Berumen <i>et al</i> , 2001. Lizano <i>et al</i> , 2006. Zacapala-Gómez <i>et al</i> , 2016.
AA-a	AAO 85408.1	
E-G131	AAQ 10712.1	

AA-c	AF404706.1	Rodríguez-Ruiz <i>et al</i> , 2019.
E-C188/G350	ACK57853.1	
E-A176/G350	AAV91676.1	
VARIANTES VPH-18		
Variante	Código de acceso	Citas
Af	ABP99776.1	Lizano <i>et al</i> , 2006. Fragoso-Ontiveros <i>et al</i> , 2012.
E	ABP99760.1	

La conformación tridimensional de la proteína E6 del VPH-16 de referencia fue obtenida en la base de datos RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) con el código de acceso [4GIZ](#). Esta estructura se encuentra en complejo con la ubiquitina ligasa E6AP, por lo que fue necesario eliminar las cadenas no pertenecientes a E6, así como remover los residuos y átomos mediante el software UCSF ChimeraX 1.8 (<https://www.rbvi.ucsf.edu/chimerax/>). El procedimiento fue el mismo para la proteína E6 de referencia del VPH-18, con código de acceso [6SJV](#).

Predicción estructural de la proteína E6 para cada variante

Una vez descargadas las secuencias de las variantes elegidas, en total se diseñaron ocho predicciones estructurales para E6 de los VPH 16 y 18. El modelado tridimensional de las proteínas se llevó a cabo en la plataforma SwissModel (<https://swissmodel.expasy.org/>) y la verificación de ellas se basó en dos evaluaciones: gráfico de Ramachandran y valor de factor de calidad general (ERRAT), ambos mediante el uso del servidor de validación de estructuras SAVESv6.1 (<https://saves.mbi.ucla.edu/>). Para definir si existían cambios estructuralmente visibles entre los modelos de las variantes se utilizó el programa UCSF ChimeraX 1.8 (<https://www.rbvi.ucsf.edu/chimerax/>), en donde se elaboró un traslape de todas las estructuras propuestas y la proteína E6 de referencia según el tipo viral al que correspondía cada variante.

Docking molecular

Para realizar una propuesta de tratamiento robusta y específica para una infección por VPH-HR, se hicieron dos fases de acoplamiento molecular: 1) Interacción fármaco-proteína y 2) Interacción proteína-proteína.

Fase 1. Interacción fármaco-proteína

La primera fase de acoplamiento se llevó a cabo entre las estructuras predichas para la proteína E6 y las estructuras en 3D de los fármacos mediante el uso del programa AutoDock Vina (<https://vina.scripps.edu/>) para seleccionar candidatos inhibidores de la interacción entre el hospedero y la proteína viral de acuerdo a los valores de afinidad, número y tipo de interacciones que se presentan en el sitio de unión. Se ubicó el sitio activo ligando-proteína a partir de la hendidura de unión entre E6 y E6AP reportado en la bibliografía (Huibregtse *et al*, 1993), lo que también permitió observar si las modificaciones en los residuos de las proteínas alteraban la región interactuante o se conservaba a pesar de las variaciones. El análisis detallado de las interacciones intermoleculares se realizó únicamente con los fármacos de mayor afinidad en el programa BIOVIA Discovery Studio Visualizer (<https://www.3ds.com/products/biovia/discovery-studio/visualization>). Se consideró una distancia de 5Å para discriminar las interacciones atómicas válidas y relevantes a nivel biológico (punto de corte óptimo), ya que es el umbral más robusto para establecer contactos reales independientemente del campo de fuerza y tamaño de las proteínas (Salamanca-Viloria *et al*, 2017). Sin embargo, las interacciones π ocurren a través de nubes electrónicas deslocalizadas y tienden a un radio de acción mayor, por lo que se dio flexibilidad a interacciones <6Å, como lo establecen estándares de software de interacción (<https://github.com/pharmai/plip/blob/master/DOCUMENTATION.md>). En el caso de los puentes de hidrógeno se consideró una distancia por debajo de 3.8Å para especificidad (Khazanob & Carlson, 2013).

Fase 2. Interacción proteína-proteína

La segunda fase de acoplamientos se llevó a cabo entre la proteína viral E6 (todas las estructuras modeladas y la de referencia) y el blanco molecular E6AP (estructura 3D previamente preparada) utilizando el servidor AlphaFold Server (<https://alphafoldserver.com/welcome>). Los resultados de la interacción y posición en 3D se

analizaron con el programa UCSF ChimeraX 1.8 (<https://www.rbvi.ucsf.edu/chimerax/>) y BIOVIA Discovery Studio Visualizer (<https://www.3ds.com/products/biovia/discovery-studio/visualization>).

Modificación estructural de fármacos

Una vez elaboradas las propuestas de los tratamientos para una infección específica por alguna variante de los VPH de alto riesgo (16 o 18) y haber analizado toda la interfaz de interacciones en cada acoplamiento, se realizó una propuesta de modificación para la estructura química de los fármacos seleccionados con mayor afinidad de unión, para ambas cepas, con el objetivo de proponer nuevos compuestos con mayor actividad contra E6. Esta modificación se llevó a cabo mediante el software MarvinSketch (Marvin 17.21.0, Chemaxon) (<https://www.chemaxon.com>). Debido a que los puentes de hidrógeno son enlaces que confieren rigidez a la estructura de las proteínas y especificidad en las interacciones intermoleculares (Hubbard & Kamran-Haider, 2010), las modificaciones de los grupos funcionales en los medicamentos se dirigieron al aumento en la formación de dichos enlaces, lo que a su vez mejoraría la afinidad de unión. De los diferentes métodos que existen para la optimización de estructuras modificadas, se utilizaron los semiempíricos mediante el software TmoleX2023, TURBOMOLE 7.8, TURBOMOLE GmbH, (<http://www.turbomole.com>).

Para evaluar la actividad biológica ADME de los fármacos modificados se consideró la regla de Lipinski y los parámetros de hepatotoxicidad, carcinogenicidad, inmunotoxicidad, mutagenicidad y citotoxicidad, mediante el software ProTox-II (<https://tox.charite.de/protox3/>), tal como se probó previamente con los fármacos en uso.

Docking molecular de las variantes + fármacos modificados

Se realizó un acoplamiento adicional entre los fármacos modificados y todas las variantes E6 del VPH-16 y VPH-18 con el software AutoDock Vina (<https://vina.scripps.edu/>), con el fin de proponer un tratamiento más efectivo y respaldado por valores de afinidad superiores entre ambas estructuras. El análisis detallado de las interacciones se realizó únicamente con aquellos que obtuvieron mejores resultados, en el programa BIOVIA Discovery Studio Visualizer (<https://www.3ds.com/products/biovia/discovery-studio/visualization>).

Interacción proteína-fármaco modificado-proteína

Para analizar de forma integral la acción de los fármacos seleccionados (fueran modificados o de uso actual) como inhibidores de la unión entre E6 y E6AP, se superpusieron las estructuras de los docking anteriormente realizados. Es decir, se utilizaron los resultados de los complejos “proteína viral-fármaco” y “proteína viral-proteína blanco” mediante el uso de la herramienta “MatchMaker” en el programa UCSF ChimeraX 1.8 (<https://www.rbvi.ucsf.edu/chimerax/>), ya que se alinean las secuencias por pares y se generan coincidencias para superponer las estructuras (UCSF Computer Graphics Laboratory, 2015).

RESULTADOS

Listado de fármacos con potencial, estructura y toxicidad

Una búsqueda inicial de fármacos con potencial antiviral y/o anticancerígeno arrojó más de 100 resultados, de los cuales únicamente se seleccionaron 20 por su potencial inhibitorio contra la proteína E6 del VPH previamente reportado.

Tabla 2. Listado de los fármacos elegidos que tienen potencial anticancerígeno contra los VPH-16/18 y su código de acceso a PubChem.

Fármaco	ID	Clave de compuesto	Función	Cita
Cidofovir	60613	a	Antiviral en el tratamiento contra citomegalovirus en pacientes con SIDA.	Snoeck <i>et al</i> , 1999
Nelfinavir	64143	b	Tratamiento contra el VIH y propiedades anticancerígenas	Sahu <i>et al</i> , 2022
Levotiroxina	23666112	c	Antiinflamatorio	Faheem <i>et al</i> , 2023
Metadona	4095	d	Antiinflamatorio	Faheem <i>et al</i> ., 2023
Indinavir	5362440	e	Inhibidor de la proteasa del VIH	Sharma <i>et al</i> , 2016
Ribavirin	37542	f	Antiviral, antimetabolito y antiinfeccioso	Borden & Culijkovic-Kraljadic, 2010
Lidocaína	3676	g	Anestésico	Faheem <i>et al</i> ,

				2023
Lovastatina	53232	h	Modulador de dislipidemias	Faheem <i>et al</i> , 2023
Benzamilo	108107	j	Bloquea canales epiteliales de sodio	Chen <i>et al</i> , 2024
Bit225	12004418	k	Antiviral en el tratamiento contra el VIH y la Hepatitis C	Chen <i>et al</i> , 2024
Darapladib	9939609	l	Inhibidor de fosfolipasa AII (LPPA II)	Chen <i>et al</i> , 2024
Flumatinib	46848036	m	Actividad antineoplásica contra la leucemia	Chen <i>et al</i> , 2024
Pravastatina	54687	n	Modulador de dislipidemias	Faheem <i>et al</i> , 2023
Belinostat	6918638	o	Actividad antineoplásica inhibidor de la HDAC	Faheem <i>et al</i> ., 2023
Vorinostat	5311	p	Anticancerígeno inhibidor de la HDAC e inductor de la apoptosis	Faheem <i>et al</i> ., 2023
Benzotriazol	7220	r	Antiviral, antifúngico, antibacteriano y antiinflamatorio	Mohan <i>et al</i> , 2023
Valganciclovir	135413535	s	Antiviral contra citomegalovirus en personas con SIDA	Kumar <i>et al</i> , 2020
Citarabina	6253	t	Anticancerígeno contra la leucemia	Kumar <i>et al</i> ., 2020
Fludarabina	657237	u	Tratamiento de neoplasias hematológicas	Chen <i>et al</i> , 2024
Ácido valproico	3121	v	Inhibidor de HDAC y otros	Fahemm <i>et al</i> , 2023

Los resultados de la evaluación farmacocinética de todos los compuestos se muestran en la Tabla 3, donde se indican los valores que comprueban que todos cumplen con al menos tres de los criterios establecidos en “La Regla de cinco de Lipinski” para asegurar una buena absorción oral (Hajji *et al*, 2022). En cuanto al perfil de toxicidad, ocho compuestos presentan hepatotoxicidad “activa”.

Tabla 3. Regla de Lipinski de similitud con fármacos (*) y perfil de hepatotoxicidad.

Clave del compuesto	*Peso molecular (<500 DA)	*No. de enlaces rotativos (<15)	*No. de donantes de enlaces de hidrógeno (<5)	*No. de aceptores de enlaces de hidrógeno (<10)	*Lipofiliidad (LOGP <5)	Violaciones	Toxicidad (enfoque hepatotóxico)
---------------------	---------------------------	---------------------------------	---	---	-------------------------	-------------	----------------------------------

a	279.19	6	4	7	-0.60	0	Inactivo
b	567.78	12	4	8	5.47	2	Inactivo
c	776.87	5	3	5	2.89	1	Activo
d	309.45	7	0	2	3.42	0	Inactivo
e	613.79	14	4	9	3.52	0	Activo
f	244.20	3	4	7	0.35	0	Inactivo
g	234.34	6	1	2	2.86	0	Activo
h	404.54	7	1	5	4.2	0	Inactivo
j	319.75	5	4	4	0.87	0	Inactivo
k	293.32	3	2	3	1.91	0	Activo
l	666.77	15	0	6	7.22	2	Inactivo
m	562.59	9	2	9	5.03	1	Activo
n	424.53	11	4	7	2.44	0	Inactivo
o	318.35	6	3	4	0.61	0	Inactivo
p	264.32	10	3	3	1.84	0	Inactivo
r	119.12	0	1	2	0.59	0	Activo
s	354.36	9	4	8	0.72	1	Inactivo
t	243.22	2	4	6	0.99	0	Activo
u	285.23	2	4	8	0.88	0	Inactivo
v	285.23	2	4	8	0.88	0	Activo

Análisis estructural del blanco molecular

De la estructura cristalina en rayos X de E6AP reportada en heterodímero (ID [4GIZ](#)), se informa que el principal sitio de interacción con E6 es a través de regiones ácidas ricas en leucina (Charged Leucine Motif), específicamente la secuencia LXXLL, donde L es leucina y x corresponde a cualquier aminoácido. Esta sección forma una estructura hélice alfa anfipática, donde los residuos de leucina hidrofóbicos se agrupan en una cara de la hélice, mientras que los residuos circundantes (aminoácidos cargados negativamente) se sitúan en la otra cara (Bohl *et al*, 2000) . El péptido LXXLL es esencial para la interacción proteína-proteína, el reclutamiento de p53 y estimular su ubiquitinación (Zanier *et al*, 2013). Se identificó en esta zona los residuos ricos en leucina mencionados, tal como se visualiza en la Figura 2.

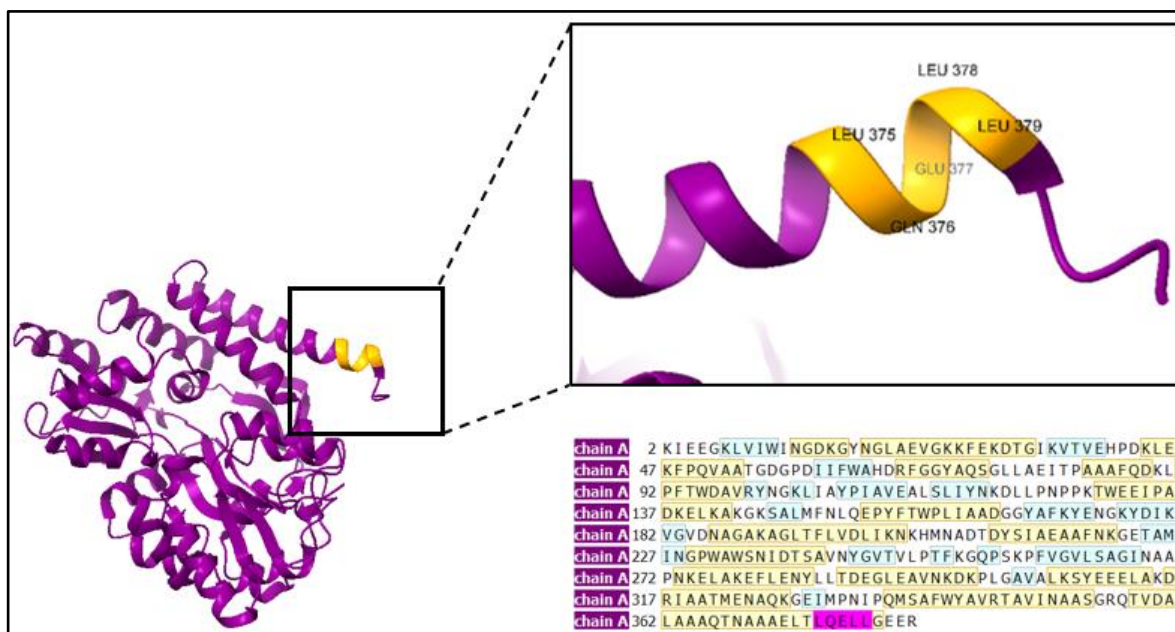


Figura 2. Estructura de la cadena A de la Ubiquitina-proteína ligasa E3A (E6AP): Se amplía la región del péptido LXXLL que interactúa con E6. En la parte inferior derecha de la imagen se indica la secuencia de aminoácidos que la conforman y se resalta en color rosa el segmento de interés.

Descripción y análisis estructural de las variantes de E6

De las variantes reportadas para México de VPH-HR, se seleccionaron 6 correspondientes al tipo 16 y 2 del tipo 18 (Tabla 1).

Como se observa en las Figuras 4 y 6, las proteínas E6 son de tamaño pequeño (aproximadamente 150 aminoácidos), forman una estructura tipo mancuerna y sus extremos N- y C-terminales tienen dominios de unión a zinc (dedos de zinc). Estos extremos se conectan por un péptido de enlace α -helicoidal, que en conjunto forman una hendidura hidrofóbica, donde el péptido LXXLL de E6AP hace contacto (Vande-Pol & Klingelutz, 2013). Se reporta que en la hendidura de unión de E6, la eliminación de 18 aminoácidos en la parte central de la proteína es clave para evitar la actividad con E6AP y p53 (Huibregtse *et al*, 1993). Por ello, al no observar cambios estructurales visibles en el modelado de las proteínas, se delimitó dicha hendidura como objetivo farmacológico para el acoplamiento con fármacos. Esto se aplicó tanto para las proteínas del VPH-16 como para las de VPH-18 (Figuras 4A y 6A). La predicción en 3D de las variantes del tipo 16 (Figura 3) mostró que

visualmente las estructuras son similares, además que el solapamiento de todas ellas con la E6 de referencia lo confirmó (Figura 4A). Del mismo modo, para el VPH-18, el solapamiento entre la proteína de referencia y las dos variantes modeladas (Figura 6A) muestra que la variación en las secuencias de aminoácidos tampoco genera cambios considerables en las estructuras.

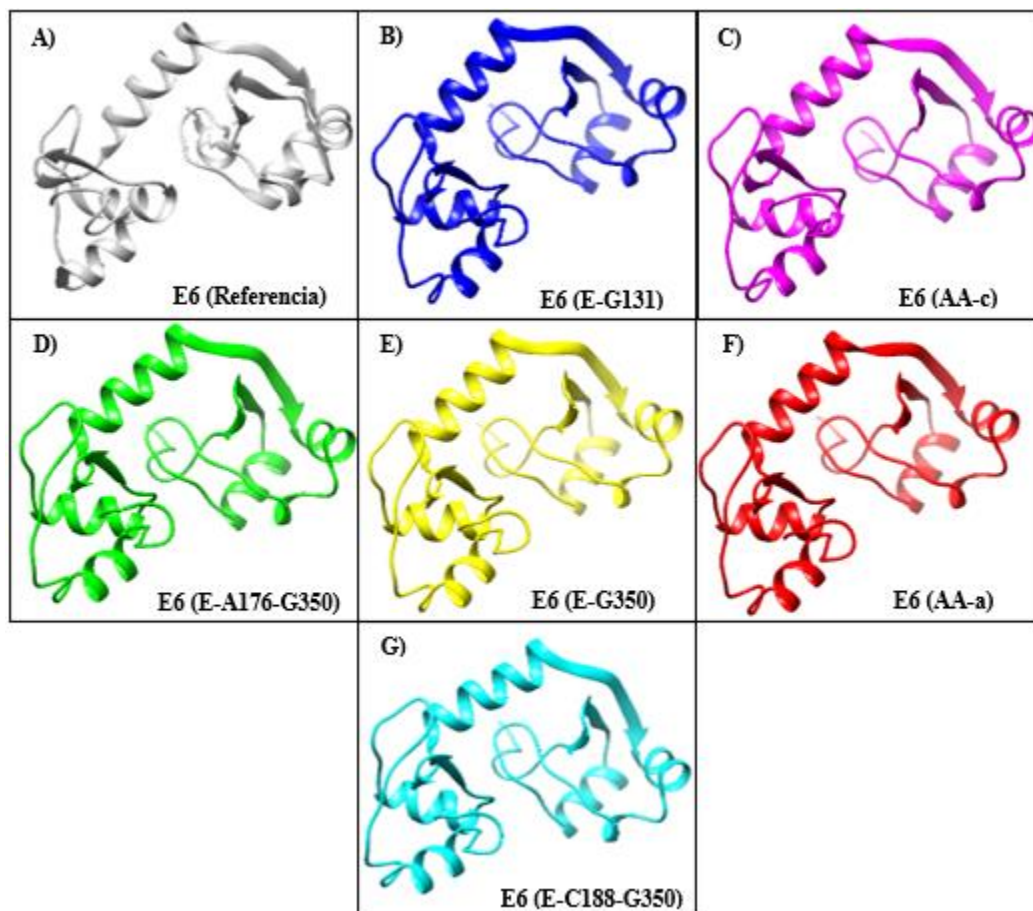


Figura 3. Modelado en 3D de las seis variantes del VPH-16 con mayor incidencia en México.

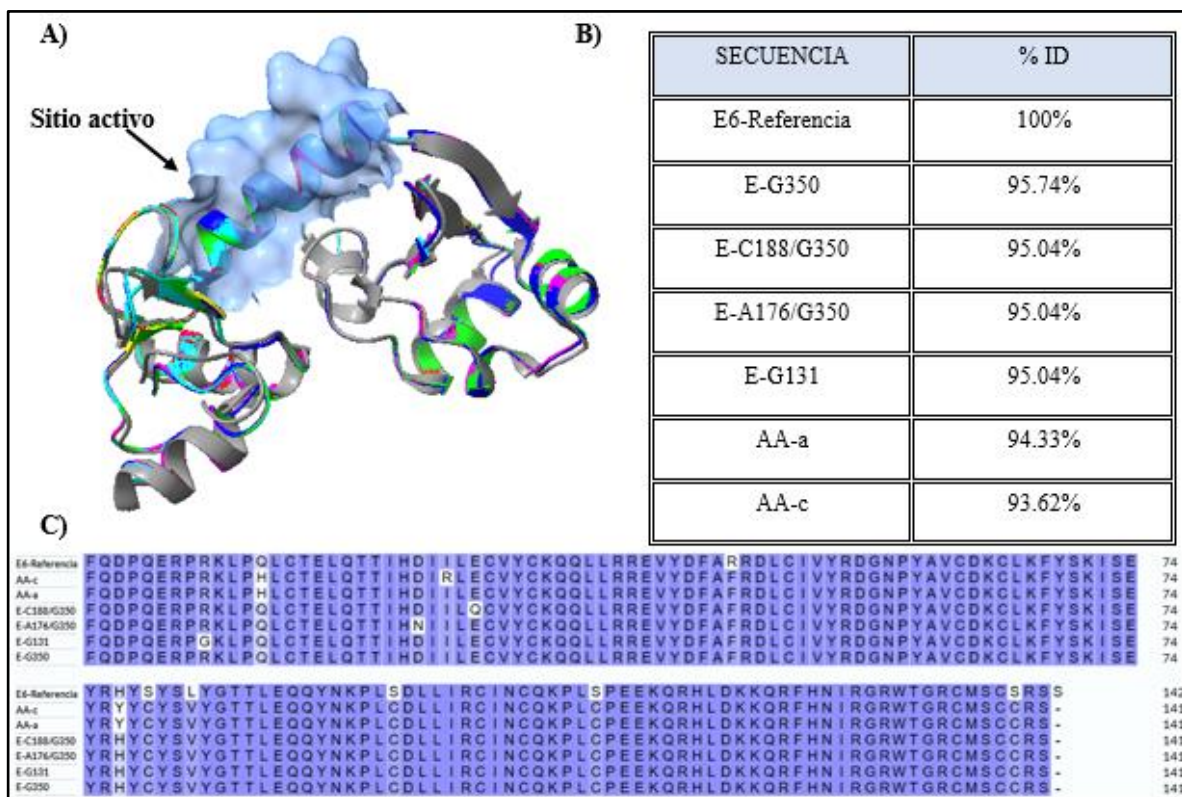


Figura 4. Empalme de las variantes modeladas de E6 del VPH-16 con relación a la proteína E6 de referencia. A) Sobrelapamiento de las estructuras en 3D con respecto a la referencia en color gris: se señala que el sitio activo de unión permanece a pesar de los cambios en las posiciones de los aminoácidos. B) Tabla de porcentajes de identidad entre la secuencia de referencia y las secuencias de las variantes. C) Alineación de todas las secuencias en color azul. Las letras sin color resaltan las mutaciones no sinónimas.

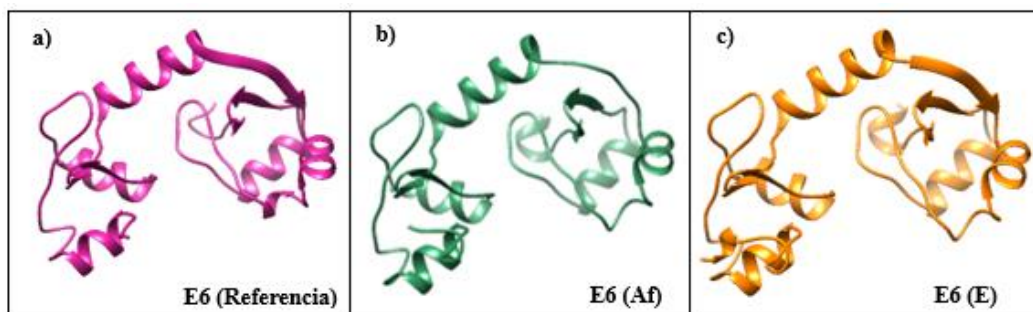


Figura 5. Modelado en 3D de las dos variantes del VPH-18 con mayor incidencia en México.

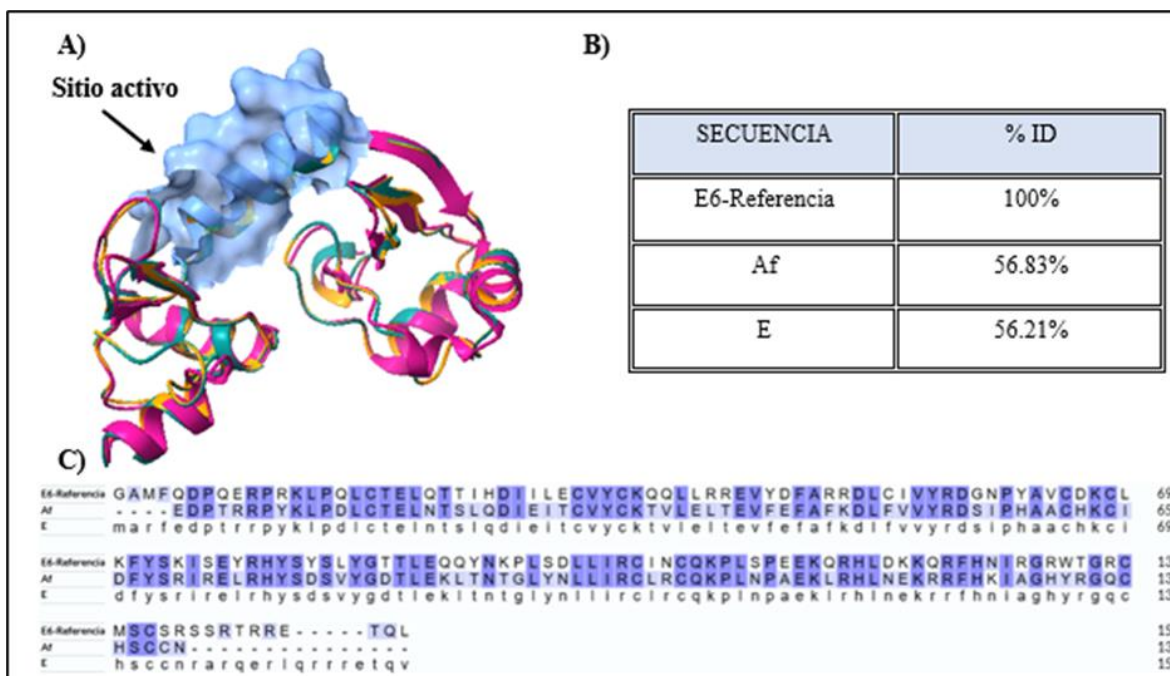


Figura 6. Empalme de las variantes modeladas de E6 del VPH-18 con relación a la proteína E6 de referencia. A) Sobrelapamiento de las estructuras en 3D con respecto a la referencia en color rosa: se señala que el sitio activo permanece como bolsillo de unión a pesar de los cambios en las posiciones de los aminoácidos. B) Tabla de porcentajes de identidad entre la secuencia de referencia y las secuencias de las variantes. C) Alineación de todas las secuencias en color azul. Las letras sin color resaltan las mutaciones no sinónimas.

En la alineación de las secuencias (Figura 4C) todas las variantes del VPH-16 presentan modificaciones no sinónimas (cambios en los aminoácidos), principalmente en los extremos amino y carboxilo terminal. De hecho, hay cinco cambios de aminoácidos que se conservan en todas las variantes: F46, V82, C96, C110, C139. La proteína con menos variaciones con respecto a E6 de referencia fue E-G350 (>95% de identidad), ya que sus cambios solo son estas cinco posiciones. Por otro lado, E-G131, E-C188/G350 y E-A176/G350 obtuvieron el mismo valor de identidad (95.04%) con respecto a la de referencia. También tienen las cinco posiciones conservadas, pero cada una presenta cambios propios: E-G131 en C79 y G9, E-C188/G350 en Q28 y E-A176 en N24.

Las variantes AA-a y AA-c con porcentajes de identidad de 94.33 y 93.62%, respectivamente, además de coincidir con las cinco mutaciones generales, ambas conservan dos cambios más en H13 y Y77; AA-c además cambia en R26.

En cuanto a las dos variantes del VPH-18, ambas tienen un porcentaje de identidad bajo con respecto a la de referencia (~50%) (Figura 6B), tienen cambios numerosos en su secuencia (mutaciones no sinónimas), pero al igual que en las variantes del VPH-16, el desorden estructural no modifica el sitio activo. La variante Af tiene segmentos faltantes o cortes en los extremos de su secuencia, ya que en general es la proteína más pequeña que se modeló (Figura 6C).

Las estructuras de las variantes se evaluaron para comprobar la calidad de los modelos. El primer análisis se realizó con ERRAT, que señala el valor de calidad general para las interacciones atómicas no enlazadas. Valores más altos indican que la calidad es mayor. Se considera que el rango aceptado de las puntuaciones debe ser >50 para ser un modelo de alta calidad (Omar *et al*, 2018). Todas las estructuras de las proteínas E6 del VPH-16 mostraron valores de 100, lo que demuestra que son modelos aceptables (Figura 7). El segundo análisis se realizó con el gráfico de Ramachandran, el cual predice las propiedades estereoquímicas estructurales (Figura 8). En la Tabla 4 se muestra que el 94.5% de los residuos de todas las estructuras del VPH-16 caen dentro de las regiones favorables. Estos resultados son positivos por la alta cantidad de residuos en zonas favorecidas (>90%) (Omar *et al*, 2018) y la ausencia de residuos en regiones no permitidas (Agnihotry *et al*, 2022).

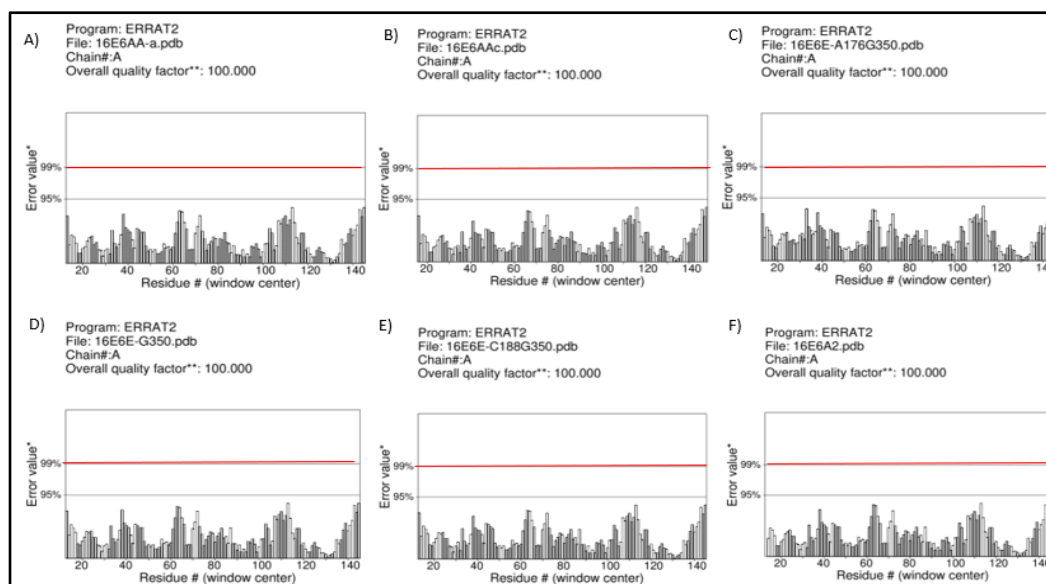


Figura 7. Gráficos de Errat para los modelos E6 del VPH-16, todas las estructuras con un valor de calidad general de 100: *A)* Evaluación de la variante AA-a; *B)* Evaluación de la variante AA-c; *C)* Evaluación de la variante E-A176-G350; *D)* Evaluación de la variante E-G350; *E)* Evaluación de la variante E-C188-G350; *D)* Evaluación de la variante E-G131.

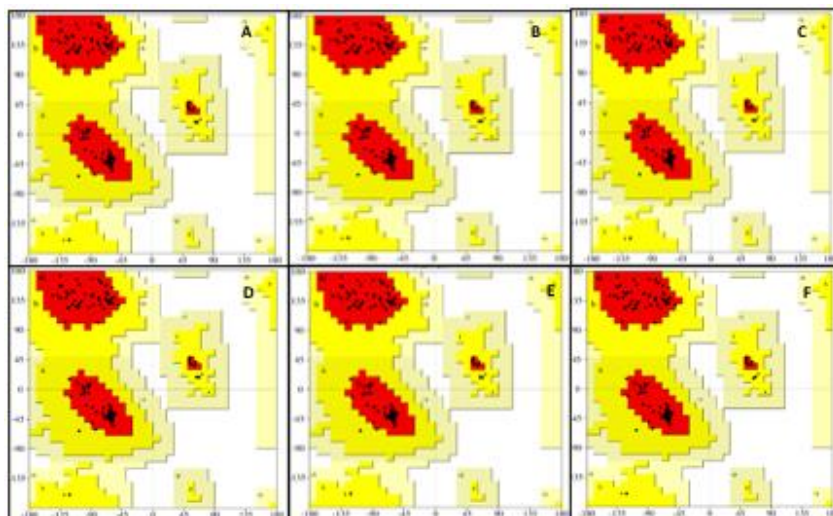


Figura 8. Gráficos de Ramachandran de las estructuras predichas para VPH-16: A) Variante AA-a; B) Variante AA-c; C) Variante E-A176-G350; D) Variante E-G350; E) Variante E-C188-G350; F) Variante E-G131.

Tabla 4. Porcentajes de residuos de aminoácidos en cada región del gráfico de Ramachandran para las variantes del VPH-16.

Modelo de variante	Favorecidas	Permitidas	Generosamente permitidas	No permitidas
AA-a	94.5	5.5	0.0	0.0
AA-c	94.5	5.5	0.0	0.0
E-A176-G350	95.5	5.5	0.0	0.0
E-G350	94.5	5.5	0.0	0.0
E-C188-G350	94.5	5.5	0.0	0.0
E-G131	94.5	5.5	0.0	0.0

Las dos variantes E6 del VPH-18 obtuvieron una valoración menor en ambos análisis, pero de igual manera fueron aceptables. Los valores de puntuación de calidad general en ERRAT para lambas fue >97, como se muestra en la Figura 9. Para el análisis del gráfico de Ramachandran (Figura 10), el modelo con más baja validación corresponde a la variante Af (Tabla 5).

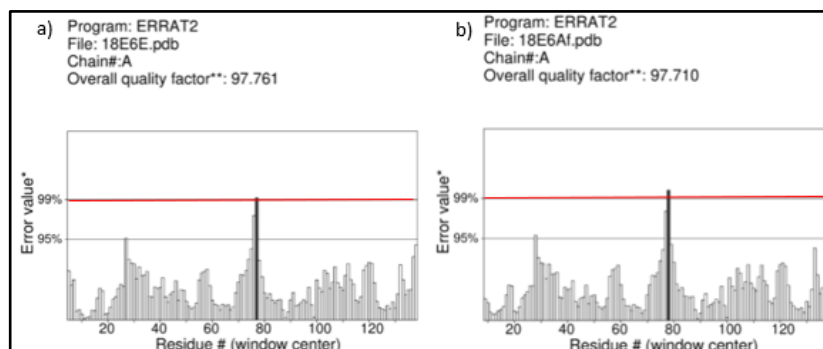


Figura 9. Gráficos de Errat para los modelos E6 del VPH-18, todas las estructuras con un valor de calidad general >97: a) Evaluación de la variante Af; b) Evaluación de la variante E.

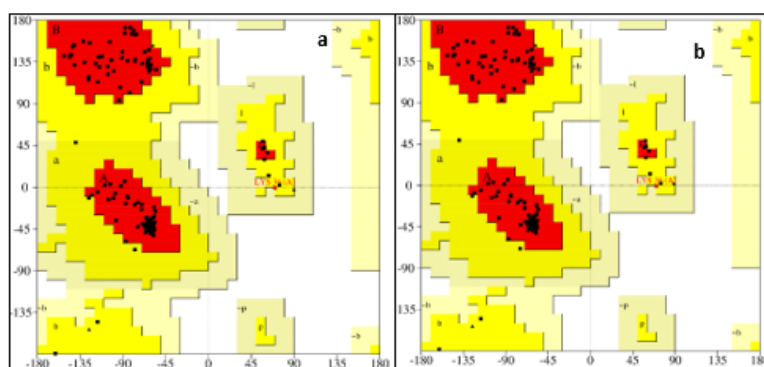


Figura 10. Gráficos de Ramachandran de las estructuras predichas para VPH-18: a) Variante Af; b) Variante E.

Tabla 5. Porcentajes de residuos de aminoácidos en cada región del gráfico de Ramachandran para las variantes del VPH-18.

Modelo de variante	Favorecidas	Permitidas	Generosamente permitidas	No permitidas
Af	92.9	6.3	0.8	0.0
E	93.1	6.2	0.8	0.0

Docking molecular fármacos + variantes de E6

El modelado de las proteínas mostró que los cambios en las secuencias de los aminoácidos de las variantes no generan cambios estructurales. Sin embargo, aun así se realizó el primer acoplamiento con todos los fármacos seleccionados y las proteínas modeladas en una interfaz

completa, es decir, no solo se consideró el sitio activo si no cualquier punto posible de unión, con el objetivo de conocer si las variaciones, más allá de no tener cambios visibles, pudieran presentar modificaciones alostéricas. Se corrieron un total de 120 dockings del VPH-16 y 40 correspondientes al VPH-18 en el acoplamiento proteína-fármaco. Se obtuvieron valores en el grado de afinidad (kcal/mol) y el filtro de aquellos medicamentos considerados como mejores candidatos inhibidores de E6 según la variación, se observa en las Tablas 6 y 7.

Tabla 6. Resultados de los valores de afinidad de unión entre los acoplamientos fármaco-proteína de las variantes E6 del VPH-16 a una exhaustividad de 100. Los compuestos aparecen según su clave en la Tabla 2. Las filas en color gris resaltan los fármacos cuya energía de enlace es más fuerte y son candidatos a inhibidores.

Clave del compuesto	Variantes						
	E6 Referencia	AA-c	AA-a	E-G350	E-A176/G350	E-C188/G350	E-G131
	Energía libre de enlace (kcal/mol)						
a	-5.7	-6	-6	-6	-6.8	-6	-6
b	-8.4	-8.4	-8.4	-8	-8	-8	-8.1
c	-6	-5.7	-5.6	-5.6	-5.6	-5.6	-5.6
d	-6.1	-6.4	-6.4	-6.4	-6.4	-6.4	-6.4
e	-8.2	-8.1	-8.2	-7.8	-7.8	-7.7	-7.8
f	-5.7	-6.1	-6.1	-6.1	-6.1	-6	-6.1
g	-5.7	-6.2	-6.2	-6.2	-6.2	-6.2	-6.1
h	-7	-7.1	-7.1	-7.1	-7.1	-7.1	-7.1
j	-7.5	-7.3	-7.3	-7.2	-7.2	-7.2	-7.2
k	-7.2	-8	-8	-8	-8	-8	-7.3
l	-7.3	-6.8	-6.4	-6.7	-6.5	-6.5	-6.5
m	-8.1	-8.3	-8.4	-8.3	-8.3	-8.3	-8.3

n	-6.5	-6.5	-6.3	-6.3	-6.3	-6.3	-6.2
o	-7	-7.1	-7.1	-7.2	-7.2	-7.2	-7.2
p	-6.2	-6.2	-6.4	-6.2	-6.3	-6.2	-6.1
r	-4.9	-5	-6.2	-5	-5	-5	-5
s	-6.7	-6.3	-6.8	-6.8	-6.5	-6.8	-6.8
t	-5.6	-5.6	-5.6	-5.5	-5.5	-5.6	-5.6
u	-6.1	-6.8	-6.8	-6.8	-6.8	-6.8	-6.8
v	-4.2	-4.4	-4.4	-4.4	-4.5	-4.4	-4.4

Tabla 7. Resultados de los valores de afinidad de unión entre los acoplamientos fármaco-proteína de las variantes E6 del VPH-18. Los compuestos aparecen según la clave indicada en la Tabla 2. Las filas en color gris resaltan las interacciones cuya energía de enlace es más fuerte.

Clave del compuesto	Variantes		
	E6 Referencia	Af	E
	Energía libre de enlace (kcal/mol)		
a	-5.7	-6	-6.1
b	-8	-8.8	-8.8
c	-6.4	-6.7	-6.8
d	-5.9	-6.5	-6.4
e	-8.5	-8.4	-8.2
f	-6.3	-6.2	-6.2
g	-6.1	-5.7	-6
h	-7.4	-7.8	-7.8
j	-7.9	-7.1	-7.1
k	-7.3	-7.9	-7.9

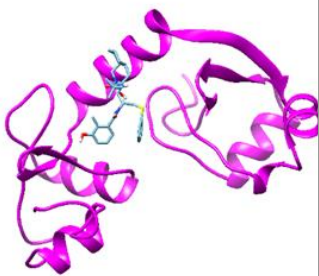
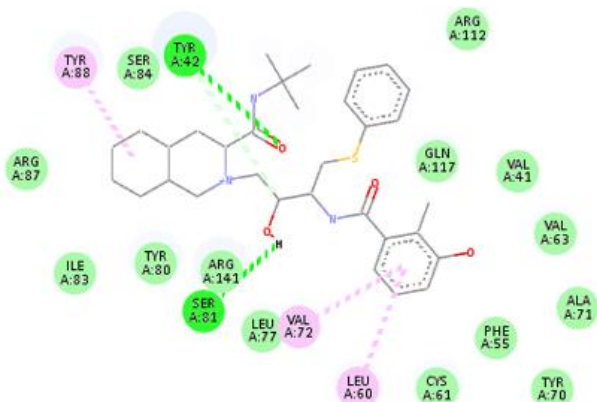
l	-8.3	-9.4	-9.4
m	-7.9	-9.2	-9.2
n	-7.3	-6.9	-6.9
o	-7.9	-8	-8.1
p	-7.1	-6.2	-6.3
r	-5	-5	-4.9
s	-7.2	-6.4	-6.7
t	-5.6	-6.4	-6.4
u	-6.5	-6.7	-6.5
v	-4.6	-4.6	-4.6

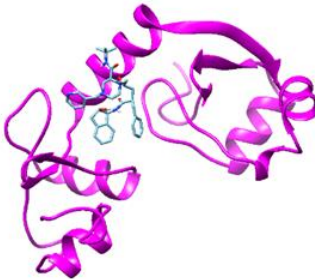
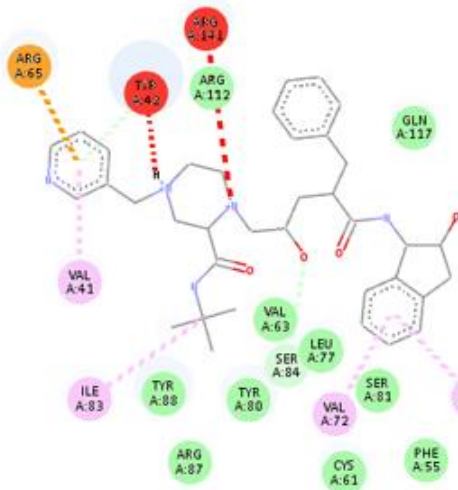
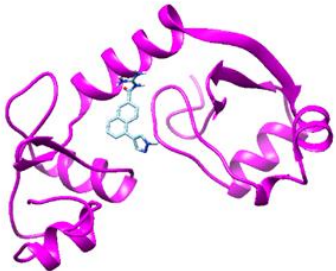
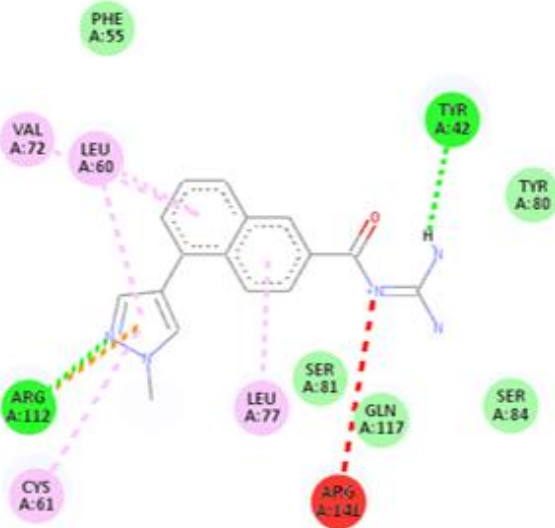
El acoplamiento molecular se basa en identificar conformaciones con la menor energía de enlace, las cuales son consideradas como las posiciones más favorables. Con base en este criterio de selección, se eligieron aquellos fármacos con la menor energía de enlace (<-8 kcal/mol) como posibles candidatos en cada variante. En el caso del VPH-16 (Tabla 6), para AA-c y AA-a se identificaron cuatro fármacos como los mejores inhibidores: Nelfinavir (b), Indinavir (e), Bit225 (k) y Flumatinib (m); para las variantes E-G350, E-A176/G350 y E-C188/G350, se eligieron tres: Nelfinavir, Bit225 y Flumatinib; la última variante E-G131 obtuvo afinidad favorable con dos fármacos: Nelfinavir y Flumatinib. En el caso de las variantes del VPH-18 (Tabla 7), aunque tres fármacos coinciden con los propuestos para las variantes del tipo 16, aquí los valores de afinidad son más altos (<-9 kcal/mol). Además, tanto para Af como E se identificaron cinco candidatos: Nelfinavir, Indinavir, Darapladib, Flumatinib y Belinostat.

Para comprender mejor los resultados obtenidos en el acoplamiento y visualizar cómo cada variante interactúa de forma única con un ligando en específico independientemente del puntaje obtenido, los análisis fármaco-proteína (Tablas 8-15) contemplan los residuos involucrados, las fuerzas intermoleculares entre ellos y la posición que favorece la unión entre el ligando y el receptor. Los elementos de interacción específicos entre los fármacos y

sus blancos virales se especifican en las tablas 16 y 17, considerando los residuos de aminoácidos, la posición y el tipo de interacción.

Tabla 8. Interacciones de la variante AA-c del VPH-16 con sus cuatro fármacos de mayor afinidad. Se muestra el acoplamiento tridimensional, diagrama en 2D de los residuos interactuantes en el sitio activo y el tipo de fuerzas intermoleculares.

Variante AA-c		
Ligando (fármaco)	Complejo en 3D	Diagrama en 2D
Nelfinavir(b)		 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond Pi-Alkyl

Indinavir (e)		 <p>Interactions</p> <table><tr><td> van der Waals</td><td> Pi-Donor Hydrogen Bond</td></tr><tr><td> Carbon Hydrogen Bond</td><td> Pi-Pi Stacked</td></tr><tr><td> Unfavorable Positive-Positive</td><td> Alkyl</td></tr><tr><td> Unfavorable Donor-Donor</td><td> Pi-Alkyl</td></tr><tr><td> Pi-Cation</td><td></td></tr></table>	 van der Waals	 Pi-Donor Hydrogen Bond	 Carbon Hydrogen Bond	 Pi-Pi Stacked	 Unfavorable Positive-Positive	 Alkyl	 Unfavorable Donor-Donor	 Pi-Alkyl	 Pi-Cation	
 van der Waals	 Pi-Donor Hydrogen Bond											
 Carbon Hydrogen Bond	 Pi-Pi Stacked											
 Unfavorable Positive-Positive	 Alkyl											
 Unfavorable Donor-Donor	 Pi-Alkyl											
 Pi-Cation												
Bit225 (k)		 <p>Interactions</p> <table><tr><td> van der Waals</td><td> Pi-Cation</td></tr><tr><td> Conventional Hydrogen Bond</td><td> Pi-Alkyl</td></tr><tr><td> Unfavorable Positive-Positive</td><td></td></tr></table>	 van der Waals	 Pi-Cation	 Conventional Hydrogen Bond	 Pi-Alkyl	 Unfavorable Positive-Positive					
 van der Waals	 Pi-Cation											
 Conventional Hydrogen Bond	 Pi-Alkyl											
 Unfavorable Positive-Positive												

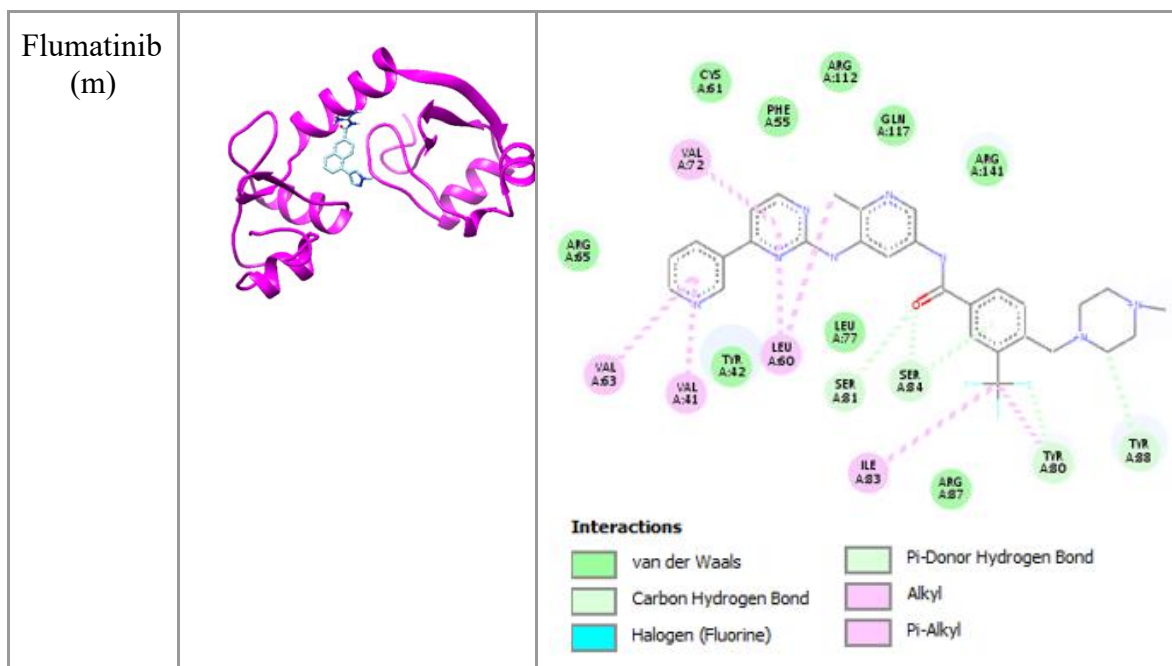

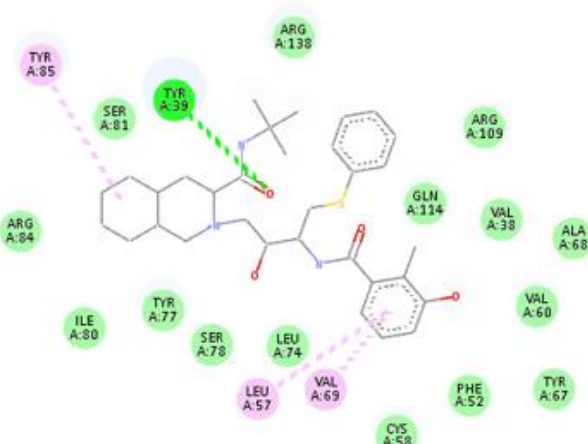
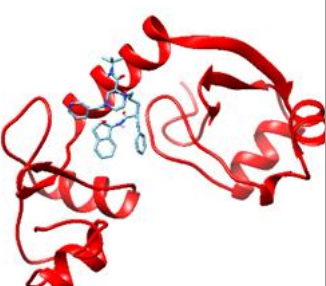
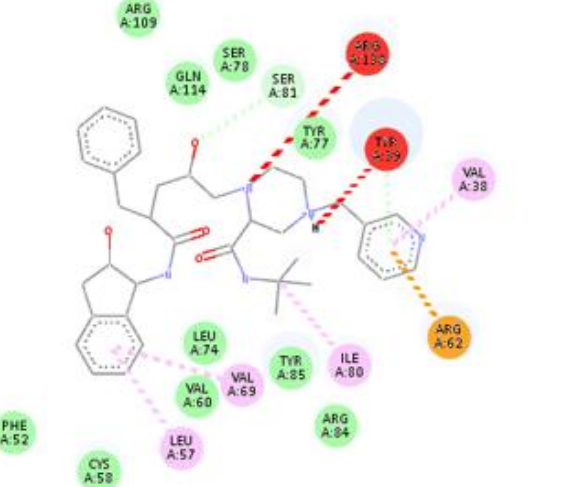


Tabla 9. Interacciones de la variante AA-a del VPH-16 con sus cuatro fármacos de mayor afinidad. Se muestra el acoplamiento tridimensional, diagrama en 2D de los residuos interactuantes en el sitio activo y el tipo de fuerzas intermoleculares.

Variante AA-a		
Ligando (fármaco)	Complejo en 3D	Diagrama en 2D

<p>Nelfinavir(b)</p>		 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Pi-Alkyl
<p>Indinavir (e)</p>		 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Carbon Hydrogen Bond Unfavorable Positive-Positive Unfavorable Donor-Donor Pi-Cation Pi-Donor Hydrogen Bond Pi-Pi Stacked Alkyl Pi-Alkyl

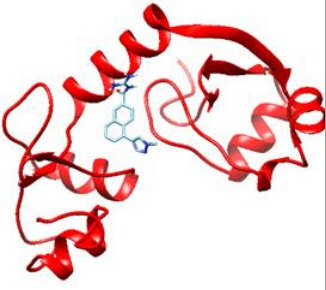
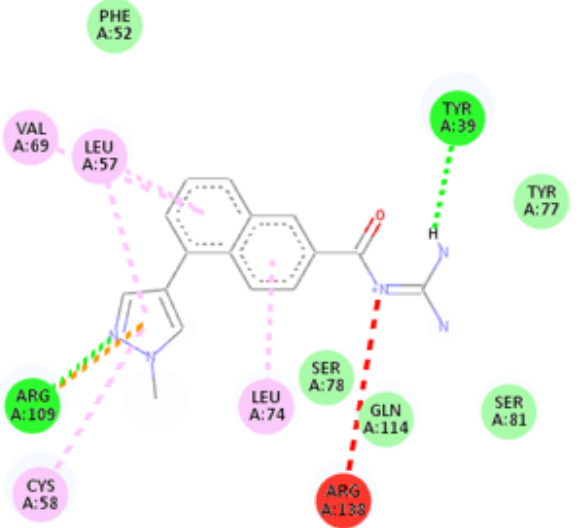
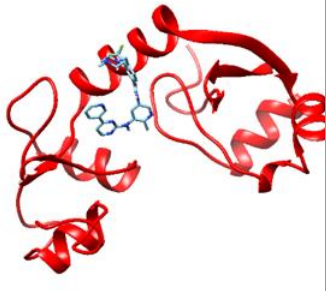
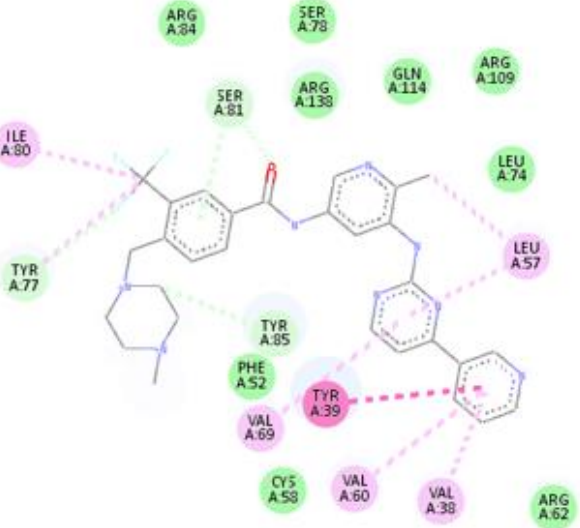

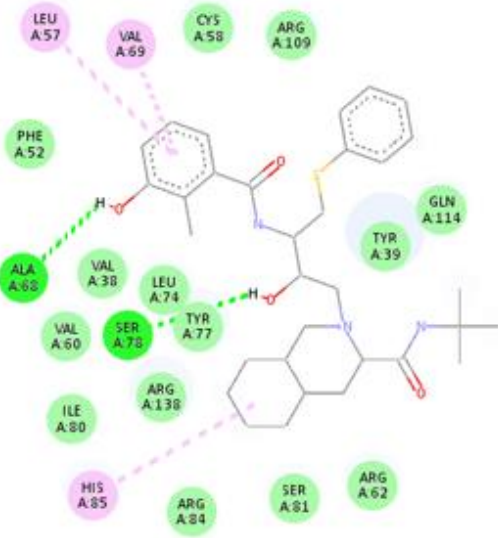
<p>Bit225 (k)</p>		 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Unfavorable Positive-Positive Pi-Cation Pi-Alkyl
<p>Flumatinib (m)</p>		 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Carbon Hydrogen Bond Halogen (Fluorine) Pi-Donor Hydrogen Bond Pi-Pi Stacked Alkyl Pi-Alkyl

Tabla 10. Interacciones de la variante E-G350 del VPH-16 con sus tres fármacos de mayor afinidad. Se muestra el acoplamiento tridimensional, diagrama en 2D de los residuos interactuantes en el sitio activo y el tipo de fuerzas intermoleculares.

Variante E-G350		
Ligando (fármaco)	Complejo en 3D	Diagrama en 2D
Nelfinavir(b)		 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Pi-Alkyl

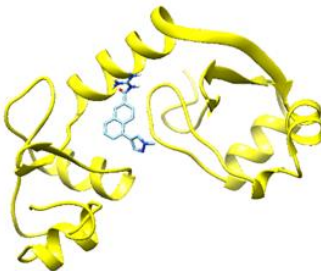
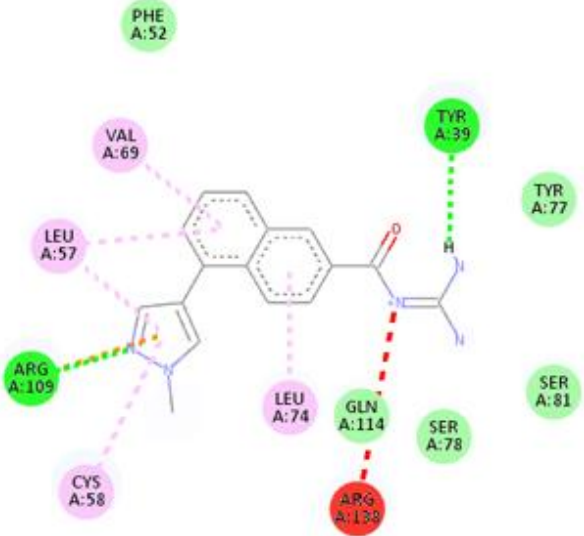
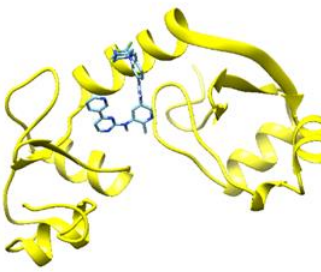
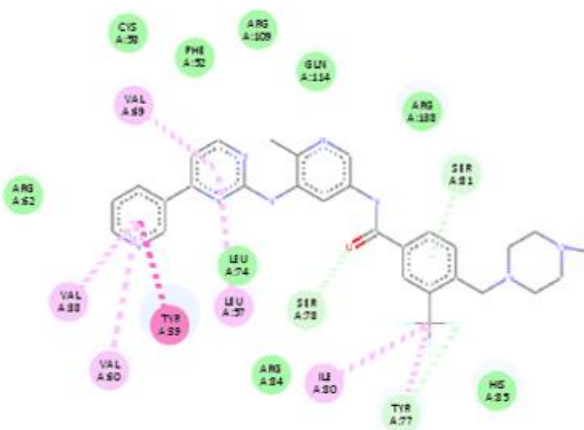
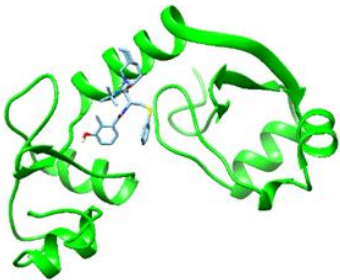
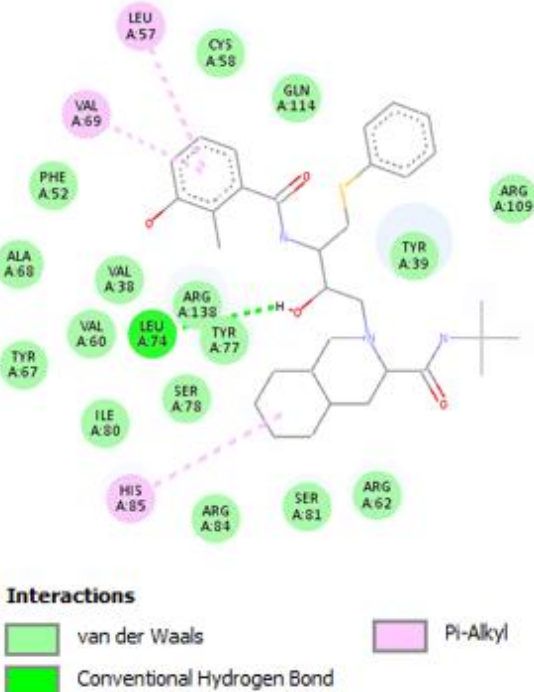
Bit225 (k)		 <p>Interactions</p> <table><tr><td> van der Waals</td><td> Pi-Cation</td></tr><tr><td> Conventional Hydrogen Bond</td><td> Pi-Alkyl</td></tr><tr><td> Unfavorable Positive-Positive</td><td></td></tr></table>	 van der Waals	 Pi-Cation	 Conventional Hydrogen Bond	 Pi-Alkyl	 Unfavorable Positive-Positive			
 van der Waals	 Pi-Cation									
 Conventional Hydrogen Bond	 Pi-Alkyl									
 Unfavorable Positive-Positive										
Flumatinib (m)		 <p>Interactions</p> <table><tr><td> van der Waals</td><td> Pi-Pi Stacked</td></tr><tr><td> Carbon Hydrogen Bond</td><td> Alkyl</td></tr><tr><td> Halogen (Fluorine)</td><td> Pi-Alkyl</td></tr><tr><td> Pi-Donor Hydrogen Bond</td><td></td></tr></table>	 van der Waals	 Pi-Pi Stacked	 Carbon Hydrogen Bond	 Alkyl	 Halogen (Fluorine)	 Pi-Alkyl	 Pi-Donor Hydrogen Bond	
 van der Waals	 Pi-Pi Stacked									
 Carbon Hydrogen Bond	 Alkyl									
 Halogen (Fluorine)	 Pi-Alkyl									
 Pi-Donor Hydrogen Bond										

Tabla 11. Interacciones de la variante E-A176/G350 del VPH-16 con sus tres fármacos de mayor afinidad. Se muestra el acoplamiento tridimensional, diagrama en 2D de los residuos interactuantes en el sitio activo y el tipo de fuerzas intermoleculares.

Variante E-A176/G350		
Ligando (fármaco)	Complejo en 3D	Diagrama en 2D
Nelfinavir(b)		 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Pi-Alkyl

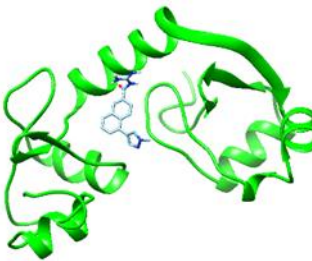
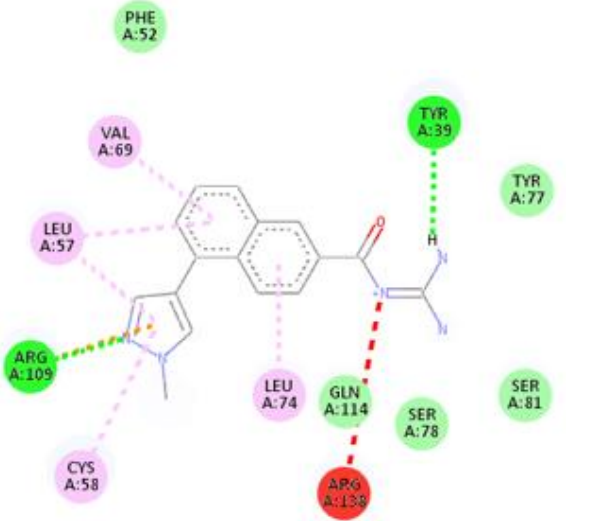
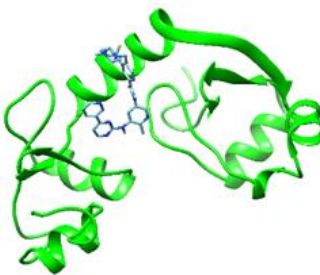
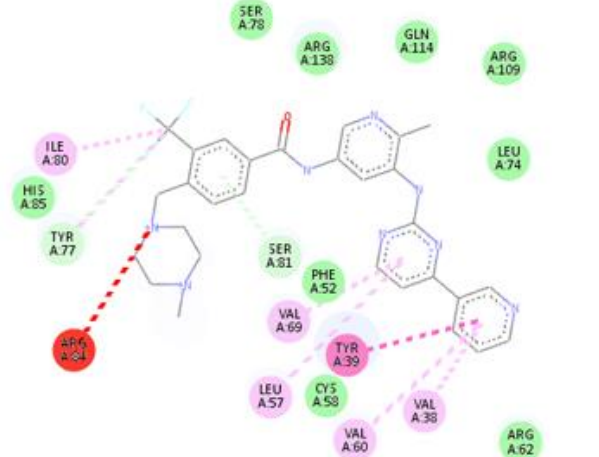

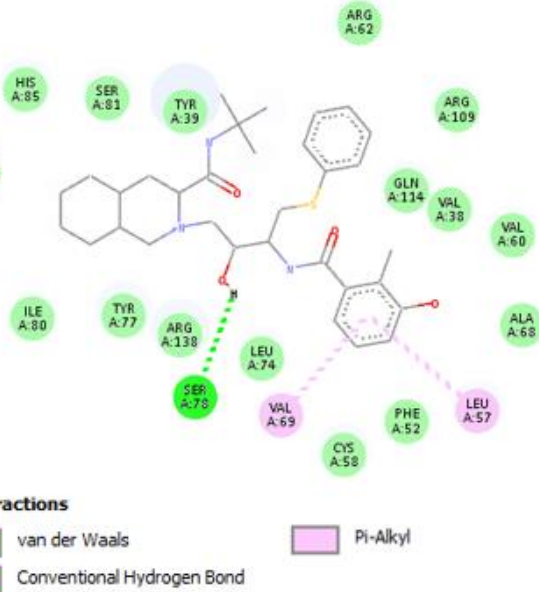
Bit225 (k)		 <p>Interactions</p> <table><tr><td> van der Waals</td><td> Pi-Cation</td></tr><tr><td> Conventional Hydrogen Bond</td><td> Pi-Alkyl</td></tr><tr><td> Unfavorable Positive-Positive</td><td></td></tr></table>	 van der Waals	 Pi-Cation	 Conventional Hydrogen Bond	 Pi-Alkyl	 Unfavorable Positive-Positive			
 van der Waals	 Pi-Cation									
 Conventional Hydrogen Bond	 Pi-Alkyl									
 Unfavorable Positive-Positive										
Flumatinib (m)		 <p>Interactions</p> <table><tr><td> van der Waals</td><td> Pi-Donor Hydrogen Bond</td></tr><tr><td> Carbon Hydrogen Bond</td><td> Pi-Pi Stacked</td></tr><tr><td> Halogen (Fluorine)</td><td> Alkyl</td></tr><tr><td> Unfavorable Positive-Positive</td><td> Pi-Alkyl</td></tr></table>	 van der Waals	 Pi-Donor Hydrogen Bond	 Carbon Hydrogen Bond	 Pi-Pi Stacked	 Halogen (Fluorine)	 Alkyl	 Unfavorable Positive-Positive	 Pi-Alkyl
 van der Waals	 Pi-Donor Hydrogen Bond									
 Carbon Hydrogen Bond	 Pi-Pi Stacked									
 Halogen (Fluorine)	 Alkyl									
 Unfavorable Positive-Positive	 Pi-Alkyl									

Tabla 12. Interacciones de la variante E-C188/G350 del VPH-16 con sus tres fármacos de mayor afinidad. Se muestra el acoplamiento tridimensional, diagrama en 2D de los residuos interactuantes en el sitio activo y el tipo de fuerzas intermoleculares.

Variante E-C188-G350		
Ligando (fármaco)	Complejo en 3D	Diagrama en 2D
Nelfinavir(b)		 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Pi-Alkyl

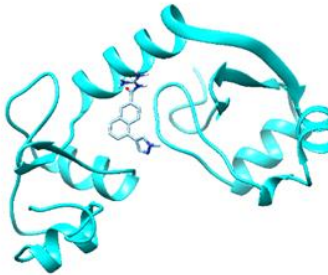
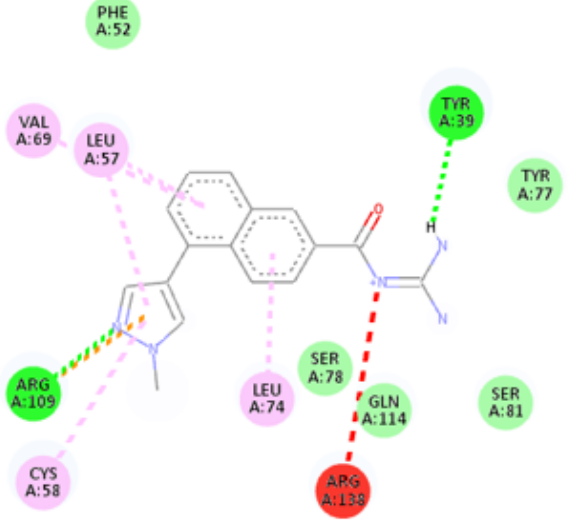
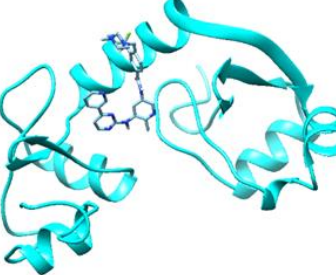
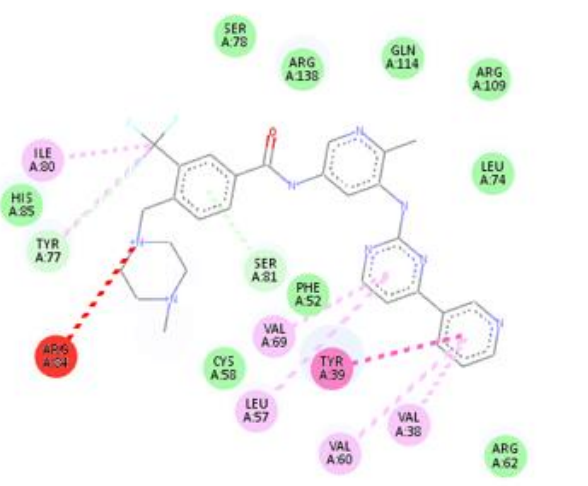
<p>Bit225 (k)</p>		 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Unfavorable Positive-Positive Pi-Cation Pi-Alkyl
<p>Flumatinib (m)</p>		 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Carbon Hydrogen Bond Halogen (Fluorine) Unfavorable Positive-Positive Pi-Donor Hydrogen Bond Pi-Pi Stacked Alkyl Pi-Alkyl

Tabla 13. Interacciones de la variante E-G131 del VPH-16 con sus dos fármacos de mayor afinidad. Se muestra el acoplamiento tridimensional, diagrama en 2D de los residuos interactuantes en el sitio activo y el tipo de fuerzas intermoleculares.

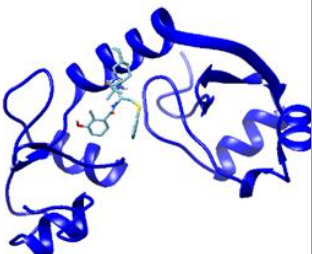
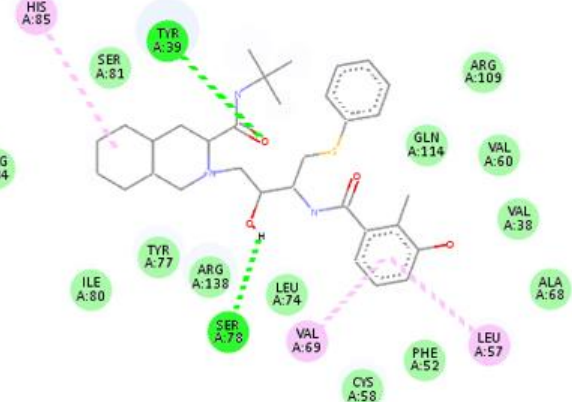
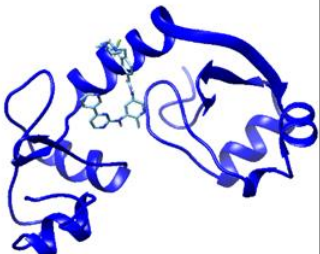
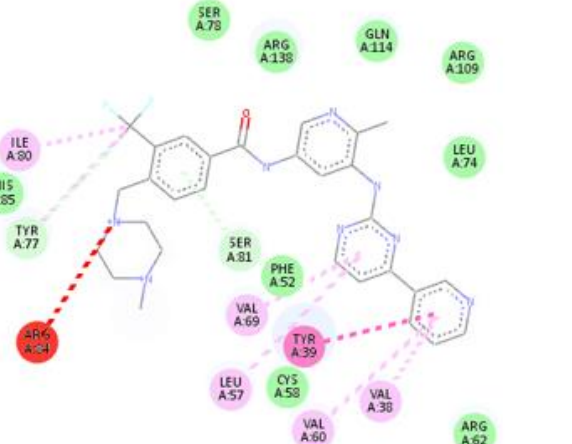
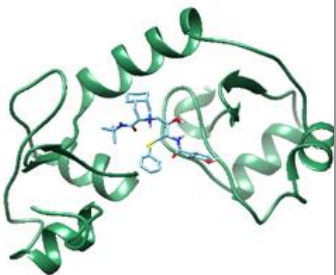
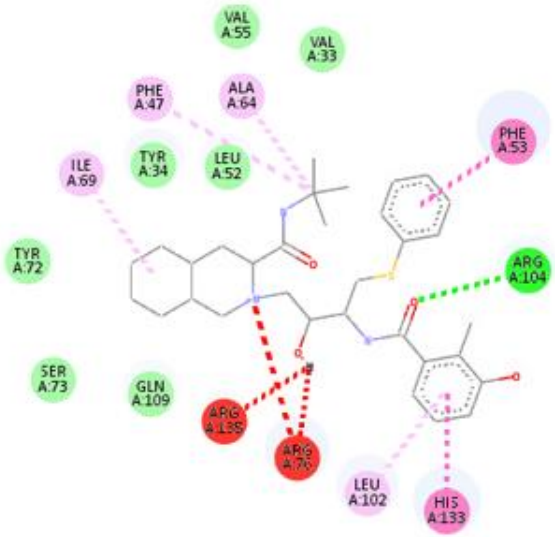
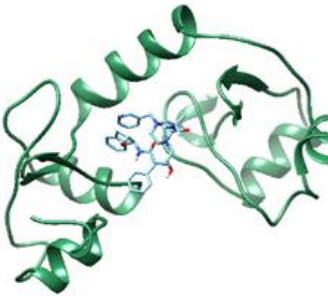
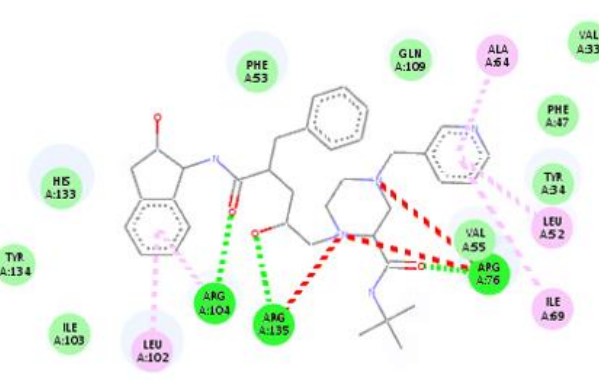
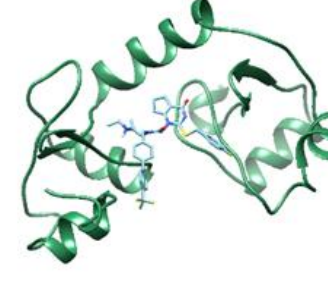
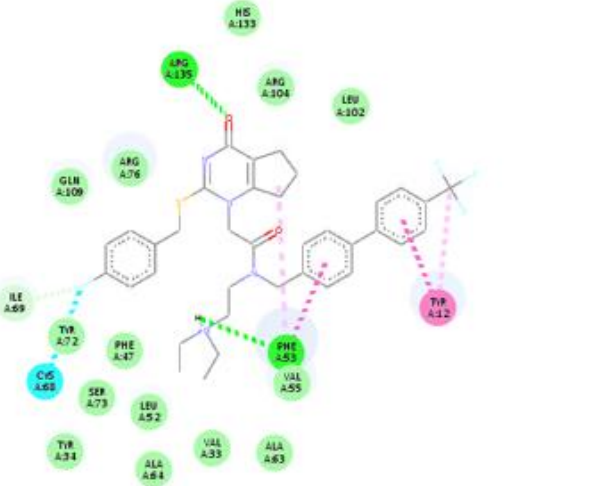
Variante E-G131		
Ligando (fármaco)	Complejo en 3D	Diagrama en 2D
Nelfinavir (b)		 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Pi-Alkyl
Flumatinib (m)		 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Carbon Hydrogen Bond Halogen (Fluorine) Unfavorable Positive-Positive Pi-Donor Hydrogen Bond Pi-Pi Stacked Alkyl Pi-Alkyl

Tabla 14. Interacciones de la variante Af del VPH-18 con sus cinco fármacos de mayor afinidad. Se muestra el acoplamiento tridimensional, diagrama en 2D de los residuos interactuantes en el sitio activo y el tipo de fuerzas intermoleculares.

Variante Af		
Ligando (fármaco)	Complejo en 3D	Diagrama en 2D
Nelfinavir(b)		 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Unfavorable Positive-Positive Unfavorable Donor-Donor Pi-Pi Stacked Alkyl Pi-Alkyl

<p>Indinavir (e)</p>		 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Unfavorable Positive-Positive Pi-Alkyl
<p>Darapladib (l)</p>		 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond Halogen (Fluorine) Unfavorable Donor-Donor Pi-Pi Stacked Pi-Alkyl

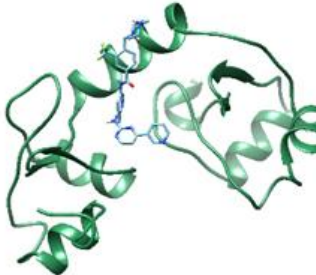
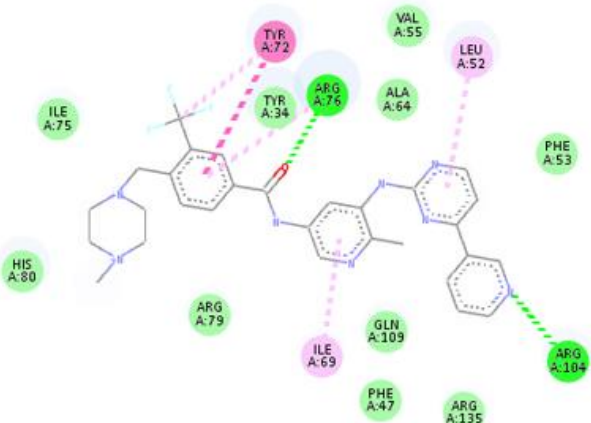
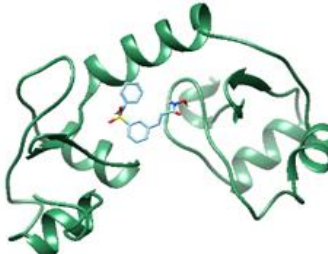
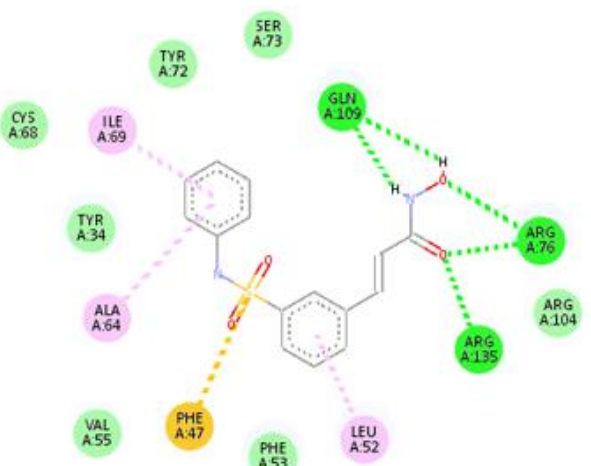
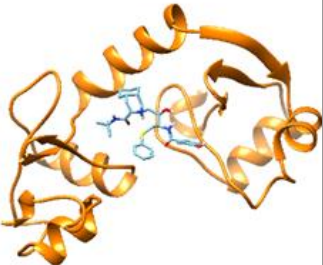
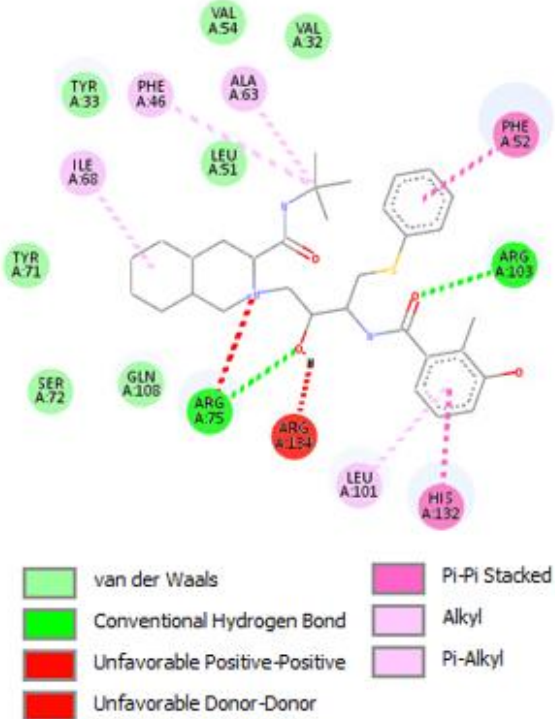

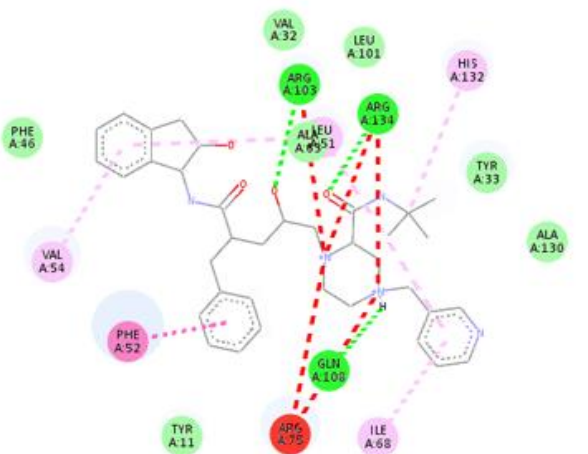
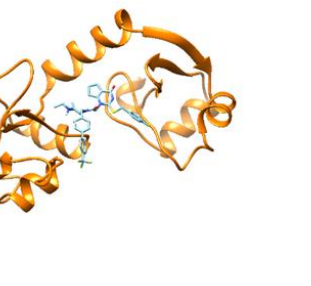
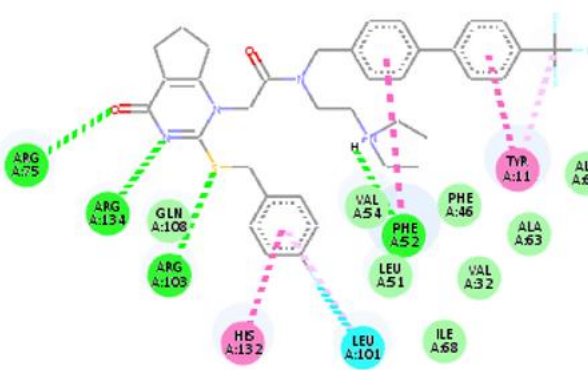
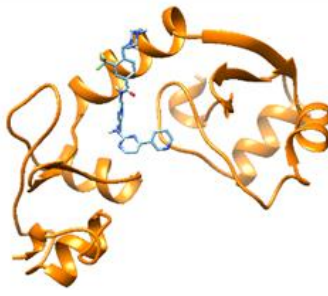
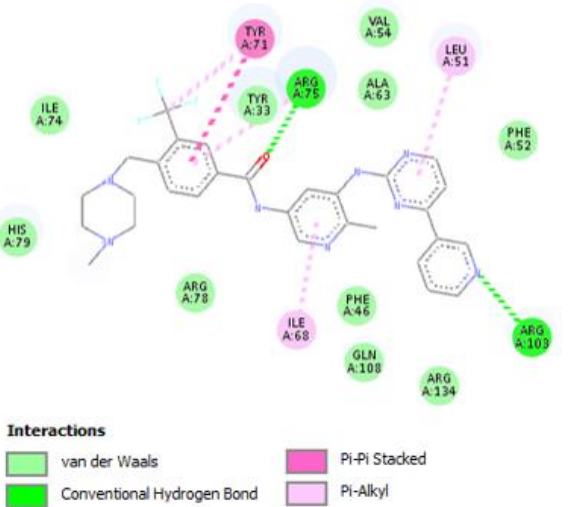
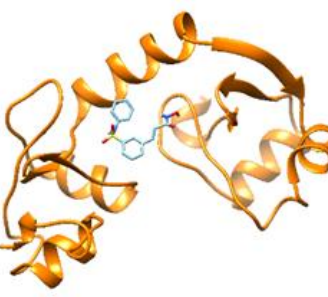
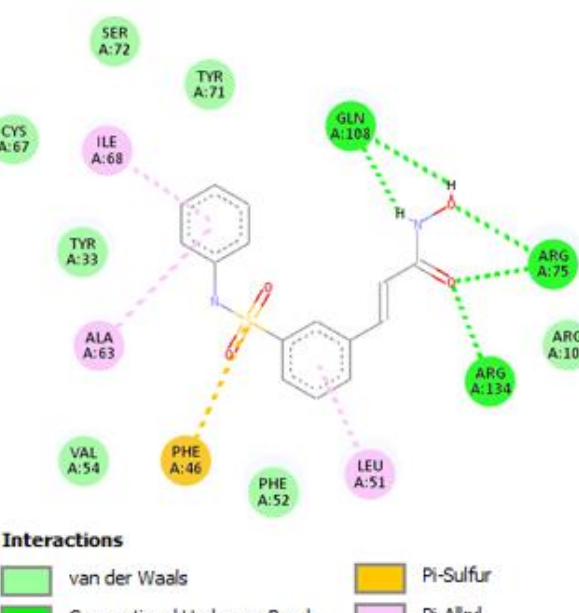
<p>Flumatinib(m)</p>		 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Pi-Pi Stacked Pi-Alkyl
<p>Belinostat(o)</p>		 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Pi-Sulfur Pi-Alkyl

Tabla 15. Interacciones de la variante E del VPH-18 con sus cinco fármacos de mayor afinidad. Se muestra el acoplamiento tridimensional, diagrama en 2D de los residuos interactuantes en el sitio activo y el tipo de fuerzas intermoleculares.

Variante E		
Ligando (fármaco)	Complejo en 3D	Diagrama en 2D
Nelfinavir(b)		 <p> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Unfavorable Positive-Positive Unfavorable Donor-Donor Pi-Pi Stacked Alkyl Pi-Alkyl </p>

<p>Indinavir (e)</p>		 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Unfavorable Positive-Positive Pi-Pi Stacked Pi-Alkyl
<p>Darapladib (l)</p>		 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Halogen (Fluorine) Pi-Pi Stacked Pi-Alkyl

<p>Flumatinib (m)</p>		 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Pi-Pi Stacked Pi-Alkyl
<p>Belinostat (o)</p>		 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Pi-Sulfur Pi-Alkyl

No se detallan las fuerzas atractivas o repulsivas no enlazantes, débiles ni dependientes de la distancia en las tablas 16 y 17, porque no aportan un valor significativo en la interacción. En las tablas 8-15, se muestran las fuerzas intermoleculares consideradas en la interacción variante-ligando de mayor afinidad. Las interacciones de van der Waals son ubicuas en todas las interacciones.

Interacciones entre variantes y fármacos: VPH-16

Los valores de energía son similares en todos los casos al interior de los grupos: Grupo 1 AA-a y AA-c (Asiática-Americana); Grupo 2 E-G350, E-A176/G350 y E-C188/G350 (Europea clase G350); Grupo 3 E-G131 (Europea clase T350) (Huertas-Salgado, 2011). Sin embargo, cada grupo mostró afinidades diferentes a los fármacos propuestos, como se muestra en la tabla 6; lo que concuerda con las energías obtenidas en la interacción, que se detallan a continuación.

-Interacciones entre las proteínas del VPH-16 y Nelfinavir (b):

Nelfinavir es consistente como posible tratamiento para todas las variantes, pero no es el mejor en todos los casos. Tanto AA-a como AA-c obtuvieron un puntaje de -8.4 kcal/mol con el fármaco. Las fuerzas hidrofóbicas de van der Waals destacan y en ambas proteínas hay una interacción de enlace de hidrógeno en un residuo de tirosina en diferente posición (TYR 42 en AA-c y TYR 39 en AA-a) (Tablas 8 y 9). Tres interacciones Pi-Alquilo son consistentes en ambas y se forman en los mismos aminoácidos (TYR, LEU y VAL), aunque en posiciones diferentes. Solo AA-c forma un segundo enlace de hidrógeno en SER 81, el cual conecta con un hidrógeno que no se presenta en AA-a. Por lo tanto, Nelfinavir tiene mayor interacción contra VPH-16 AA-c.

Las tres variantes de E-G350 obtuvieron un valor de -8 kcal/mol con el fármaco, menos favorable que contra las variantes AA. Sin embargo, la variante E-G350 es la única que formó dos enlaces de hidrógeno, uno en SER 78 y otro en ALA 68. Ambos enlaces tienen mayor distancia que los dos formados en AA-c (Tabla 16). Tres interacciones Pi-Alquilo son iguales con E-G350 y E-A176/G350, en los residuos VAL 69 y LEU 57; estos dos residuos son idénticos con la variante AA-a, mientras que con AA-c coincide con los aminoácidos más no con la posición. E-C188/G350 solo presenta dos interacciones Pi-Alquilo, pero coinciden con los residuos anteriores (VAL 69 y LEU 57) (Tabla 12)

Por último, E-G131 tiene afinidad de -8.1 kcal/mol con el fármaco, forma tres interacciones Pi-Alquilo idénticas a las de E-G350 y E-A176/G350 y dos enlaces de hidrógeno en los mismos aminoácidos y en la misma posición que la variante AA-c (Tabla 13), lo cual explica su afinidad intermedia.

-Interacciones entre las proteínas del VPH-16 e Indinavir (e):

Las variantes AA-c y AA-a son las únicas que tienen a Indinavir como propuesta de tratamiento con un valor de -8.1 kcal/mol y -8.2 kcal/mol, respectivamente (Tabla 6). En la interacción no se forman enlaces de hidrógeno, pero se forman algunas que se consideran No favorables (principalmente estructurales sin intervención de cargas isoelectricas de los radicales del aminoácido) según la posición espacial del fármaco (Tablas 8 y 9). En comparación con el Nelfinavir, se forman más tipos de fuerzas intermoleculares, como Pi-Catión, Pi-Alquilo, de Apilamiento π (Pi-Pi Stacked) y C-H (carbono-hidrógeno). La principal diferencia entre las dos variantes de AA, radica en la posición que toma el fármaco en el sitio activo (Tablas 8 y 9), ya que el tipo y número de interacciones, así como el residuo involucrado (aunque no en la misma posición) es igual en ambas proteínas.

-Interacciones entre las proteínas del VPH-16 y Bit225 (k):

Para todas las variantes, excepto E-G131, se seleccionó a Bit225 como posible tratamiento. En todos los casos se obtuvo el mismo valor de afinidad (-8 kcal/mol) y el mismo tipo de interacciones (Tablas 8-12), entre las que se forman dos enlaces de hidrógeno, específicamente en residuos de ARG y TYR aunque en posiciones diferentes para todas las variantes; una interacción de tipo No favorable en ARG 138, excepto en AA-c que cambia de posición a ARG 141; por último interacciones Pi-Catión y Pi-Alquilo en la misma proporción (1 y 4, respectivamente).

-Interacciones entre las proteínas del VPH-16 y Flumatinib (m):

Junto al Indinavir, Flumatinib obtuvo los valores de afinidad más altos con todas las variantes del tipo 16 (Tabla 6). Todas con una energía de -8.3 kcal/mol, excepto AA-a que obtuvo -8.4 kcal/mol. La mayoría de los puntajes son iguales. Sin embargo, según la rama/clase a la que pertenecen las variantes, las interacciones son distintas (Tablas 8, 9, 10, 11 y 12).

Las variantes AA forman diversos tipos de interacciones “Pi” (Pi-Alquilo, Pi-Pi Stacked y enlaces de hidrógeno con Donador π). No hay enlaces por puentes de hidrógeno, pero sí interacciones C-H (carbono-hidrógeno), que interactúan a una menor distancia que todas las demás (Tabla 16). Las variantes Europeas no difieren mucho en sus interacciones del anterior grupo, aunque E-A176/G350, E-C188/G350 y E-G131 forman una interacción

No favorable Positiva-Positiva en ARG 84, que se une a un nitrógeno de una estructura cíclica del fármaco (Tablas 11, 12 y 13). E-G350, aunque también es Europea, no presenta dicha interacción debido a la diferencia en la posición espacial del ligando (Tabla 10).

Debido a la conformación estructural del fármaco, también se forman enlaces de halógeno (en este caso con una molécula de flúor) en todas las variantes en un rango de 2.94 Å a 2.99 Å de distancia.

Interacciones entre variantes y fármacos: VPH-18

Las tablas 14 y 15 muestran las interacciones del acoplamiento entre las variantes del VPH-18 y los fármacos seleccionados con mayor afinidad. Tanto “Af” como “E” pertenecen a ramas diferentes, pero a diferencia de la propuesta farmacológica del tipo 16, en este caso los cinco fármacos seleccionados coinciden en ambas, e incluso con valores de afinidad similares (Tabla 7). Tres de esos cinco (Nelfinavir, Indinavir y Flumatinib) también forman parte de los seleccionados para las variantes del VPH-16. Sin embargo, en este caso ninguno de ellos obtuvo la mejor afinidad.

-Interacciones entre las proteínas del VPH-18 y Nelfinavir (b):

Af y E obtuvieron una energía de unión de -8.8 kcal/mol. En ambos casos, residuos de arginina forman interacciones No favorables y al mismo tiempo establecen enlaces de hidrógeno (Tablas 14 y 15). Por ejemplo, la variante E forma dos enlaces de hidrógeno, uno en ARG 75, donde también surge la interacción No favorable, y otro en ARG 103 (ambos estabilizados por un oxígeno). En el caso de Af, solamente se forma un enlace de hidrógeno en ARG 104 (también estabilizado por un oxígeno), pero a diferencia de E, en esta posición no hay más uniones. De hecho, las interacciones No favorables se encuentran en ARG 76, la cual enlaza dos interacciones de este tipo y no solo una.

En ambas proteínas se forman interacciones Pi-Pi Stacked en histidinas y fenilalaninas a un rango de distancia de 3.85 a 4.36 Å; dos interacciones Pi-Alquilo, una en fenilalanina y otra en leucina a rangos de distancia de 5.36 a 4.65 Å. La posición exacta de los aminoácidos se puede consultar en la Tabla 17.

-Interacciones entre las proteínas del VPH-18 e Indinavir (e):

Con Af, Indinavir obtuvo -8.4 kcal/mol de afinidad y -8.2 kcal/mol con E. De los cuatro fármacos seleccionados, este es de los menos afines y a su vez el que forma más interacciones intermoleculares No favorables. Af interactúa con tres enlaces de hidrógeno mediante residuos de arginina enlazados a moléculas de oxígeno; dos de estos residuos (ARG 76 y ARG 135) también son mediadores de interacciones No favorables. En el caso de E también ocurre esto, se forman tres enlaces de hidrógeno, dos de ellos en ARG 103 y ARG 134 que a su vez forman interacciones No favorables. Sin embargo, en E hay un tercer residuo (ARG 75) que forma otros dos enlaces de este tipo, es decir, en total hay cinco uniones consideradas como No favorables entre la variante E y el fármaco.

-Interacciones entre las proteínas del VPH-18 y Darapladib (l):

Darapladib obtuvo el mejor valor de afinidad entre todos los fármacos con ambas variantes (-9.4 kcal/mol). En ambos acoplamientos hay interacciones con enlaces de hidrógeno, aunque en Af únicamente se forman dos, uno en ARG 135 y otro PHE 53, mientras que en E se forman cuatro de este tipo, tres de ellas en residuos de arginina y una en PHE (igual que Af pero en diferente posición). Este residuo de PHE estabiliza otro tipo de fuerzas en ambas proteínas, en el caso de E forma un enlace Pi-Pi Stacked y en Af, además de este, forma uno de Pi-Alquilo y una interacción No favorable de tipo donador-donador. La variante E no presenta interacciones No favorables, pero la posición que adopta el fármaco es diferente en ambas proteínas (Tablas 14 y 15).

-Interacciones entre las proteínas del VPH-18 y Flumatinib (m):

Flumatinib es de los fármacos con mayor afinidad entre ambas variantes, además de que sus interacciones son prácticamente iguales. El puntaje obtenido en ambas fue de -9.2 kcal/mol (Tabla 7). Aunque es seleccionado por su alta afinidad, tiene un bajo número de interacciones que se limitan a tres tipos: enlaces de hidrógeno, Pi-Pi Stacked y Pi-Alquilo (Tablas 14 y 15). Residuos de arginina son consistentes para formar enlaces de hidrógeno tanto en Af como en E. Otros aminoácidos que destacan son LEU, ILE y TYR, que estabilizan la estructura al formar enlaces de tipo Pi.

-Interacciones entre las proteínas del VPH-18 y Belinostat (o):

Belinostat tiene un valor de afinidad de -8 kcal/mol con Af y -8.1 kcal/mol con E. En ambas variantes tres residuos forman enlaces de hidrógeno, dos de ellos en argininas y uno en glutamina. Pero en total cada una forma cinco enlaces de hidrógeno, ya que dos de esos residuos (ARG 75 y GLN 108 en E y ARG 76 y GLN 109 en Af) forman dos enlaces. Por último, en ambas hay un enlace Pi-Sulfuro a una distancia promedio de 5.87 Å y tres interacciones Pi-Alquilo en los aminoácidos ILE, ALA y LEU, con posiciones diferentes.

Tabla 16. Aminoácidos involucrados en el sitio interactuante de las variantes E6 del VPH.16 con su propuesta farmacológica. C-H: interacción carbono-hidrógeno. NF: Interacción No favorable. Pi-Pi Stacked: de Apilamiento π .

Variante AA-c				
Ligando	Aminoácido	Posición	Tipo de Interacción	Distancia (Å)
Nelfinavir	TYR	88	Pi-Alquilo	5.41
	VAL72	72	Pi-Alquilo	4.38
	LEU60	60	Pi-Alquilo	4.69
	TYR42	42	Enlace de hidrógeno Enlace C-H	2.44 3.63
	SER	81	Enlace de hidrógeno	2.64
Indinavir	ARG	65	Pi-Cación	3.39
	VAL	41	Pi-Alquilo	4.93
	VAL	72	Pi-Alquilo	4.35
	LEU	60	Pi-Alquilo	4.45
	ILE	83	Alquilo	5.44
	SER	84	Enlace C-H	2.57

	TYR	42	NF Donador-Donador Enlace de hidrógeno con Pi-Donador Pi-Stacked	2.07 3.16 4.59
	ARG	141	NF Positivo-Positivo	4.56
BIT225	TYR	42	Enlace de hidrógeno	2.33
	ARG	112	Enlace de hidrógeno Pi-Cación	2.80 4.90
	VAL	72	Pi-Alquilo	5.27
	LEU	60	Pi-Alquilo Pi-Alquilo	5.20 4.39
	LEU	77	Pi-Alquilo	5.29
	CYS	61	Pi-Alquilo	4.69
	ARG	141	NF Positivo-Positivo	4.67
Flumatinib	VAL	72	Pi-Alquilo	4.50
	VAL	63	Pi-Alquilo	4.81
	VAL	41	Pi-Alquilo	5.66
	LEU	60	Pi-Alquilo Alquilo	5.18 4.96
	ILE	83	Alquilo	4.89
	SER	81	Enlace C-H	2.91
	SER	84	Enlace C-H Enlace de hidrógeno con Pi-Donador	2.94 3.21
	TYR	80	Pi-Alquilo Halógeno (flúor)	5.25 2.94
	TYR	88	Enlace C-H	3.52

Variante AA-a				
Nelfinavir	TYR	39	Enlace de hidrógeno	2.37
	TYR	85	Pi-Alquilo	5.41
	VAL	69	Pi-Alquilo	4.37
	LEU	57	Pi-Alquilo	4.71
Indinavir	LEU	57	Pi-Alquilo	4.40
	VAL	69	Pi-Alquilo	4.38
	VAL	38	Pi-Alquilo	4.97
	ILE	80	Alquilo	5.43
	SER	81	Enlace C-H	2.60
	ARG	62	Pi-Catión	3.37
	TYR	39	NF Donador-Donador	2.10
			Enlace de hidrógeno con	
			Pi-Donador	3.14
BIT225			Pi-Pi Stacked	4.63
	ARG	138	NF Positivo-Positivo	4.51
	ARG	109	Enlace de hidrógeno	2.80
			Pi-Catión	4.91
	TYR	39	Enlace de hidrógeno	2.29
	LEU	57	Pi-Alquilo	5.28
			Pi-Alquilo	4.38
	VAL	69	Pi-Alquilo	5.28
	CYS	58	Pi-Alquilo	4.69
Flumatinib	LEU	74	Pi-Alquilo	5.30
	ARG	138	NF Positivo-Positivo	4.70
	LEU	57	Pi-Alquilo	4.94

			Pi-Alquilo	5.25
	VAL	69	Pi-Alquilo	4.52
	VAL	60	Pi-Alquilo	4.88
	VAL	38	Pi-Alquilo	4.70
	ILE	80	Alquilo	4.93
	TYR	77	Pi-Alquilo Halógeno (flúor)	5.20 2.99
	TYR	85	Enlace C-H	3.62
	TYR	39	Pi-Pi Stacked	4.72
	SER	81	Enlace C-H Enlace de hidrógeno con Pi-Donador	3.00 3.18
Variante E-G131				
Nelfinavir	TYR	39	Enlace de hidrógeno	2.74
	SER	78	Enlace de hidrógeno	2.91
	HIS	85	Pi-Alquilo	5.37
	VAL	69	Pi-Alquilo	4.37
	LEU	57	Pi-Alquilo	4.69
Flumatinib	VAL	38	Pi-Alquilo	4.80
	VAL	60	Pi-Alquilo	4.98
	LEU	57	Pi-Alquilo	5.28
	VAL	69	Pi-Alquilo	4.51
	ILE	80	Alquilo	4.89
	TYR	77	Pi-Alquilo Halógeno (flúor)	5.16 2.95

	SER	81	Enlace de hidrógeno con Pi-Donador	3.07
	TYR	39	Pi-Pi Stacked	4.73
	ARG	84	NF Positivo-Positivo	5.58
Variante E-G350				
Nelfinavir	ALA	68	Enlace de hidrógeno	2.73
	SER	78	Enlace de hidrógeno	2.81
	LEU	57	Pi-Alquilo	4.67
	VAL	69	Pi-Alquilo	4.44
	HIS	85	Pi-Alquilo	5.42
BIT225	TYR	39	Enlace de hidrógeno	2.33
	ARG	109	Enlace de hidrógeno Pi-Cación	2.80 4.91
	VAL	69	Pi-Alquilo	5.29
	LEU	57	Pi-Alquilo Pi-Alquilo	5.27 4.42
	LEU	74	Pi-Alquilo	5.29
	CYS	58	Pi-Alquilo	4.68
	ARG	138	NF Positivo-Positivo	4.68
Flumatinib	VAL	60	Pi-Alquilo	4.99
	VAL	38	Pi-Alquilo	4.79
	VAL	69	Pi-Alquilo	4.51
	LEU	57	Pi-Alquilo	5.32
	ILE	80	Alquilo	4.92
	TYR	39	Pi-Pi Stacked	4.71

	SER	78	Enlace C-H	2.90
	SER	81	Enlace de hidrógeno con Pi-Donador	3.03
	TYR	77	Pi-Alquilo Halógeno (flúor)	5.22 2.96
Variante E-C188/G350				
Nelfinavir	SER	78	Enlace de hidrógeno	2.97
	VAL	69	Pi-Alquilo	4.43
	LEU	57	Pi-Alquilo	4.68
BIT225	ARG	109	Enlace de hidrógeno Pi-Cación	2.79 4.90
	TYR	39	Enlace de hidrógeno	2.30
	LEU	57	Pi-Alquilo Pi-Alquilo	5.27 4.37
	CYS	58	Pi-Alquilo	4.69
	LEU	74	Pi-Alquilo	5.30
	VAL	69	Pi-Alquilo	5.27
	ARG	138	NF Positivo-Positivo	4.68
Flumatinib	VAL	69	Pi-Alquilo	4.51
	VAL	38	Pi-Alquilo	4.80
	VAL	60	Pi-Alquilo	4.98
	LEU	57	Pi-Alquilo	5.28
	TYR	77	Pi-Alquilo Halógeno	5.19 2.95
	TYR	39	Pi-Pi Stacked	4.73

	SER	81	Enlace de hidrógeno con Pi-Donador	3.08
	ILE	80	Alquilo	4.90
	ARG	84	NF Positivo-Positivo	5.56
Variante E-A176/G350				
Nelfinavir	LEU	74	Enlace de hidrógeno	2.81
	HIS	85	Pi-Alquilo	5.43
	VAL	69	Pi-Alquilo	4.45
	LEU	57	Pi-Alquilo	4.66
BIT225	TYR	39	Enlace de hidrógeno	2.30
	ARG	109	Enlace de hidrógeno Pi-Cación	2.78 4.89
	VAL	69	Pi-Alquilo	5.26
	LEU	57	Pi-Alquilo Pi-Alquilo	5.26 4.35
	LEU	74	Pi-Alquilo	5.27
	CYS	58	Pi-Alquilo	4.68
	ARG	138	NF Positivo-Positivo	4.72
Flumatinib	ILE	80	Alquilo	4.90
	VAL	69	Pi-Alquilo	4.51
	LEU	57	Pi-Alquilo	5.28
	VAL	38	Pi-Alquilo	4.80
	VAL	60	Pi-Alquilo	4.98
	TYR	77	Pi-Alquilo Halógeno (flúor)	5.19 2.94

	TYR	39	Pi-Pi Stacked	4.73
	SER	81	Enlace de hidrógeno con Pi-Donador	3.07
	ARG	84	NF Positivo-Positivo	5.56

Tabla 17. Aminoácidos involucrados en el sitio interactuante de las variantes E6 del VPH.18 con su propuesta farmacológica. C-H: interacción carbono-hidrógeno. NF: Interacción No favorable. Pi-Pi Stacked: de Apilamiento π .

Variante Af				
Ligando	Aminoácido	Posición	Tipo de Interacción	Distancia (Å)
Nelfinavir	ILE	69	Alquilo	5.38
	ALA	64	Alquilo	4.26
	PHE	47	Pi-Alquilo	5.39
	LEU	102	Pi-Alquilo	4.64
	PHE	53	Pi-Pi Stacked	3.85
	HIS	133	Pi-Pi Stacked	4.36
	ARG	104	Enlace de hidrógeno	2.81
	ARG	135	NF Donador-Donador	2.47
	ARG	76	NF Donador-Donador NF Positivo-Positivo	2.38 4.80
Indinavir	LEU	102	Pi-Alquilo	4.31
	ILE	69	Pi-Alquilo	5.20
	LEU	52	Pi-Alquilo	4.99
	ALA	64		

	ARG	104	Pi-Alquilo	4.01
			Pi-Alquilo	5.03
			Enlace de Hidrógeno	2.37
	ARG	135		
			Enlace de hidrógeno	1.93 y 2.71
			NF Positivo-Positivo	5.46
	ARG	76		
			Enlace de hidrógeno	2.71 y 2.23
			NF Positivo-Positivo	5.26 y 4.34
Darapladib	TYR	2	Pi-Pi Stacked	3.75
			Pi-Alquilo	4.48
	PHE	53	Enlace de hidrógeno	2.25
			Pi-Pi Stacked	5.07
			Pi-Alquilo	5.46
			NF Donador-Donador	2.61
	ARG	135	Enlace de hidrógeno	2.25 Y 2.00
	CYS	68	Halógeno (flúor)	3.38
	ILE	69	C-H (flúor)	3.10
Flumatinib	ILE	69	Pi-Alquilo	4.81
	LEU	52	Pi-Alquilo	5.33
	ARG	104	Enlace de hidrógeno	2.49
	ARG	76	Pi-Alquilo	2.36
			Enlace de hidrógeno	4.97
	TYR	72	Pi-Alquilo	3.95
			Pi-Stacked	4.95
Belinostat	GLN	109	Enlace de hidrógeno	2.33 y 2.73
	ARG	76	Enlace de hidrógeno	2.66 y 2.80
	ARG	135	Enlace de hidrógeno	2.41 y 2.46
	ILE	69	Pi-Alquilo	4.00

	ALA	64	Pi-Alquilo	5.14
	LEU	52	Pi-Alquilo	4.34
	PHE	47	Pi-Sulfuro	5.93
Variante E				
Nelfinavir	PHE	46	Pi-Alquilo	5.36
	LEU	101	Pi-Alquilo	4.65
	ILE	68	Alquilo	5.40
	ALA	63	Alquilo	4.26
	HIS	132	Pi-Pi Stacked	4.33
	PHE	52	Pi-Pi Stacked	3.87
	ARG	103	Enlace de hidrógeno	1.92 y 2.63
	ARG	75	Enlace de hidrógeno NF Positivo-Positivo	2.50 4.78
Indinavir	ILE	68	Pi-Alquilo	4.87
	HIS	132	Pi-Alquilo	5.22
	VAL	54	Pi-Alquilo	4.98
	LEU	51	Alquilo	5.09 y 5.40
	PHE	52	Pi-Pi Stacked	4.14
	ARG	134	Enlace de hidrógeno NF Positivo-Positivo	2.07 y 2.26 4.94 y 4.79
	ARG	75	NF Positivo-Positivo	4.57 y 5.44
Darapladib	ARG	75	Enlace de hidrógeno	2.94 y 2.98
	ARG	134	Enlace de hidrógeno	2.37
	ARG	103	Enlace de hidrógeno	2.83

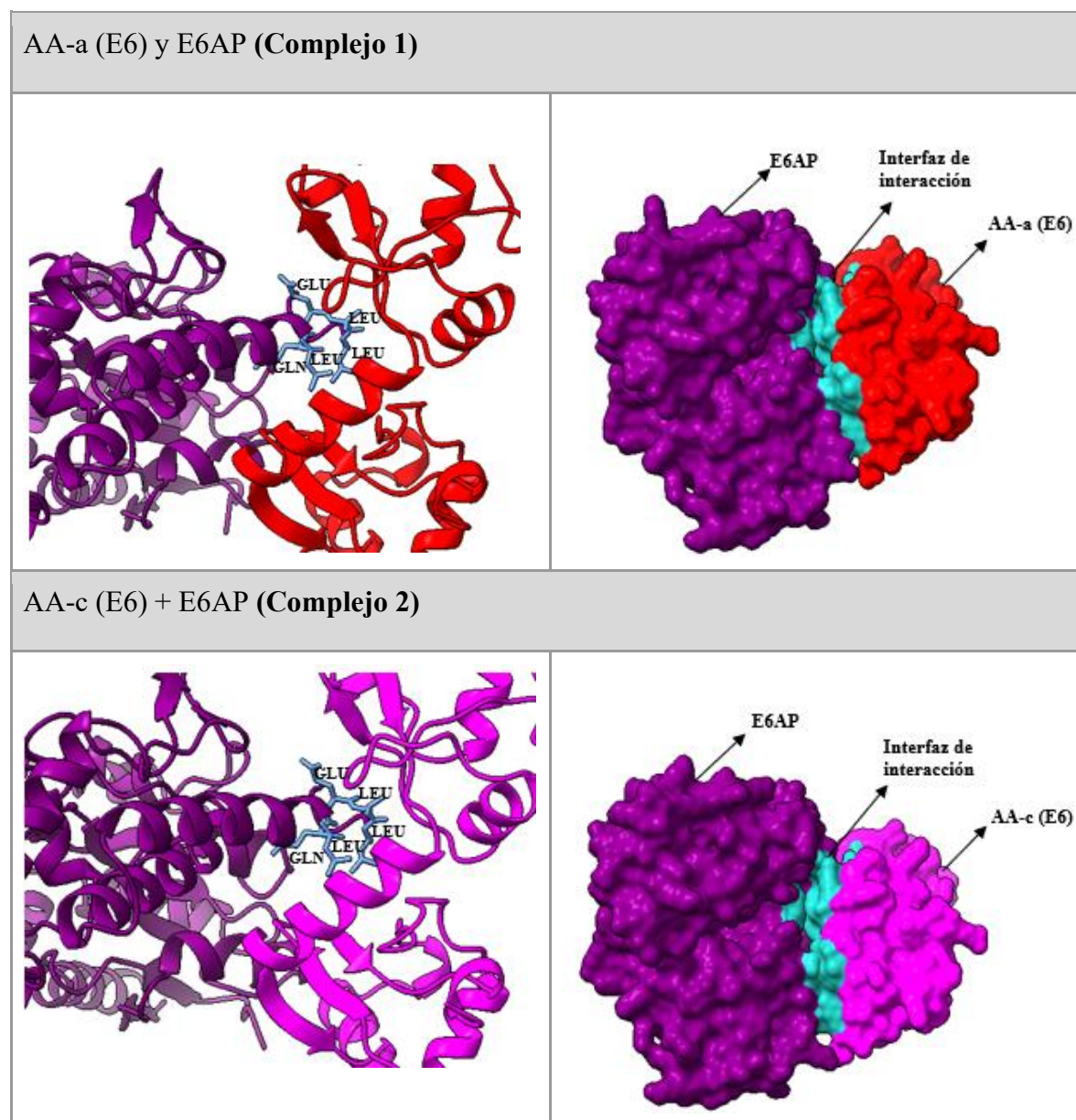
	PHE	52	Enlace de hidrógeno Pi-Pi Stacked	2.08 4.76
	HIS	132	Pi-Pi Stacked	4.09
	LEU	101	Pi-Alquilo Halógeno (flúor)	4.81 3.06
	TYR	11	Pi-Pi Stacked Halógeno (flúor)	3.79 4.34
Flumatinib	ILE	68	Pi-Alquilo	4.85
	LEU	51	Pi-Alquilo	5.46
	TYR	71	Pi-Alquilo Pi-Pi Stacked	3.92 4.96
	ARG	75	Pi-Alquilo Enlace de hidrógeno	4.94 2.38
	ARG	103	Enlace de hidrógeno	2.46
Belinostat	ILE	68	Pi-Alquilo	3.99
	ALA	63	Pi-Alquilo	5.13
	LEU	51	Pi-Alquilo	4.31
	GLN	108	Enlace de hidrógeno	2.53 y 2.35
	ARG	75	Enlace de hidrógeno	2.85 y 2.59
	ARG	134	Enlace de hidrógeno	2.43 y 2.52
	PHE	46	Pi-Sulfuro	5.82

Docking molecular variantes + blanco molecular

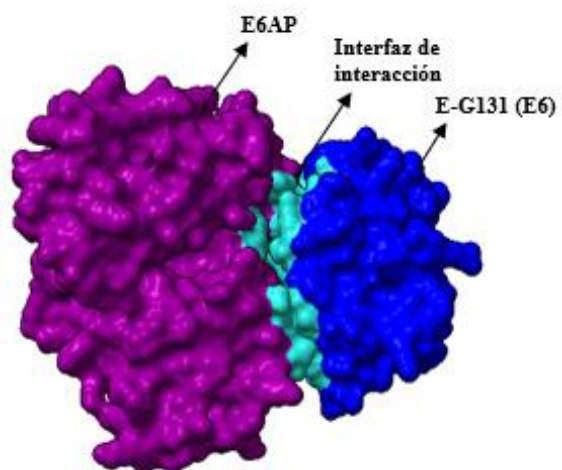
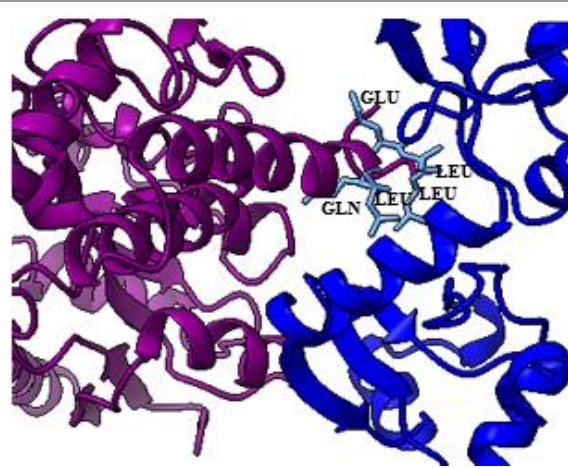
El acoplamiento proteína viral-proteína blanco muestra una predicción de la interfaz de interacción entre las variantes modeladas de E6 y E6AP, específica para el péptido LXXLL, pero además considera otras superficies de interacción secundarias. Todas las variantes, tanto

de VPH-16 como de VPH-18, tienen los siguientes aminoácidos para el péptido mencionado: LEU 374, GLN 375, GLU 376, LEU 377 y LEU 378. La predicción particular de las interacciones (Tablas 18 y 19), muestran variación en las regiones de interfaz para ambas cepas.

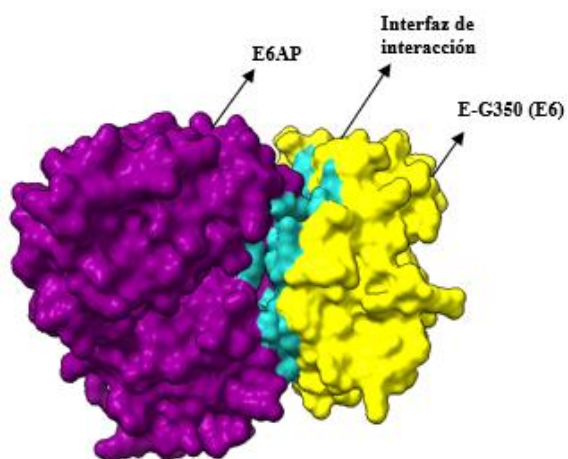
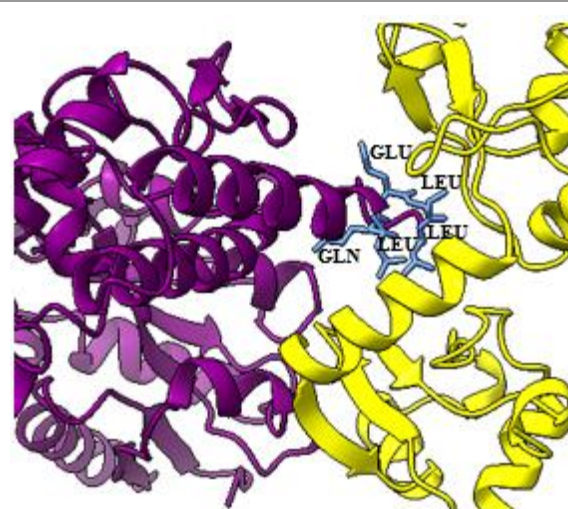
Tabla 18. Acoplamiento proteína-proteína entre las variantes del VPH-16 Y E6AP. En la imagen de la izquierda se identifica el péptido de unión LXXLL y la derecha muestra la superficie de interacción completa entre ambas proteínas.



E-G131(E6) + E6AP (Complejo 3)



E-G350 (E6) + E6AP (Complejo 4)



E-A176/G350 (E6) + E6AP (Complejo 5)

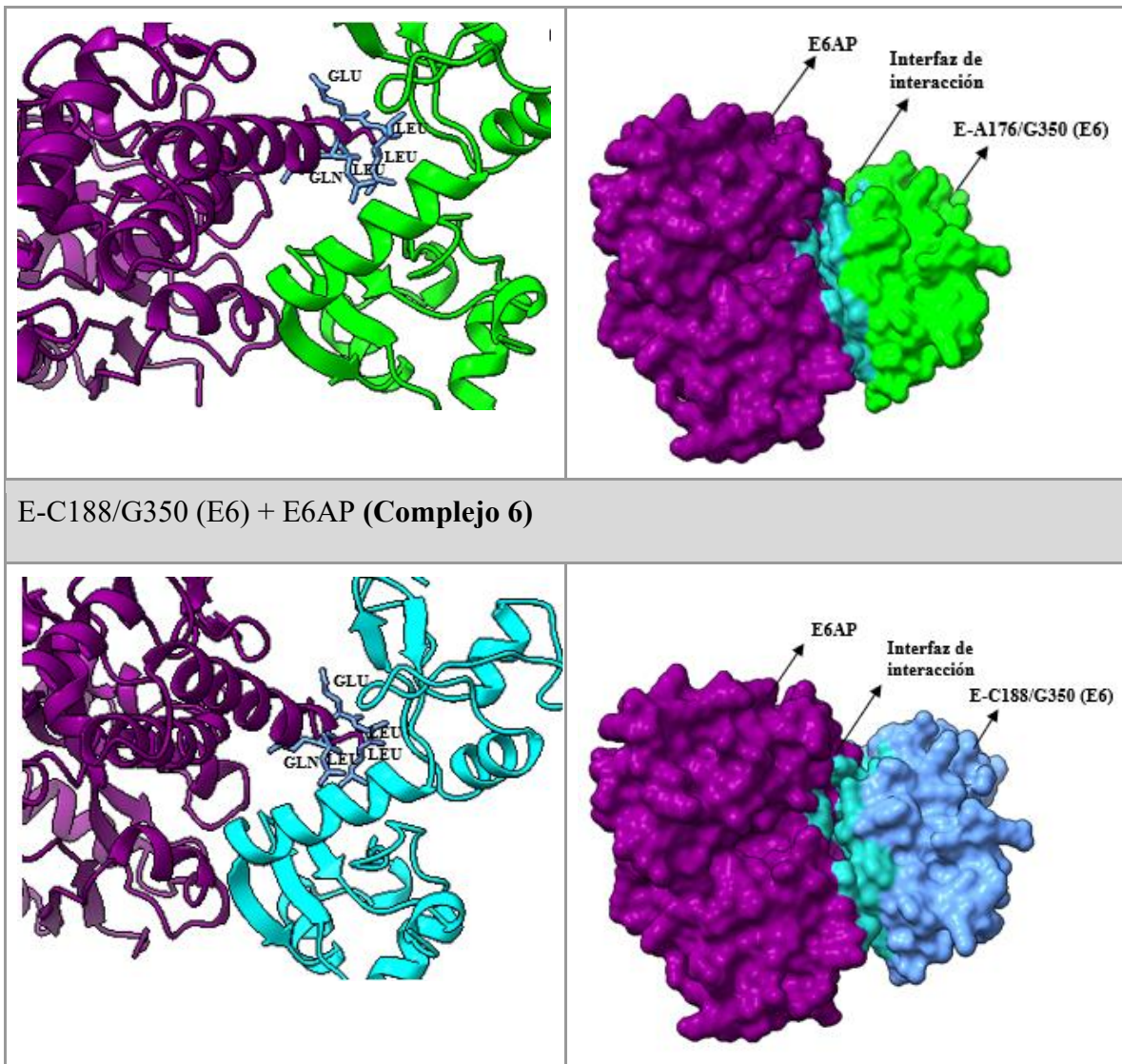


Tabla 19. Acoplamiento proteína-proteína entre las variantes del VPH-18 Y E6AP: En la columna izquierda se muestra la superficie de interacción del complejo con la variante Af y a la derecha la superficie del complejo con la variante E.

Af (E6) + E6AP (Complejo 7)	E (E6) + E6AP (Complejo 8)
-----------------------------	----------------------------

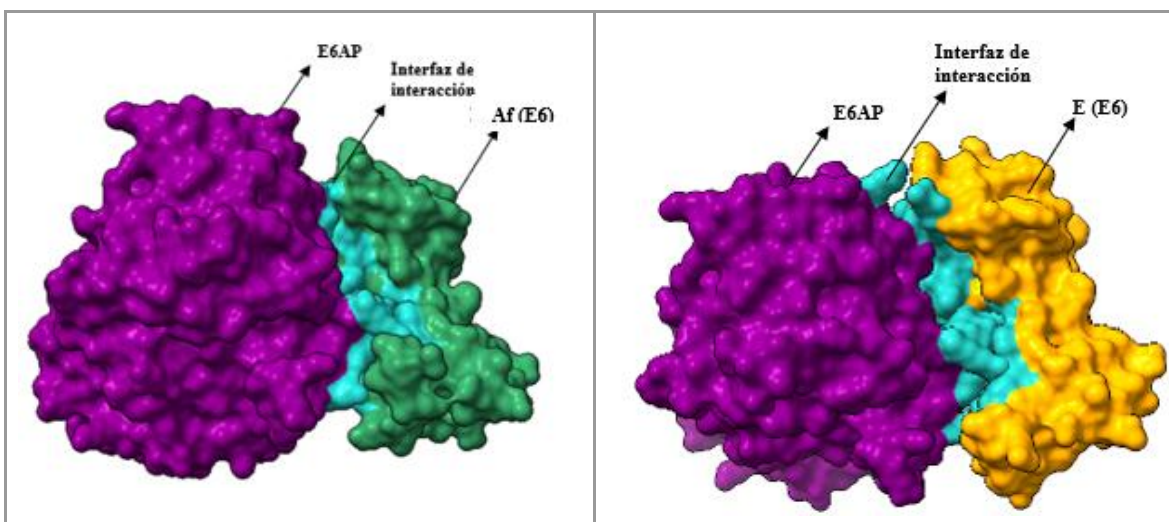


Tabla 20. Resultados de la interacción proteína viral-proteína blanco con las variantes del VPH-16: Se reporta el número de interacciones favorables no covalentes en el complejo y los residuos que interactúan por puentes de hidrógeno. El primero siempre corresponde a la proteína viral y el segundo a la proteína blanco (en negritas se señalan aquellas uniones que se conservan en todas las variantes).

Modelo	Interacciones favorables totales no covalentes (< 5.6)	Residuos implicados con puentes de hidrógeno (< 4)
Complejo 1	24	ARG 54 - GLU 376 ARG 128 - GLU 371 ARG 130 - GLU 371 TYR 31 - ALA 370 CYS 50 - LEU 377 ARG 54 - THR 373 TYR 80 - GLN 49 GLN 90 - GLN 49 ARG 128 - PRO 334 TYR 53 - LYS 179 TYR 31 - LEU 374
Complejo 2	25	ARG 54- GLU 376 ARG 130 - GLU 371 TYR 31 - ALA 370 CYS 50 - LEU 377 ARG 54 - THR 373 TYR 80 - GLN 49

		GLN 90 - GLN 49 ARG 128 - PRO 334 TYR 53 - LYS 179 TYR 31 - LEU 374 ARG 128 - GLU 371
Complejo 3	20	ARG 54 - GLU 376 ARG 76 - GLU 371 TYR 31 - ALA 370 CYS 50 - LEU 377 ARG 54 - THR 373 TYR 31 - LEU 374 CYS 50 - ARG 382
Complejo 4	22	ARG 54 - GLU 376 ARG 9 - GLU 381 TYR 31 - ALA 370 CYS 50 - LEU 377 ARG 54 - THR 373 ARG 128 - PRO 334 TYR 53 - LYS 179 TYR 31 - LEU 374 GLY 129 - SER 73
Complejo 5	19	ARG 54 - GLU 376 TYR 31 - ALA 370 CYS 50 - LEU 377 ARG 54 - THR 373 ARG 128 - PRO 334 TYR 53 - LYS 179 TYR 31 - LEU 374
Complejo 6	18	ARG 54 - GLU 376 ARG 76 - GLU 371 TYR 31 - ALA 370 CYS 50 - LEU 377 ARG 54 - THR 373 TYR 31 - LEU 374

Tabla 21. Resultados de la interacción proteína viral-proteína blanco con las variantes del VPH-18: Se reporta el número de interacciones favorables no covalentes en el complejo y los residuos que interactúan por puentes de hidrógeno. El primero siempre corresponde a la

proteína viral y el segundo a la proteína blanco. Se destaca que no hay interacciones comunes entre complejos.

Modelo	Interacciones favorables totales no covalentes (< 5.6)	Residuos implicados con puentes de hidrógeno (< 4)
Complejo 7	17	ARG 53 - GLU 376 ARG 72 - GLU 380 TYR 30 - ALA 370 PHE 49 - LEU 377 ARG 53 - THR 373 LYS 125 - PRO 48 TYR 52 - LYS 179 PHE 49 - LEU 377
Complejo 8	20	ARG 56 - GLU 376 ARG 75 - GLU 380 TYR 33 - ALA 370 PHE 52 - LEU 377 ARG 56 - THR 373 SER 81 - GLN 49 TYR 55 - LYS 179

Como se observa en las tablas 20 y 21, la interfaz de unión entre las proteínas virales y la proteína celular involucran más residuos que solamente el péptido LXXLL. De hecho, en las tablas se muestra que en promedio 24 residuos para VPH-16, y 19 residuos para VPH-18, forman parte de la interfaz de interacción, aunque el número exacto y los residuos enlazados difieren en cada una. En el caso de las proteínas del VPH-16, el complejo 1 y 2 (AA-c + E6AP y AA-a + E6AP, respectivamente) tienen más interacciones que las demás, mientras que las variantes de los complejos 5 y 6 (E-A176/G350 + E6AP y E-C188/G350 + E6AP, respectivamente) son las de menor interacción, es decir, menor número de residuos involucrados. Las variantes del VPH-18 tienen una interfaz con E6AP con menos interacciones que todas las anteriores, 17 en Af y 20 en E.

En cuanto al tipo de fuerzas intermoleculares, los enlaces de hidrógeno son las interacciones con menor distancia entre las variantes de VPH-16 y E6AP, todas <4 Å: Complejos 1 y 2 formaron once, Complejos 3 y 5 formaron siete, Complejo 4 formó nueve y Complejo 6 formó seis. Dentro de estas interacciones, hay cinco que se conservan en las seis variantes, es decir, mismos aminoácidos en la misma posición que enlazan a ambas

proteínas, el primer residuo siempre corresponde a la proteína E6 y el segundo a E6AP: ARG 54 con GLU 376; TYR 31 con ALA 370; CYS 50 con LEU 377; ARG 54 con THR 373; TYR 31 con LEU 374. Estas interacciones también involucran a algunos de los residuos del péptido LXXLL (LEU 374, GLU 376 y LEU 377).

Destaca el hecho que para ambas variantes del VPH-18 solo se conservan dos residuos del péptido LXXLL (GLU 376 y LEU 377) de E6AP, interactuando por puentes de hidrógeno. En el virus ningún residuo se conserva, generando diferencias en los sitios donde los puentes de hidrógeno se establecen en esta interacción. No obstante, la distancia promedio de los puentes es $< 3 \text{ \AA}$ y en ambas variantes se establecen siete puentes de hidrógeno, además de otro tipo de interacciones (Figura 11 y 12). Por lo que se puede afirmar que las variantes de VPH-18 son más heterogéneas entre sí que las de VPH-16.

Visualmente la superficie del péptido cae en la hélice alfa de E6 (hendidura para proteínas objetivo) (Tabla 19), pero en las Figuras 11 y 12, donde se detalla el contacto entre ambas proteínas, se señala que el residuo GLN 375 (posición dos en LXXLL) no se enlaza a una distancia óptima que le permita formar parte de la interfaz de unión. Esto ocurre en ambas variantes.

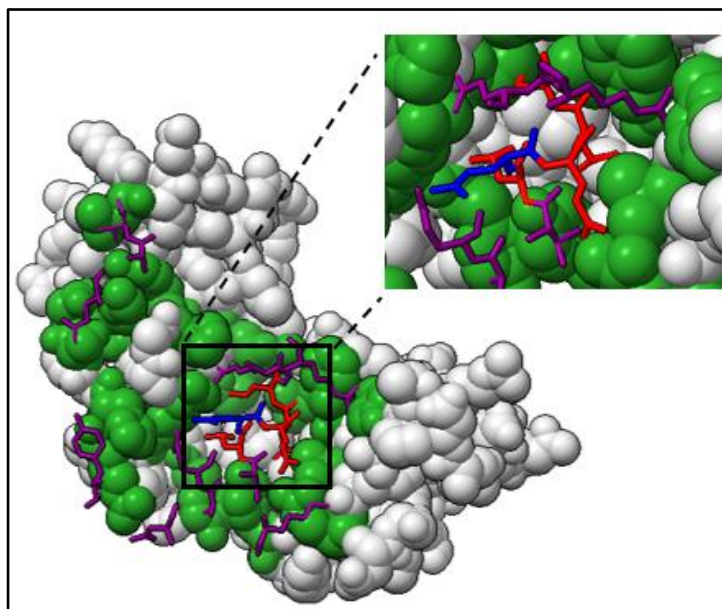


Figura 11. Interacción proteína-proteína entre Af del VPH-18 (esferas) y E6AP (líneas). La zona en color verde corresponde a la superficie de E6 involucrada en la unión. Los residuos de E6AP en color rojo simbolizan la parte del péptido LXXLL que interactúa. El residuo en azul (GLN 375, posición 2 de LXXLL) no participa en la interfaz de unión.

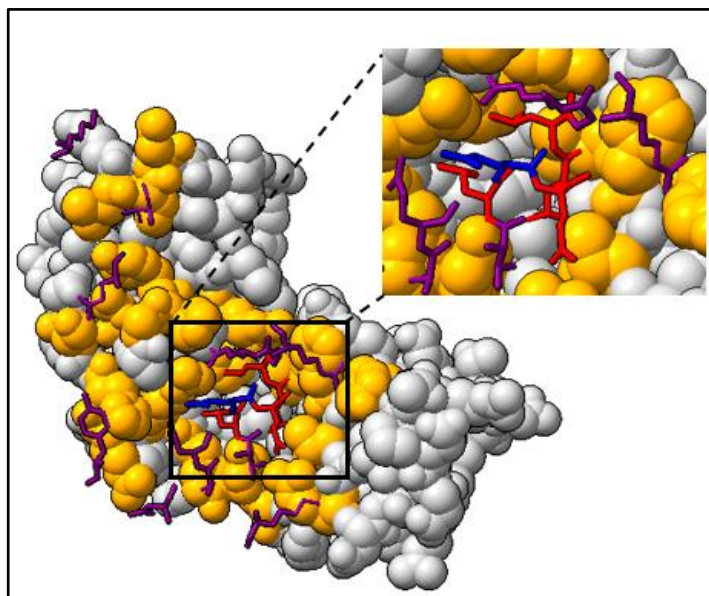


Figura 12. Interacción proteína-proteína entre E del VPH-18 (esferas) y E6AP (líneas). La zona en color verde corresponde a la superficie de E6 involucrada en la unión. Los residuos de E6AP en color rojo simbolizan la parte del péptido LXXLL que interactúa. El residuo en azul (GLN 375, posición 2 de LXXLL) no participa en la interfaz de interacción.

Modificaciones propuestas de fármacos seleccionados

Los resultados del acoplamiento fármaco-proteína viral indican que las variantes del VPH-16 tuvieron mayor afinidad con Nelfinavir (Tabla 6) y las variantes del VPH-18 con Darapladib (Tabla 7), y contra ambas variantes Flumatinib (Tablas 6 y 7); por lo que la propuesta de modificación fue precisamente de estos tres medicamentos. En la Tabla 22 se muestra que dichos cambios se basaron en agregar grupos polares pequeños: en los modificados de Darapladib y Flumatinib se reemplazaron halógenos (flúor) por aminas y en el modificado de Nelfinavir se agregó un grupo hidroxilo al tercer anillo aromático, que tiene una posición isomérica respecto a la molécula.

Tabla 22. Modificación estructural de los fármacos de mayor afinidad Primera columna: nombre del compuesto seleccionado. Segunda columna: estructura química original. Tercera columna: fármaco modificado.

Fármaco	Estructura original	Estructura modificada
---------	---------------------	-----------------------

Darapladib		
Flumatinib		
Nelfinavir		

La evaluación farmacocinética de las estructuras modificadas (Tabla 23) muestran que todas las modificaciones cumplen con al menos tres criterios de Lipinski. Flumatinib, que fue el fármaco con afinidad para ambas cepas, al modificarlo mostró solo una violación a la regla de Lipinski.

Tabla 23. Regla de Lipinski de similitud con fármacos (*) y perfil de hepatotoxicidad. Clave M1 es el modificado de Darapladib, M2 modificado de Flumatinib y M3 modificado de Nelfinavir.

Clave del compuesto	*Peso molecular (<500 DA)	*No. de enlaces rotativos (<15)	*No. de donantes de enlaces de hidrógeno (<5)	*No. de aceptores de enlaces de hidrógeno (<10)	*Lipofiliidad (LOGP <5)	Violaciones	Toxicidad (enfoque hepatotóxico)
---------------------	---------------------------	---------------------------------	---	---	-------------------------	-------------	----------------------------------

M1	624.84	15	2	8	6.34	2	Inactivo
M2	551.69	9	3	10	4.9	1	Inactivo
M3	583.78	12	5	9	5.17	2	Inactivo

Docking molecular de las variantes + fármacos modificados

El acoplamiento molecular entre las variantes virales y Flumatinib modificado (M2), resulta en el aumento de afinidad con todas las variantes del VPH-16. El acoplamiento con Nelfinavir modificado (M3) obtuvo mayor afinidad pero solo con la variante G-131. Darapladib modificado (M1) no mostró cambios importantes en afinidad en comparación con los fármacos probados al inicio (Tabla 24). Por otro lado, las dos variantes del VPH-18 no obtuvieron valores más favorables con las nuevas propuestas que con los fármacos que ya se encuentran en uso (Tabla 25).

Tabla 24. Resultados de los valores de afinidad de unión entre los fármacos modificados y las variantes del VPH-16. Clave M1 es el modificado de Darapladib, M2 modificado de Flumatinib y M3 modificado de Nelfinavir. En color gris resaltan los resultados cuya energía de enlace es más fuerte. En la última fila se indica nuevamente el valor de acoplamiento con el fármaco original.

Clave de modificación (M#)	Variantes					
	AA-c	AA-a	E-G350	E-A176/G350	E-C188/G350	E-G131
	Energía libre de enlace (kcal/mol)					
M1	-6.5	-6.8	-6.6	-7	-6.6	-6.7
M2	-8.9	-8.8	-9	-8.4	-8.5	-8.5
M3	-8.3	-8.3	-8	-8	-8	-8.8

Fármaco original						
Darapladib	-6.8	-6.4	-6.7	-6.5	-6.5	-6.5
Flumatinib	-8.3	-8.4	-8.3	-8.3	-8.3	-8.3
Nelfinavir	-8.4	-8.4	-8	-8	-8	-8.1

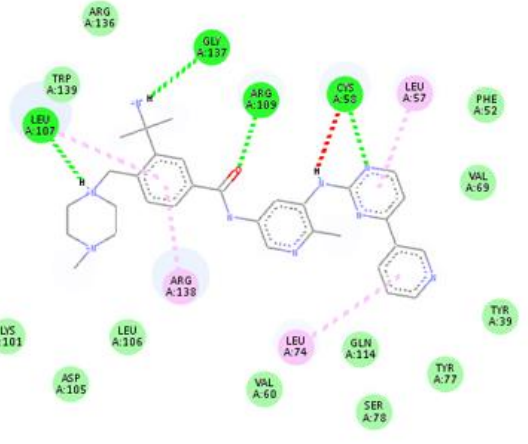
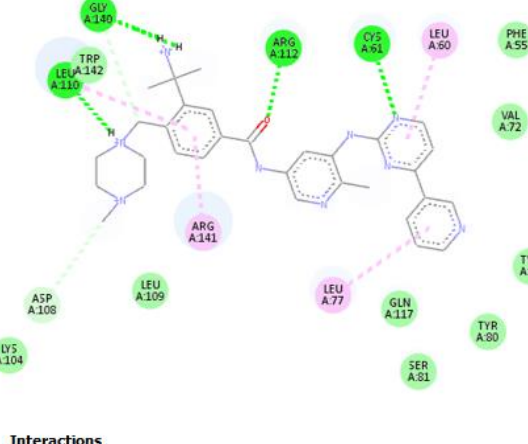
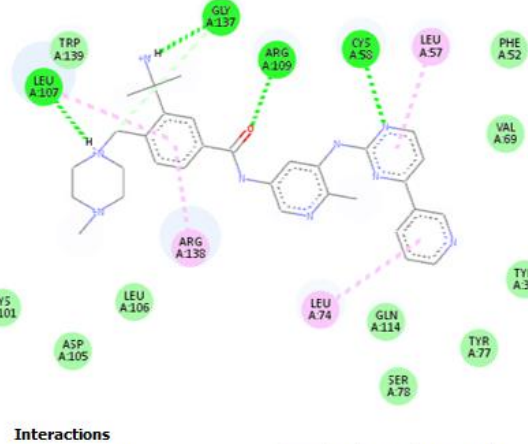
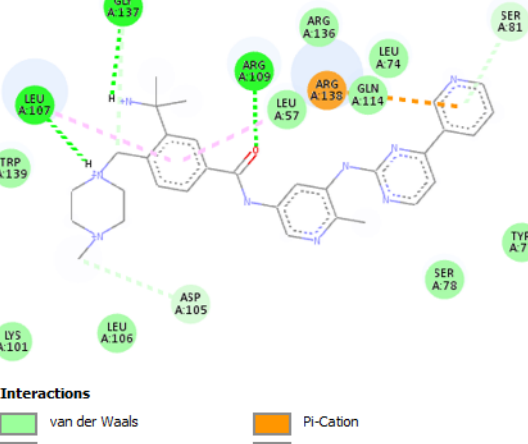
Tabla 25. Resultados de los valores de afinidad de unión entre los fármacos modificados y las variantes del VPH-18. Clave M1 es el modificado de Darapladib, M2 modificado de Flumatinib y M3 modificado de Nelfinavir.

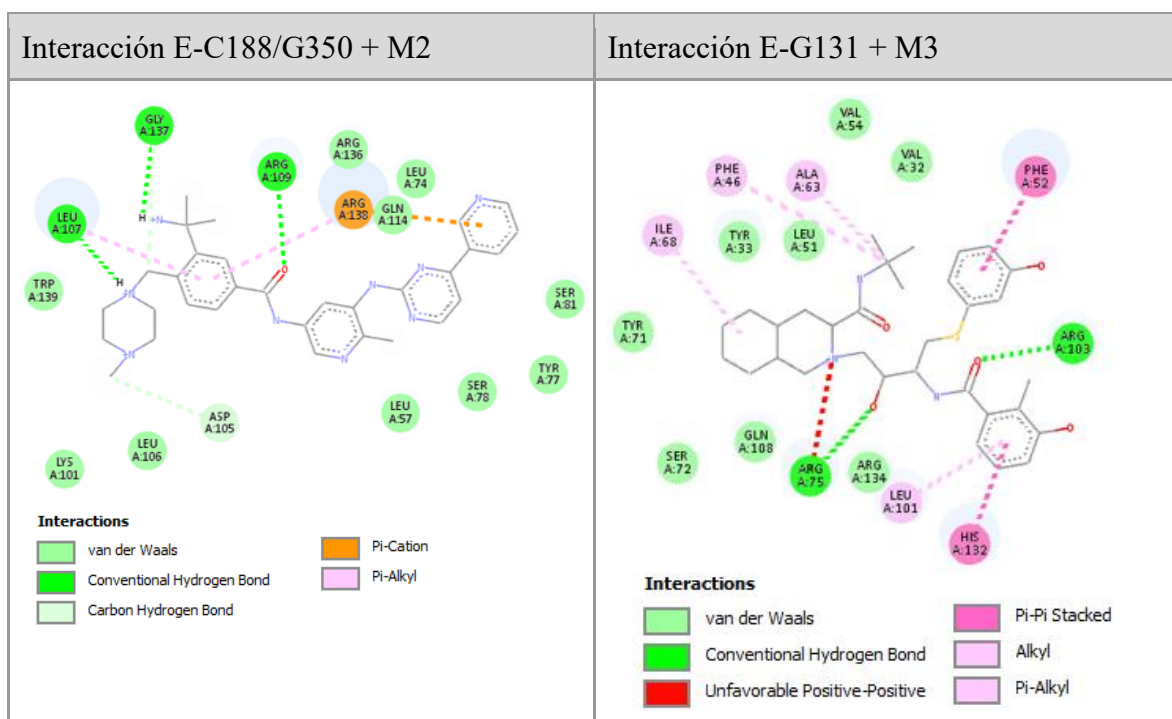
Clave de modificación (M#)	Variantes	
	Af	E
	Energía libre de enlace (kcal/mol)	
M1	-8.2	-8.8
M2	-8.8	-8.8
M3	-8.8	-8.4
Fármaco original		
Darapladib	-9.4	-9.4
Flumatinib	-9.2	-9.2
Nelfinavir	-8.8	-8.8

Las interacciones específicas entre el ligando y la proteína viral se muestran para las variantes del VPH-16 porque obtuvieron mayor afinidad con alguno de los fármacos modificados que con los seleccionados al inicio (Tabla 24) y son posibles inhibidores de la interacción con E6AP. La tabla 26 muestra que todas las variantes probadas con M2 (Modificado de Flumatinib) cumplieron con el objetivo de aumentar las interacciones por puentes de hidrógeno, ya que con la estructura del fármaco original no se formó ninguna (Tablas 8-12). La variante E-G131, que se acopló con M3 (Modificado de Nelfinavir),

aunque no aumentó el número de estas interacciones, el incremento en el valor de afinidad se asocia a la formación de otro tipo de fuerzas como las π Alquilo y las de Apilamiento (Pi-Pi Stacked), que no están presentes con la estructura original.

Tabla 26. Interacciones de las variantes del VPH-16 con las estructuras modificadas de los fármacos de mayor afinidad: Se muestra el diagrama en 2D de las interacciones en el sitio activo y el tipo de fuerzas intermoleculares.

Interacción AA-a + M2	Interacción AA-c + M2
 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Unfavorable Donor-Donor Pi-Alkyl 	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Pi-Alkyl Carbon Hydrogen Bond
Interacción E-G350 + M2	Interacción E-A176/G350 + M2
 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond Pi-Alkyl 	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond Pi-Alkyl Pi-Cation Pi-Donor Hydrogen Bond



Interacción proteína-fármaco-proteína

El sobrelape de la proteína viral E6 y la proteína blanco E6AP en conjunto con la propuesta farmacológica para todas las variantes del VPH-16 se muestra en la Tabla 27. Todos los complejos se empalman con el fármaco modificado de Flumatinib, excepto la variante E-G131 que se empalma con el modificado de Nelfinavir, de acuerdo con los resultados en el valor de afinidad (Tabla 24). De forma general, ambos fármacos modificados obstruyen la unión entre ambas proteínas, pero la interacción con E6 siempre es más amplia en cuanto a superficie en comparación con E6AP. A excepción del complejo con la variante E-A176-G350, ambas propuestas farmacológicas interactúan con el péptido LXXLL de E6AP bloqueando todos los residuos de leucina de este sitio (Tabla 29), por lo que resulta en una propuesta con mejor interacción y obstrucción que los fármacos originales.

En todos los casos se obstruyen principalmente residuos cercanos al extremo C-terminal de E6AP, pero hay tres variantes donde se bloquea un residuo alejado de este extremo. Es el caso de las dos variantes asiático-americanas (AA), donde se inhibe la interacción en SER 73 y el caso de la variante E-G350, que se bloquea GLN 72. Es decir, el fármaco modificado de Flumatinib en la variantes asiático-americanas y en la europea E-

G350, más allá de cubrir el sitio de unión con LXXLL, bloquea otras zonas en E6AP. Esto no se observa en ninguna otra variante del VPH-16 ni del VPH-18.

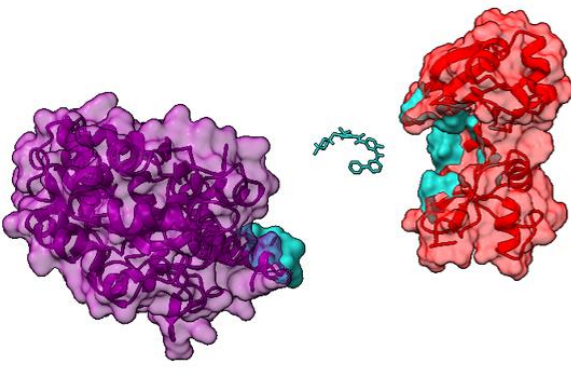
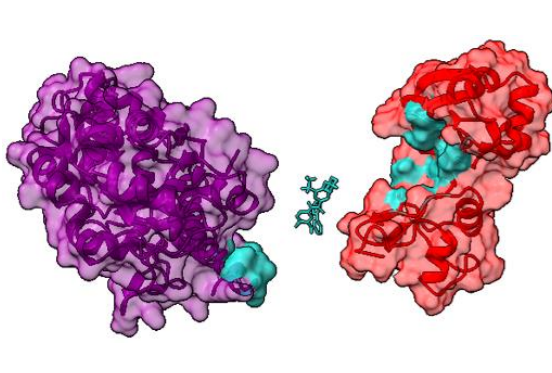
En el trímero con E-A176/G350 no se identifica una superficie de bloqueo entre el fármaco modificado de Flumatinib y LXXLL de E6AP (Tabla 27), mientras que con el fármaco original sí; sin embargo, la inhibición de E6 por parte del fármaco modificado es innegable, ya que la afinidad con la proteína viral supera a la obtenida con el fármaco original (Tablas 6 y 24). Es decir, las fuerzas entre el fármaco modificado y la variante E-A176/G350 del VPH-16 son lo suficientemente fuertes para que las uniones más favorables se formen con esta proteína. Aunado a esto, la parte inhibida de E6 es similar en todos los complejos en cuanto al tipo y número de aminoácidos implicados (9-12 residuos), que cabe señalar es mayor que con el fármaco original en todos los casos.

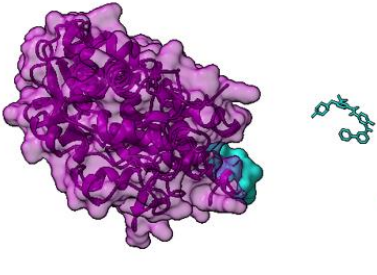
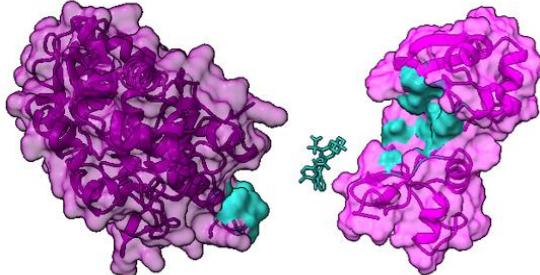
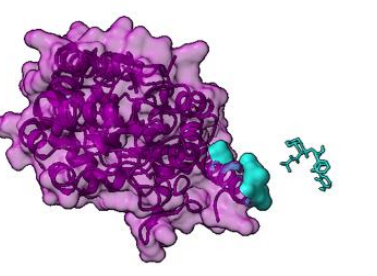
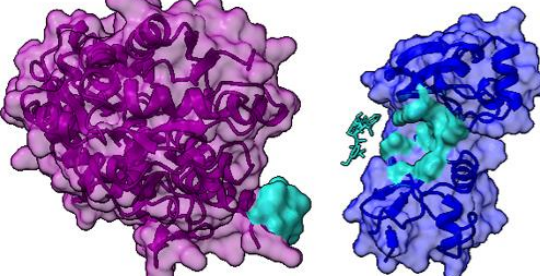
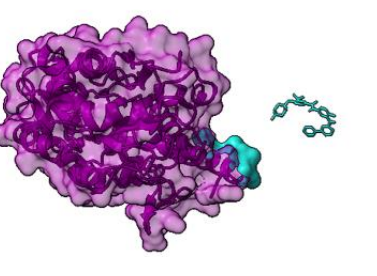
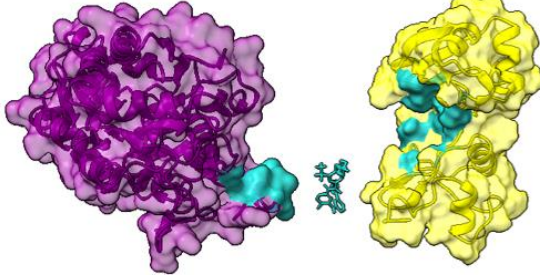
El resultado es que todos los trímeros “E6- modificado de Flumatinib- E6AP” son favorables, tanto porque inhiben a E6 ,como porque cubren la hendidura de unión con el péptido LXXLL. El modificado de Flumatinib en las variantes AA-a, AA-c, E-G350 abarca una interfaz de interacción mayor en E6 que las otras variantes del VPH-16; la variante E-A176/G350 es la única que parece bloquear por completo a E6 sin unirse a E6AP, lo que no se observa con el fármaco original.

El modificado de Nelfinavir, que únicamente fue seleccionado para la variante E-G131 de acuerdo con los resultados en el valor de afinidad, es consistente con los la cantidad y tipo de residuos que se bloquean en el complejo, ya que este número aumenta en comparación con la interacción del fármaco original (Tabla 28). En la mayoría de los trímeros, a excepción del complejo con E-G350, la cantidad de residuos que interactúan con E6AP, no cambia independientemente si se utiliza el fármaco original o el modificado, lo que cambia, e incluso se incrementa, es la zona de obstrucción principalmente sobre la proteína viral. La interacción en el complejo de E-G131 es similar a lo que ocurre con E-G350 y el modificado de Flumatinib; en ambos casos el fármaco original no logra inhibir todos los residuos en E6AP como en los demás complejo; pero con las modificaciones estructurales realizadas, se bloquea el residuo faltante que probablemente aporta cohesión a la obstrucción proteína-proteína favorablemente.

En la Tabla 28 se muestran las mismas conformaciones triméricas pero con las dos variantes del VPH-18 y el fármaco Darapladib, cabe reiterar que este fármaco al ser modificado no mejoró su afinidad por E6, por lo que se respeta la molécula original como propuesta de tratamiento en este análisis. En ambas imágenes, la zona de interacción (color azul) muestra que el fármaco original cubre más residuos del péptido LXXLL que las variantes del VPH-16, lo que se confirma en la Tabla 30. Las Figuras 11 y 12 indican que las proteínas E6 de ambas variantes del VPH-18 tienen mayor afinidad por dos residuos específicos del péptido (GLU 376 y LEU 377), los cuales quedan bloqueados por el fármaco. Aunado a estas dos posiciones, Darapladib también inhibe la unión con el residuo LEU 374 solo en “Af” y LEU 378 tanto en “Af” como en “E”, además de interactuar con otros aminoácidos cercanos al extremo N de la proteína blanco (Tabla 30). Esto confirma que la hendidura de unión de E6 queda cubierta por el fármaco.

Tabla 27. Comparación entre complejos triméricos. En la columna izquierda la interacción entre la proteína viral del VPH-16-fármaco original-proteína blanco y en la columna derecha la proteína viral del VPH-16-fármaco modificado-proteína blanco. Se observa el sitio y la superficie de bloqueo entre por el fármaco seleccionado, así como el número de residuos involucrados.

E6AP + Flumatinib + AA-a	E6AP + Modificado de Flumatinib + AA-a
	
Residuos implicados: 14 Residuos de E6: 9 Residuos de E6AP: 5	Residuos implicados: 17 Residuos de E6: 12 Residuos de E6AP: 5
E6AP + Flumatinib + AA-c	E6AP + Modificado de Flumatinib +

	AA-c
	
Residuos implicados: 14 Residuos de E6: 9 Residuos de E6AP: 5	Residuos implicados: 17 Residuos de E6: 12 Residuos de E6AP: 5
E6AP + Nelfinavir + E-G131	E6AP + Modificado de Nelfinavir + E-G131
	
Residuos implicados: 15 Residuos de E6: 11 Residuos de E6AP: 4	Residuos implicados: 16 Residuos de E6: 11 Residuos de E6AP: 5
E6AP + Flumatinib + E-G350	E6AP + Modificado de Flumatinib + E-G350
	
Residuos implicados: 13 Residuos de E6: 9	Residuos implicados: 17 Residuos de E6: 12

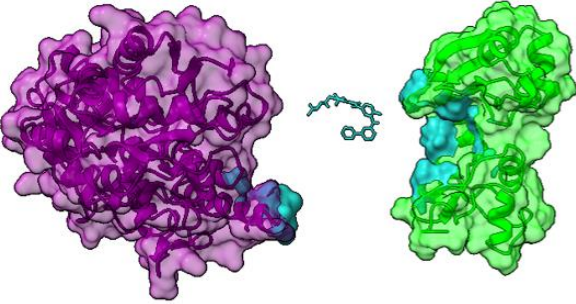
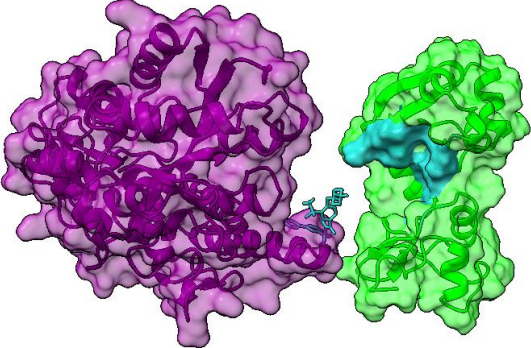
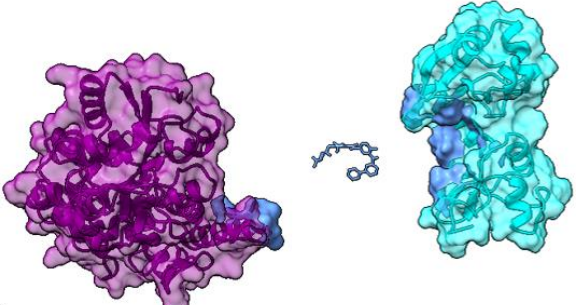
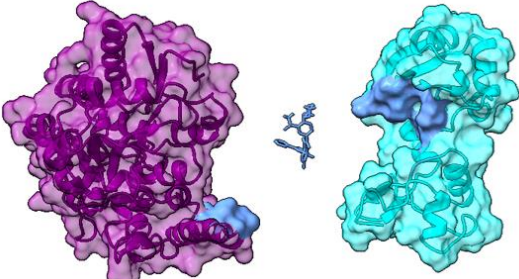
Residuos de E6AP: 4	Residuos de E6AP: 5
E6AP + Flumatinib + E-A176/G350	E6AP + Modificado de Flumatinib + E-A176/G350
	
Residuos implicados: 14 Residuos de E6: 10 Residuos de E6AP: 4	Residuos implicados: 11 Residuos de E6: 11 Residuos de E6AP: No se presentan
E6AP + Flumatinib + E-C188/G350	E6AP + Modificado de Flumatinib + E-C188/G350
	
Residuos implicados: 14 Residuos de E6: 10 Residuos de E6AP: 4	Residuos implicados: 15 Residuos de E6: 11 Residuos de E6AP: 4

Tabla 28. Interacción en trimérica de la proteína viral del VPH-18-fármaco-proteína blanco. Se observa el sitio y la superficie de bloqueo entre la proteína viral y la proteína blanco por el fármaco seleccionado.

E6AP + Darapladib + Af	E6AP + Darapladib + E
-------------------------------	------------------------------

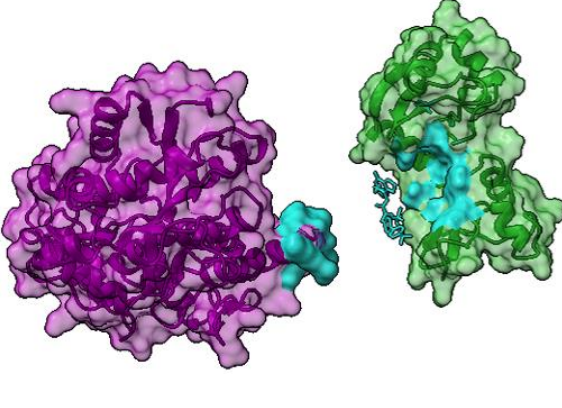
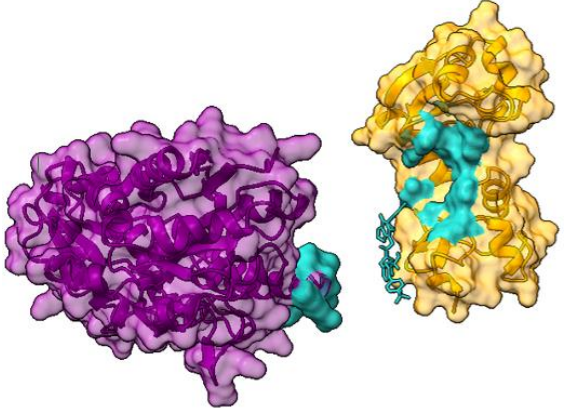
	
Residuos implicados: 16 Residuos de E6: 10 Residuos de E6AP: 6	Residuos implicados: 14 Residuos de E6: 10 Residuos de E6AP: 4

Tabla 29. Residuos implicados en la interacción del trímero de las variantes del VPH-16. Se muestra cada complejo con dos columnas, la primera enlista los posibles aminoácidos que se unen con mayor fuerza al fármaco modificado y la segunda indica la cadena a la que pertenece el residuo.

TRÍMERO CON AA-a		TRÍMERO CON AA-c		TRÍMERO CON E-G131	
Residuo	Cadena de origen	Residuo	Cadena de origen	Residuo	Cadena de origen
TYR 39	E6	TYR 42	E6	TYR 33	E6
LEU 57	E6	LEU 60	E6	LEU 51	E6
CYS 58	E6	CYS 61	E6	PHE 52	E6
VAL 60	E6	VAL 63	E6	VAL 54	E6
LEU 74	E6	LEU 77	E6	ILE 68	E6
LEU 106	E6	LEU 109	E6	ARG 75	E6
LEU 107	E6	LEU 110	E6	LEU 101	E6
ARG 109	E6	ARG 112	E6	ARG 103	E6
GLN 114	E6	GLN 117	E6	GLN 108	E6

GLY 137	E6	GLY 140	E6	HIS 132	E6
ARG 138	E6	ARG 141	E6	ARG 134	E6
TRP 139	E6	TRP 142	E6		
SER 73	E6AP	SER 73	E6AP	LEU 374	E6AP
LEU 374	E6AP	LEU 374	E6AP	LEU 377	E6AP
LEU 377	E6AP	LEU 377	E6AP	LEU 378	E6AP
LEU 378	E6AP	LEU 378	E6AP	GLY 379	E6AP
GLU 380	E6AP	GLU 380	E6AP	GLU 380	E6AP
TRÍMERO E-G350		TRÍMERO E-A176/G350		TRÍMERO E-C188/G350	
Residuo	Cadena de origen	Residuo	Cadena de origen	Residuo	Cadena de origen
TYR 39	E6	LEU 57	E6	LEU 57	E6
LEU 57	E6	CYS 58	E6	CYS 58	E6
CYS 58	E6	SER 81	E6	SER 81	E6
VAL 60	E6	LEU 106	E6	LEU 106	E6
LEU 74	E6	LEU 107	E6	LEU 107	E6
LEU 106	E6	ARG 109	E6	ARG 109	E6
LEU 107	E6	GLN 114	E6	GLN 114	E6
ARG 109	E6	ARG 136	E6	ARG 136	E6
GLN 114	E6	GLY 137	E6	GLY 137	E6
GLY 137	E6	ARG 138	E6	ARG 138	E6
ARG 138	E6	TRP 139	E6	TRP 139	E6
TRP 139	E6			LEU 374	E6AP
GLN 72	E6AP			GLN 375	E6AP
LEU 374	E6AP			LEU 378	E6AP
LEU 377	E6AP			GLU 380	E6AP

LEU 378	E6AP				
GLU 380	E6AP				

Tabla 30. Residuos implicados en la interacción del trímero de las variantes del VPH-18. Se muestra cada complejo con dos columnas, la primera enlista los posibles aminoácidos que se unen con mayor fuerza al fármaco Darapladib y la segunda indica la cadena a la que pertenece el residuo.

TRÍMERO CON Af		TRÍMERO CON E	
Residuo	Cadena de origen	Residuo	Cadena de origen
TYR 12	E6	TYR 11	E6
TYR 34	E6	TYR 33	E6
LEU 52	E6	LEU 51	E6
PHE 53	E6	PHE 52	E6
VAL 55	E6	VAL 54	E6
ILE 69	E6	ARG 75	E6
ARG 76	E6	LEU 101	E6
ARG 104	E6	ARG 103	E6
GLN 109	E6	GLN 108	E6
ARG 135	E6	HIS 132	E6
		ARG 134	E6
LEU 374	E6AP	GLU 376	E6AP
GLU 376	E6AP	LEU 377	E6AP
LEU 377	E6AP	LEU 378	E6AP
LEU 378	E6AP	GLU 380	E6AP
GLU 380	E6AP	ARG 382	E6AP

ARG 382	E6AP		
---------	------	--	--

DISCUSIÓN

Existen diferencias en la afinidad de unión de los fármacos probados contra las variantes seleccionadas de los VPH-HR (tipos 16 y 18), por lo que es plausible establecer un tratamiento personalizado de acuerdo con la infección específica por alguna de las variantes en circulación en México.

De acuerdo con los resultados obtenidos, Flumatinib es un fármaco de afinidad general para todas las variantes, ya que de acuerdo con el criterio establecido para la selección post acoplamiento (afinidad < -8 kcal/mol entre la proteína viral y el ligando), obtuvo valores óptimos en todos los casos (Tabla 6). Sin embargo, aunque es una buena opción de tratamiento para cualquiera de las seis variantes del VPH-16, las dos variantes Asiático-Americanas (AA-a y AA-c) también pueden ser tratadas con el antiviral Nelfinavir con la misma certeza. De hecho, solo AA-a tiene mayor afinidad con este segundo fármaco que con cualquier otro.

En el caso de las variantes del VPH-18, el antiinflamatorio Darapladib es la mejor opción de tratamiento contra todas las variantes del VPH-18, ya que tanto con “Af” como con “E”, obtuvo un puntaje de -9.4 kcal/mol (Tabla 7). Aunque Flumatinib también es una posible propuesta farmacológica, a diferencia de las pruebas contra las proteínas del VPH-16, con ninguna obtuvo la mejor energía de unión.

Particularidades para el tratamiento

La medicina personalizada tiene como propósito realizar y mejorar el diagnóstico de una enfermedad de acuerdo con sus características moleculares. Es decir, la eficacia de los fármacos no radica en que sean exclusivos para un paciente, sino de que se puedan clasificar de acuerdo con la susceptibilidad ante una enfermedad o variantes del agente causal (Díaz-Fernández & Rodríguez-Ferreiro, 2016). Diversos estudios *in silico* se han enfocado en proponer medicamentos y/o compuestos naturales contra la proteína E6 del VPH debido a su acción esencial para la transformación celular e inducción de tumores epiteliales (Vande-Pol & Klingelutz, 2013). Sin embargo, no se han considerado las variaciones naturales entre las

diferentes cepas del virus, ni el efecto de estas en su interacción con E6AP, incluso cuando se conoce que difieren entre ellas en su capacidad para establecer infecciones persistentes y en el desarrollo de la malignidad por sus características biológicas (Escobar-Escamilla *et al*, 2019; Pérez-Quintanilla *et al*, 2020). En nuestros resultados del acoplamiento proteína viral-fármaco, se probó la proteína E6 de referencia (estructura reportada en la base de datos) y los resultados indican que la variación impacta indudablemente en la capacidad de unión con los compuestos (Tabla 6). Probando así que existen sutiles diferencias entre las variantes de E6 circulantes en México.

La proteína E6 de VPH-16 de referencia obtuvo la mejor afinidad con el antirretroviral Nelfinavir y su puntaje coincide con el de las dos variantes Asiático-Americanas. Sin embargo, no es posible establecer un único tratamiento a partir de este resultado, ya que todas las variantes Europeas obtuvieron un puntaje superior con el antineoplásico Flumatinib. Si solo consideramos los resultados con E6 de referencia, ignoraríamos un tratamiento con este último fármaco porque se encuentra en tercera opción para esta proteína. Además, antes se consideraría a Nelfinavir (mejor afinidad), o bien, Indinavir (segunda opción). Cabe mencionar que sin considerar a E6 de referencia, ninguna variante tiene entre su segunda opción a Indinavir como posible tratamiento.

Chen *et al*, (2024) realizaron un estudio con moléculas colorantes, antivirales y fármacos reutilizados para tres proteínas virales, incluida E6 del VPH-16 pero sin considerar variables. Proponen el uso de ligandos de tinte mediante cuatro niveles de selección y comparan sus resultados contra fármacos ya conocidos. En su trabajo, Flumatinib obtuvo un alto valor de afinidad con E6 (<-9 kcal/mol). De alguna manera esto concuerda con nuestros resultados, ya que con dicho fármaco obtuvimos los valores más altos contra las variantes del VPH-16. Sin embargo, a diferencia con los valores que ellos reportan, la afinidad que aquí se obtuvo fue ligeramente menor (de -8.1 a -8.4); relacionamos esta disparidad con la variación natural de las proteínas que nosotros probamos y consideramos que no debe asumirse la misma eficiencia del fármaco con las demás variantes. Dentro de los medicamentos reutilizados ellos también probaron Darapladib y obtuvieron un valor de afinidad favorable con E6 (<-8 kcal/mol), lo que es completamente opuesto a nuestros resultados, ya que dicho fármaco ni siquiera tiene participación dentro de los cuatro mejores para el VPH-16, aunque es verdad que se posiciona como el mejor tratamiento para el VPH-

18. El Benzamilo por otro lado, es un antiviral que en su trabajo obtuvo resultados favorables en el acoplamiento con E6 (<-7 kcal/mol) y aunque el valor es similar con los que obtuvimos con cualquier variante, sea de VPH-16 o 18, en nuestro trabajo no se tomó en cuenta por el valor mínimo necesario establecido que nos permitiera proponer el mejor tratamiento. Cabe resaltar que los resultados de Chen *et al*, (2024) se reportan en kJ/mol y la comparativa se menciona a partir de una conversión de dichos valores a kcal/mol.

No es óptimo considerar solamente una proteína E6 estándar para realizar propuestas farmacológicas, ya que se ignora la capacidad infecciosa propia de cada variante y los sitios de interacción únicos que se forman con los ligandos. Otros autores han realizado trabajos del diseño tridimensional de las variantes del VPH-16, como Rodríguez-Ruiz *et al*, (2019) y concluyeron que no existen cambios significativos en las estructuras de las proteínas, lo que coincide con nuestros modelos, pero plantean una hipótesis que los cambios fisicoquímicos, así como el ligero desorden estructural que presentan, probablemente hace que difieran en su patrón de interacción. Nuestros resultados apoyan esta idea y reflejan que es posible establecer un tratamiento de forma personalizada a partir de esto. También, en los resultados se observa que los puntajes de las variantes según la línea filogenética a la que pertenecen son similares entre sí. Es decir, AA-a y AA-c tienen mayor similitud en su afinidad con los fármacos, así como las cuatro variantes Europeas entre sí. Esto propone que en la búsqueda por un tratamiento para una infección por VPH-16, el enfoque puede ir dirigido a los distintos orígenes filogenéticos a los que pertenece cada variante y no a la variante como tal.

Cabe aclarar que aunque los dos fármacos seleccionados para las variantes del VPH-16 (Flumatinib y Nelfinavir) tienen un mejor puntaje con las dos variantes del VPH-18 (lo que denota que la variación modifica la interacción), esto no quiere decir que el tratamiento sea generalizado para ambos tipos, lo que se explica por tres motivos importantes: 1) La afinidad de los fármacos con las variantes del VPH-16 se puede mejorar con las modificaciones propuestas, pero para las variantes del VPH-18 no se consigue mejora alguna; 2) Ni Flumatinib ni Nelfinavir (seleccionados de entrada para el tratamiento de VPH-16), son la primera propuesta de tratamiento contra las variantes del VPH-18, para ellas es Darapladib; 3) Darapladib no fue seleccionado dentro de todos los posibles fármacos para tratar alguna variante del VPH-16 por tener un valor de afinidad >-8 kcal/mol, lo que reafirma su exclusividad para el tratamiento de VPH-18.

Una característica importante con las variantes Af y E del VPH-18, es que independientemente de las modificaciones en su estructura y que pertenecen a linajes distintos, los resultados indican que pueden tener un mismo tratamiento entre ellas, sobre todo porque los puntajes en los acoplamientos de ambas fueron prácticamente iguales con todos los fármacos.

Desde una perspectiva estructural, el sitio de unión para un ligando en un complejo se denomina “bolsillo de unión al ligando”. Cuando un ligando grande interactúa, a menudo se ubica en “bolsillos” que suelen ser cóncavos para sujetar y envolver fuertemente la estructura afín (Gao & Skolnick, 2012). Esto explica en gran medida por qué en los acoplamientos realizados con todos los fármacos, a pesar de la variación existente entre las proteínas, no se modifica el sitio de interacción (Tabla 8-15). Sin embargo, cada tipo de VPH difiere en sus resultados de tratamiento y por ende, en el tipo de interacciones que se producen.

Las fuerzas en los complejos proteína-ligando se clasifican como no covalentes, las cuales pueden ser interacciones electrostáticas, fuerzas hidrofóbicas, interacciones π - π , puentes de hidrógeno etc., que son determinantes en la afinidad y especificidad. En un complejo proteína-ligando, un par de átomos se define como dos átomos que están separados por 4 Å o menos (Ferreira de Freitas & Schapira, 2017). Las fuerzas de van der Waals son interacciones débiles e hidrofóbicas, atractivas o repulsivas entre átomos o moléculas que surgen a partir de fluctuaciones temporales en la distribución de electrones, lo que lleva a la formación de dipolos instantáneos. Son la principal fuerza impulsora en la interacción fármaco receptor (Keil & Mayer, 2014). En cuanto a las interacciones π , son ricas en electrones y se forman en los orbitales de grupos aromáticos en sistemas proteicos y ácidos nucleicos; son característicos del reconocimiento molecular de fármacos que se unen a sitios activos o alostéricos. Aunque son más débiles que los enlaces de hidrógeno, se consideran un tipo de enlace “cooperativo” en la organización y señalización celular (Carter-Fenk *et al*, 2023). En particular, las interacciones de apilamiento π , son un tipo de fuerza que se ve afectada por condiciones ambientales como el pH, por lo que se ha utilizado para diseñar sistemas de administración de fármacos que son sensibles al entorno (Zhuang *et al*, 2019). Finalmente, los puentes de hidrógeno son la contribución predominante a la especificidad del reconocimiento molecular. Según la definición dada por la Unión Internacional de Química

Pura y Aplicada (IUPAC), son interacciones atractivas entre un átomo de hidrógeno de una molécula X-H, donde X es más electronegativo que H, y un átomo o grupo de átomos en la misma molécula o en una diferente, en el que hay evidencia de formación de enlaces (Arunan *et al*, 2011).

Flumatinib es la propuesta general para todas las variantes del VPH-16 y es el fármaco con mayor número de interacciones con la proteína viral. En todos los complejos, el tipo de fuerzas intermoleculares que se promueven son principalmente de van der Waals (de carácter hidrofóbico), π - π Stacked (de apilamiento π), π -Alquilo y enlaces carbono-hidrógeno.

Afinidad diferencial

Las variantes intratipo VPH-16 y 18 se asocian con una mayor carga de cáncer a nivel mundial, lo que influye en los resultados clínicos de la infección. El VPH-18 presenta una actividad controversial en cuanto al riesgo de CaCu, ya que algunos estudios respaldan esta asociación mientras que otros la refutan (Muñoz-Bello *et al*, 2022). Chen *et al*, (2015) incluso mencionan que los sublinajes de estas variantes no pueden discriminar el riesgo de cáncer y que los cambios en los aminoácidos de E6 no son críticos para la unión del zinc.

Al comparar la afinidad entre VPH-18 y VPH-16 se deduce que el tratamiento específico para cada cepa de alto riesgo, debe considerarse y es necesario. Los resultados muestran que incluso probando exactamente los mismos fármacos con ambos tipos virales (independientemente de la variante), la interacción con VPH-18 es más fuerte al tener mayor afinidad. Es decir, los medicamentos posiblemente inhiben con mayor éxito las variantes del VPH-18, relacionado con su menor prevalencia en cáncer. Esto también indica que VPH-16 resulta más difícil de tratar, además de respaldar la observación sobre su prevalencia en los casos de CaCu.

Las dos proteínas E6 del VPH-18 seleccionadas mantienen una similitud en cuanto a los resultados del acoplamiento con los fármacos. Es decir, no hay una diferencia en la afinidad a pesar de las mutaciones en su secuencia. Aunque no se ha definido si estas variantes pueden determinar o no el nivel de agresividad y la progresión al cáncer a un nivel de linaje, en México el VPH-18 ha sido reportado como uno de los tipos más prevalentes en muestras de Cáncer Cérvico Uterino después del VPH-16 (Salcedo *et al*, 2014). Se ha

propuesto que la disparidad en la presencia de estas variantes se debe a que las células transformadas no soportan la inestabilidad genómica propia de la expresión del VPH-18, lo que resulta en un daño celular extremo, una baja tasa de replicación y por ende una baja presencia del virus en la población (Salcedo *et al*, 2014). Esto puede ser consistente con nuestros resultados, ya que tanto Af como E mantienen una similitud en su interacción, lo que posiblemente se deba a que los cambios masivos en sus secuencias generan variantes menos aptas que no se ven en circulación. Del mismo modo, algunas variantes del VPH-18 pueden ser más deficientes en su competencia contra otras más agresivas, aunque esto sigue sin ser claro. Chen *et al*, (2015) realizaron un estudio filogenético con base en la variación de los sublinajes del VPH-18 donde mencionaron que las únicas variantes que posiblemente presentan una mayor agresividad y relación con la carcinogénesis son el linaje A3/A4 (Europeas “E”). Sin embargo, nuevamente el cambio de algunos residuos relacionados a una recurrencia tumoral, resultan no ser críticos.

Nuestros resultados aparentemente coinciden con otros estudios en cuanto a que no se discrimina el riesgo a cáncer al interior de las variantes del VPH-18. Y en este caso, tampoco en su tratamiento, lo que a su vez aporta a la hipótesis de que no existe un tropismo glandular específico de algún linaje en estas variantes que diferencie su presencia en adenocarcinomas (ADC) y carcinoma de células escamosas (CCE) como se llega a proponer (Chen *et al*, 2015; Muñoz-Bello *et al*, 2022).

Interacciones polares y no polares entre fármacos y E6

Los valores de acoplamiento con Flumatinib-E6 VPH-16 fueron los mejores, por lo que se esperaba que predominaran enlaces de hidrógeno, sobre todo porque estos son muy abundantes en los sistemas biológicos y desempeñan un papel clave en la afinidad y selectividad de las uniones proteína-ligando (Madushanka *et al*, 2023) Sin embargo, con ninguna variante del VPH-16 se presentaron este tipo de interacciones tan fuertes a pesar de ser el fármaco mejor evaluado. En algunos trabajos de acoplamiento molecular como el de Ebuka-Arthur & Uzairu, (2019), probaron compuestos anticancerígenos inhibidores de PI3Ks y obtuvieron interacciones similares. Ellos mencionan que las interacciones van der Waals crean un fuerte entorno cohesivo y junto a las interacciones π , contribuyen a estabilizar las estructuras de unión y los complejos.

En todas las interacciones fármaco-E6 reportadas, se observan uniones No favorables, las cuales están relacionadas en la interacción con moléculas de agua y su papel en la termodinámica de unión al ligando, ya que incluso su desplazamiento del sitio de unión es relevante en la relación estructura-cavidad (Pantsar & Poso, 2018).

La libertad que tienen las moléculas de agua para posicionarse, rotar y formar todos los enlaces de hidrógeno posibles en el acoplamiento es restringida; aquellas que pierden esta capacidad al posicionarse en el sitio de unión, presentan “penalización entrópica” y “penalización entálpica”. Desplazar estas moléculas del sitio de unión con el ligando mejora la ganancia en la afinidad de enlace al eliminar las “penalizaciones” dando lugar a una unión más favorable (Pantsar & Poso, 2018). Las variantes VPH-16 Europeas E-A176/G350, E-C188/G350 y G-131 son las únicas que forman este tipo de uniones con Flumatinib, lo que indica que aunque la afinidad es la mejor, probablemente la entropía y la entalpía se ven afectadas en el sistema. En los tres casos, el residuo intermediario para este tipo de enlaces es la arginina, aminoácido “orientacionalmente anfipático”, lo que significa que su comportamiento cambia según la parte en su estructura que queda expuesta al entorno (Munishwar & Vladimir, 2023). Por lo tanto, en interfaces como el “bolsillo de unión” de un fármaco, donde el agua es excluida, la arginina puede apilar sus caras planas contra anillos aromáticos (parches hidrofóbicos) que actúan como un residuo no polar (Hong *et al*, 2022).

En contraste con esto, las variantes del VPH-18 no forman interacciones de tipo No favorables con Flumatinib. Por el contrario, ambas forman dos enlaces de hidrógeno, lo que probablemente aumenta la afinidad de unión al estabilizar el complejo y direccionar el correcto plegamiento y estructura de las proteínas (Hubbard & Kamran-Haider, 2010; López-Sánchez, 2024). Los aminoácidos que forman estos enlaces nuevamente son argininas, tanto en Af como en E, en las posiciones idénticas entre ambas variantes 76 y 104 y 75 y 103, respectivamente. Otras uniones son similares con las variantes del VPH-16, como las interacciones π y las hidrofóbicas, aunque enlaces C-H tampoco se presentan. De forma general, las variantes del VPH-18 generan un menor número de interacciones, pero el valor de afinidad supera al de las otras seis variantes, conservando aparentemente la relación filogenética para VPH-18, mencionada por Chen *et al*, (2015) al mantener los mismos residuos interactuantes, aun cuando no sean críticos para la recurrencia tumoral y solo constituyan un arrastre filogenético.

Nelfinavir también es un posible tratamiento, pero solo para las variantes AA del VPH-16, ambas con un valor de afinidad de -8.4 kcal/mol. Forman una gran cantidad de fuerzas de van der Waals, entre uno y dos enlaces de hidrógeno y tres interacciones π -Alquilo. A diferencia del acoplamiento con Flumatinib, hay menor variedad en el tipo de fuerzas que se forman, pero estas tres son suficientes para alcanzar una afinidad similar, por la ausencia de agua. Al respecto, Pantsar & Poso (2018) mencionan que existen áreas denominadas “regiones secas” o “regiones deshidratadas”, que son tan desfavorables energéticamente para que el agua las ocupe, que simplemente no hay moléculas de este tipo presentes. Por tanto, si un ligando ocupa estas regiones, hay una ganancia en la afinidad de enlace porque hay interacciones van der Waals más fuertes. Los residuos implicados en ambas proteínas son VAL, LEU y TYR, aunque todos en posiciones diferentes. La valina y la leucina son altamente hidrofóbicas debido a sus cadenas laterales alifáticas de carbono, mientras que la tirosina, aunque menos hidrofóbica que las otras dos, también presenta un carácter hidrofóbico debido a su grupo fenil en su cadena lateral, de tal manera que son perfectos para establecer esas regiones secas donde el fármaco puede interactuar mejor (Némethy, 1967; Sun, 2022).

Por otro lado, aunque la afinidad de ambas variantes de VPH-18 con Darapladib es idéntica, el tipo de interacciones y número es diferente. Ambas son abundantes en fuerzas van der Waals, aunque Af forma 14 de ellas mientras que E solo forma la mitad, lo que indica una mejor inhibición para la primera variante. Por otro lado, con E se presentan cuatro enlaces de hidrógeno, tres de ellos en residuos de ARG, menos hidrofóbica y uno en PHE, residuo muy polar, lo que explicaría la presencia de moléculas de agua y la consecuente pérdida de enlaces, así que el tratamiento se ve influenciado por la solubilidad y el ambiente molecular. Af solo forma dos enlaces de hidrógeno, pero coincide en el tipo de aminoácidos, uno en ARG y otro en PHE (aunque en posiciones diferentes), en este caso particular la posición sería la responsable de exponer o no a la arginina ante las moléculas de agua, generando más variación en la respuesta farmacológica. La variante E también forma más enlaces Pi-Stacked que Af, que son un tipo de unión no covalente y débil, pero que aquellos fármacos basados en este tipo de interacciones (poseen anillos aromáticos) equilibran la hidrofiliidad y lipofiliidad para la absorción y distribución de estos en el organismo (Zhuang *et al*, 2019).

Interacción proteína viral-proteína blanco

Las proteínas E6 tienen una longitud aproximada de 150 aminoácidos y se describen como una estructura en forma de “mancuerna” con extremos N- y C- terminales con un dedo de Zn cada una. Se ha reportado que estos extremos son flexibles entre sí, pero al unirse al péptido LXXLL de E6AP, se estabilizan por la denominada “triada de leucina”. A pesar de que esta interacción está ampliamente estudiada y es indispensable para que E6AP adquiriera una conformación que interactúe con p53, Wang *et al*, (2024) proponen interacciones alternativas al péptido LXXLL. En su trabajo mencionan la formación de una extensa interfaz entre ambas proteínas debido al dinamismo del propio complejo. Además, ellos plantean que el fracaso en el descubrimiento de fármacos dirigidos a esta interfaz se debe a que no se considera o se sabe poco acerca de las interacciones que van más allá del péptido, el cual solo representa el 1.4% de toda la secuencia de aminoácidos de E6AP. Nuestros resultados concuerdan con la amplitud de la interfaz, la cual es variable dependiendo de la variante evaluada. Adicionalmente a esto, se conoce que las variantes E6 del VPH presentan diferentes patrones de agresividad tumoral al comparar sus perfiles de expresión genética, y que como muestran nuestros resultados, mantiene una mayor superficie de contacto. Zacapala-Gomez *et al*, (2016) proporcionan evidencia de que estos patrones de agresividad son diferentes entre las cinco variantes de E6.

También se ha demostrado que los cambios de aminoácidos confieren a la proteína viral una mayor eficiencia en la degradación de p53 y su unión a E6AP. Nuestros acoplamientos proteína-proteína muestran que las variantes AA del VPH-16 tienen una mayor interfaz de interacción que las Europeas, lo que posiblemente se relaciona con el riesgo a desarrollar CaCu. Ortiz-Ortíz *et al*, (2015) realizaron un estudio en mujeres del sur de México para clasificar filogenéticamente las variantes en su asociación con lesiones precursoras. De las cuatro variantes que estudiaron (todas incluidas en este trabajo por ser las más prevalentes en el país), AA-a mostró la mayor asociación con el desarrollo de carcinoma Cérvicouterino y AA-c se posicionó en tercer lugar. Aunque en este mismo estudio se menciona que E-A176/G350 también se relaciona fuertemente con la progresión al cáncer. Zacapala-Gomez *et al*, (2016) también reportaron que la proteína E6 de AA-c modula la expresión de más genes del hospedero que cualquier otra. Es decir, se apoya el planteamiento

de que las oncoproteínas de las variantes Asiático-Americanas constituyen un riesgo oncogénico mayor en México.

Los residuos en los que se centró el análisis fueron aquellos que forman puentes de hidrógeno, ya que son esenciales para la formación de interfaces proteicas y sitios de unión de ligandos (Gao & Skolnick, 2012). ARG, TYR y CYS son los aminoácidos que se conservan en todas las proteínas E6 que interactúan por medio de estos enlaces, mientras que GLU, ALA y LEU son los involucrados de E6AP con todas las variantes del VPH-16. Sin embargo, algunos estudios señalan la importancia del cambio de aminoácido L83V en el extremo carboxilo terminal en las variantes de E6, en comparación con la proteína prototipo, ya que le confiere una mayor eficiencia en la degradación de E6 (Zacapala-Gómez *et al*, 2016). Otros estudios mencionan que E6 forma enlaces de hidrógeno en los residuos HIS 31 y ASP 32 con el extremo C-terminal de E6AP, fuera del bolsillo que hemos mencionado (Wang *et al*, 2024). Wang *et al*, (2024) dividieron en tres la interfaz de interacción entre ambas proteínas y obtuvieron que los residuos de LEU del péptido de E6AP interactúan con una variedad de aminoácidos dentro del surco hidrofóbico de la proteína viral que incluye TYR 39, PHE 52, LEU 57, VAL 60, VAL 69, LEU 74, TYR 77, SER 78, SER 81, ARG 109 y ARG 138. En contraste con esto, nuestros acoplamientos dieron como resultado que las LEU del péptido en las posiciones 374 y 377 que interactúan mediante puentes de hidrógeno en todas las variantes, se enlazan con los residuos CYS 50 y TYR 31 de E6AP. Como se observa, diversas propuestas van dirigidas a identificar grupos importantes en la interacción proteína-proteína que sean susceptibles de inhibición, pero no se han considerado específicamente aquellos que se enlazan mediante puentes de hidrógeno y que median la unión con el péptido LXXLL y otras regiones, lo cual es una aportación importante de nuestra aproximación.

Nuestros resultados muestran que las interacciones ARG 54 - GLU 376, TYR 31- ALA 370, CYS 50 - LEU 377, ARG 54 - THR 373 y TYR 31- LEU 374 se mantienen en todas las variantes del VPH-16, por lo que son un blanco de inhibición para el reconocimiento proteína-proteína, sobre todo porque estas interacciones se basan principalmente en la coincidencia de las zonas hidrófobas y la complementariedad entre los grupos de puentes de hidrógeno (Hubbard & Kamran-Haider, 2010), tal como señalamos nosotros.

Para las proteínas del VPH-18, encontramos que estas no interactúan completamente con el péptido LXXLL de E6AP como se reporta, y varía en cuanto a los tipos de enlaces con los que interactúa fuera de esta zona. Por lo tanto, aun cuando LXXLL converge con E6, la interacción no es lo suficientemente fuerte con algunos residuos. En relación con esto, Thomas *et al*, (2013) analizan la interacción E6-E6AP y mencionan que durante la unión, E6AP mejora la estabilidad de E6, tanto del tipo alfa como beta de alto riesgo, aunque los primeros (VPH-16) tienen a una degradación acelerada de E6AP en comparación con la beta (VPH-18) *in vitro*. Estos grados probablemente también se relacionan con la mayor patogenicidad de VPH-16 y con la menor divergencia de las variables de VPH-18, al no necesitar una zona variable para interactuar.

Propuestas de modificación farmacológica como un aporte a la medicina personalizada

La configuración tridimensional de una sustancia bioactiva es importante sobre su efecto farmacológico (Zhuang *et al*, 2019). Además, la diversidad en los resultados de los acoplamientos, tanto proteína viral-fármaco como proteína viral-proteína blanco, son consistentes con la información que se conoce acerca de la divergencia en el nivel de agresividad de las variantes, así como en la desregulación en la diferenciación y apoptosis de los queratinocitos, implicados en el CaCu (Antaño-Arias *et al*, 2021; Zhebe *et al*, 2009; Bueno-Freitas *et al*, 2014). Esta variación, en cuanto a la agresividad de las variantes; debe considerarse en el diseño de fármacos, para favorecer su hidrofobicidad con el fin de que el acoplamiento mejore, sobre todo porque las variantes más agresivas, específicamente de VPH-16, podrían requerir afinidad superior.

Al igual que en este trabajo, hay estudios dirigidos a proponer nuevos inhibidores a partir de estructuras preexistentes con un enfoque bioinformático inicial. Soumia *et al*, (2022) identificaron moléculas de diversas sustancias químicas que pueden servir como base para nuevas familias de fármacos o inhibidores de E6 del VPH. En nuestro estudio proponemos que a partir de fármacos base, como las ya mencionadas modificaciones de Nelfinavir y Flumatinib, se desarrolle un tratamiento específico y más eficiente para cada variante de los VPH de alto riesgo, lo que es posible y se demuestra con la afinidad diferencial obtenida. Ambas modificaciones aumentan la afinidad con las proteínas del VPH-16, lo que es un

indicador directamente proporcional a la potencia de un fármaco (Madushanka *et al*, 2023). Del mismo modo, en comparación con las estructuras originales, las interacciones por enlaces de hidrógeno aumentan. La formación de estos enlaces fue nuestro principal enfoque, ya que generan interacciones extensas que organizan y preparan los sitios de unión, lo que permite mantener la estabilidad estructural y funcionalidad con un alto nivel de conectividad.

Los enlaces de hidrógeno dependen de pares de átomos aceptores/donadores, así como de grupos de átomos que forman extensas subunidades donantes yceptoras (Saenger, 1994). Respecto a esto, Madushanka *et al*, (2023) mencionan que la glicina (GLY) es el residuo de aminoácido más abundante en los perfiles de donador y aceptor debido a una serie de características que presenta, como: es esencial en las α -hélices (al igual que la hendidura hidrofóbica de E6), debido a su pequeño tamaño tiene mayor compacidad (empaquetamiento eficiente en la cadena) y contribuye a que otros grupos sean más accesibles a la interacción con agua y moléculas ligando. A resaltar, todas las variantes del VPH-16 en acoplamiento con el modificado de Flumatinib presentan al menos un enlace de hidrógeno mediado por este residuo (GLY 137, Tabla 29). Sorprendentemente, cuatro de las cinco variantes no solo coinciden en el tipo de aminoácido, sino que la posición se conserva al interactuar.

Los enlaces de hidrógeno, más allá de que potencian este tipo de interacciones intermoleculares, también tienen un papel importante a nivel intramolecular para el diseño de fármacos. Madushanka *et al*, (2023) explican que cuando un donador de enlaces de hidrógeno y un aceptor están próximos en una misma molécula, se forma un “enlace de hidrógeno intramolecular” con un sistema en equilibrio termodinámico. Dicho equilibrio se da entre conformaciones cerradas, que crean un sistema de anillo temporal (hidrofóbicas) y entre conformaciones abiertas, donde los grupos polares quedan expuestos al disolvente (hidrofilicas). Ambas adquieren propiedades fisicoquímicas distintivas que son cruciales para la orientación favorable de una molécula pequeña en el sitio de unión a una proteína. En resumen, los andamios orgánicos (estructuras fundamentales) pueden tener diferentes grupos (O-H, N-H y C=O) que los vuelven solubles, si se ubican en las zonas hidrofílicas, y facilitan la formación de interacciones específicas con dianas biológicas.

En la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares, una conformación cerrada tiende a ser más lipofílica con mayor permeabilidad de membrana, mientras que la conformación abierta es soluble en agua con menor permeabilidad de membrana y que a su

vez permite restricciones conformacionales en las que grupos funcionales del ligando se alinean favorablemente al sitio de unión. Madushanka *et al*, (2023) presentan su hallazgo del diseño de fármacos basados en la bioestructura como el futuro de la industria farmacéutica. Mencionan que la eliminación de grupos funcionales relevantes dentro del sistema de “anillo intramolecular” hidrofóbicos en un ligando puede conducir a una pérdida significativa en la potencia. Inversamente a esto, a las estructuras farmacológicas que seleccionamos, les fueron añadidos grupos funcionales que promovieron la fuerza proteína-ligando mediante estos enlaces en la superficie hidrofílica.

Importancia de un análisis proteína viral-fármaco-proteína blanco

Modelar el trímero vírico-celular-farmacológico, presenta una visión completa del posible bloqueo, por el fármaco modificado o nativo, de la interacción entre la proteína viral E6 y la proteína blanco E6AP. Gao & Skolnick *et al*, (2012) mencionan que las interacciones proteína-fármaco pueden producir uniones inespecíficas, por lo que en algunos casos se requieren “interacciones cooperativas” proteína-proteína que mejoren la estabilidad del complejo y que permitan conocer otras interacciones funcionales biológicamente relevantes.

Considerando estas posibles inespecificidades moleculares como limitantes de nuestro trabajo, además de la falta de movilidad propia del acoplamiento molecular, es importante mencionar que reconocemos la dinámica natural de todo sistema y la flexibilidad de las proteínas. Por ello, el “ajuste” de las tres estructuras se realizó por alineación de secuencias e identificación de cadenas con mejor coincidencia; a manera de prevenir la inespecificidad y atacar las limitaciones del modelado “rígido” entre las estructuras del fármaco y E6.

Los resultados obtenidos para el trímero son confiables, ya que la herramienta empleada “MatchMaker” dentro del software Quimera, realiza la superposición basada en puntuaciones de alineación; dicho emparejamiento incluye información de la estructura secundaria de las proteínas, la similitud entre los residuos y algunas penalizaciones de carácter termodinámico mencionadas anteriormente (entropía y entalpía) (Meng *et al*, 2006). De este modo, nos aseguramos que la presencia del ligando ocupa un espacio entre ambas proteínas y que dicho blanco, mediado por diversos enlaces de hidrógeno, mejora potencialmente la afinidad de unión global. Aunado a esto, He *et al*, (2023) identificaron

compuestos moleculares pequeños con potencial de inhibición carcinogénica de E6; en su trabajo, además de utilizar métodos de acoplamiento molecular, midieron la capacidad inhibidora de estos en la proliferación celular con células SiHa, así como la expresión de p53. Ellos incluyeron dosis y concentraciones en que los compuestos tienen una actividad eficiente para dicho bloqueo; esto nos da certeza que los resultados obtenidos por docking molecular son confiables para estimar candidatos al tratamiento, aunque ello requiera un estudio *in vitro* posterior para analizar el incremento en la expresión de p53 o en su caso la inhibición de proliferación viral en cultivos celulares. Cabe resaltar, que aunque He *et al*, (2023) proponen moléculas de alta afinidad con valores similares a los obtenidos en este trabajo, tanto con Darapladib para el VPH-18 como con los modificados de Nelfinavir y Flumatinib para las variantes del VPH-16, nuevamente se destaca la importancia de generar tratamientos específicos para cada variante, lo que He *et al*, no aborda.

En resumen, en todos los trómeros se demuestra que las estructuras de los compuestos modificados abarcan una mayor superficie que ocluye la interacción E6-E6AP. Del mismo modo, el análisis en 2D sugiere que más residuos interactúan con los fármacos modificados que con los originales.

CONCLUSIONES

La medicina de precisión o personalizada usa la información genética de cada paciente para brindar medicamentos o terapias más efectivos. Los resultados de este trabajo demuestran que realizar pruebas moleculares para identificar mutaciones o variantes específicas en circulación de los VPH de alto riesgo, tipos 16 y 18, es plausible e importante para interrumpir la expresión de E6 en mujeres infectadas y evitar una progresión al cáncer, e incluso en casos de etapas tardías, reducir el tamaño del tumor y prolongar la supervivencia de las pacientes.

Si bien todas las variantes de E6 tienen la capacidad de unirse a E6AP por medio del péptido LXXLL, la afinidad diferencial de las oncoproteínas con los fármacos indica que posiblemente se expresan a un nivel de malignidad distinto, el cual está dado por las interacciones propias de cada una y puede llevarlas a diferentes riesgos de desarrollar CaCu. El fármaco Flumatinib puede funcionar como un tratamiento general para todas las variantes, especialmente con las del VPH-16 porque obtuvo afinidad superior. Sin embargo, solo las

dos variantes Asiático-Americanas (AA) pueden ser tratadas con el fármaco Nelfinavir con la misma certeza, ya que los valores obtenidos son similares que con Flumatinib. Los puntajes del acoplamiento son parecidos dependiendo de la rama, es decir, al interior de los grupos; esto puede ser clave para buscar tratamientos que se enfoquen en los distintos orígenes filogenéticos a los que pertenecen y no a las variantes per se.

Las variantes del VPH-18 no mostraron diferencias para considerar un tratamiento en específico. Sin embargo, aunque sería posible tratar a ambas con Flumatinib, el mejor fármaco, exclusivo para ellas, es Darapladib, el cual no es candidato para ninguna variante del VPH-16.

Finalmente, de modo que la afinidad diferencial es relevante para el diseño de nuevas terapias, la modificación estructural de dos fármacos que ya se encuentran en circulación (Flumatinib y Nelfinavir) potencian la afinidad con algunas variantes del VPH-16. El modificado de Flumatinib es una propuesta para todas las variantes, excepto para E-G131, ya que es la única que puede ser tratada con el modificado de Nelfinavir. No obstante las modificaciones farmacológicas no mejoran la afinidad con las variantes de VPH-18.

REFERENCIAS

- Abdulhameed-Odhar, H., Fadhil-Hashim, A. & Sami-Humad, S. (2022). Molecular docking analysis and dynamics simulation of salbutamol with the monoamine oxidase B (MAO-B) enzyme. *Bioinformation*, 18 (3), 304-309. DOI: [10.6026/97320630018304](https://doi.org/10.6026/97320630018304)
- Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC). (2007). Virus del papiloma humano. Monografías del IARC sobre la evaluación de los riesgos carcinógenos para los seres humanos, 90 (1). *International Agency for Research on Cancer*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK321770/>
- Agnihotry, S., Kumar-Pathak, H., Bukhsh-Singh, D. B., Tiwari, A. & Hussain, I. (2022). Chapter 11 - Protein structure prediction. En D. Bukhsh Sighn & R. Kumar Pathak (Eds), *Bioinformatics, Academic Press*. 177-188. Academic Press.
- Antaño-Arias, R., Del Moral-Hernández, O., Ortiz-Ortiz, J., Alarcón-Romero, L.D.C., Navor-Hernández, J. A., Leyva-Vázquez, M. A., Jiménez-López, M. A., Organista-Nava, J., Illades-Aguir, B. (2021). E6/E7 Variants of Human Papillomavirus 16

- Associated with Cervical Carcinoma in Women in Southern Mexico. *Pathogens*, 10, 773. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060773>
- Araujo-Arcos, L. E., Montaña, S., Bello-Ríos, C., Garibay-Cerdenares, O. L., Leyva-Vázquez, M. A. & Illades-Aguilar, B. (2022). *Science Reports*, 12 (1898)
- Arunan, E., Desiraju, G. R., Klein, R. A., Sadlej, J., Scheiner, S., Alkorta, I., Clary, D. C., Crabtree, R. H., Dannenberg, J. J., Hobza, P., Kjaergaard, H. G., Legon, A. C., Mennucci, B. & Nesbitt, D. J. (2011). Defining the hydrogen bond: An account (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, vol. 83 (8), 1619-1636. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-10-01-01>
- Ballón-Paucara, W. G. & Grados-Torrez, R. E. (2019). Acoplamiento molecular: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Revista Con-Ciencia*, 7 (2), 55-72. http://www.scielo.org.bo/pdf/rcfb/v7n2/v7n2_a06.pdf
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28: 235-242 <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
- Berumen, J., Ordoñez, R. M., Lazcano, E., Salmerón, J., Galván, S. C., Estrada, R. A., Yunes, E., García-Carranca, A., González-Lira, G., Madrigal-de la Campa, A. (2001). Asian-American Variants of Human Papillomavirus 16 and Risk for Cervical Cancer: a Case–Control Study. *Journal of the National Cancer Institute*, 93 (17), 1325–1330. <https://doi.org/10.1093/jnci/93.17.1325>
- Borden, K. L. B. & Culjkovic-Kraljacic, B. (2010). Ribavirin as an anti-cancer therapy: acute myeloid leukemia and beyond?. *Leukemia & Lymphoma*, 51(10). <https://doi.org/10.3109/10428194.2010.496506>
- Bueno-Freitas, L., Chen, Z., Freire-Muqui, E., Tostato-Boldrini, N. A., Espinosa-Miranda, A., Cruz-Spano, L. & Burk, R. D. (2014). Human Papillomavirus 16 Non-European variants are preferentially associated with high-grade cervical lesions. *PLOSOne*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100746>
- Burk, R. D., Harari, A., Chen, Z. (2013). Human papillomavirus genome variants. *Virology*, 445 (1–2), 232-243. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.018>

- Carter-Fenk, K., Liu, M., Pujal, L., Loipersberger, M., Tsanai, M., Vernon, R. M., Forman-Kay, J. D., Head-Gordon, M., Heidar-Zadeh, F., Head-Gordon, T. (2023). The Energetic Origins of Pi–Pi Contacts in Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 145 (45). DOI: [10.1021/jacs.3c09198](https://doi.org/10.1021/jacs.3c09198)
- Chen, A. A., Gheit, T., Franceschi, S., Tommasino, M., Clifford, G. M. (2015). Human Papillomavirus 18 Genetic Variation and Cervical Cancer Risk Worldwide. *Journal of Virology* 89 (20). <https://doi.org/10.1128/jvi.01747-15>
- Chen, Y. M., Ching, T., Wang, C. W., Wolfgang & Fischer, W. B. (2024). Repurposing dye ligands as antivirals via a docking approach on viral membrane and globular proteins – SARS-CoV-2 and HPV-16. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1866 (1). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2023.184220>.
- Cherry, J. J., Rietz, A., Malinkevich, A., Liu, Y., Xie, M., Bartolowits, M., Davisson, V. Jo., Baleja, J. D. & Androphy, E. J. (2013). Structure Based Identification and Characterization of Flavonoids That Disrupt Human Papillomavirus-16 E6 Function. *PLoS ONE*, 8 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084506>
- Clifford, GM. Tenet, V., Georges, D., Alemany, L., Pavón, MA., Chen, Z. M., Yeager, M. C., Boland, J. F., Bass, S. Steinberg, M., Raine-Bennett, T., Lorey, T., Wentzensen, N., Walker, J., Zuna, R., Schiffman, M. & Mirabello, L. (2019). Human papillomavirus 16 sub-lineage dispersal and cervical cancer risk worldwide: Whole viral genome sequences from 7116 HPV16-positive women. *Papillomavirus Research*, 7, 67-74. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2019.02.001>
- Cornet, I., Gheit, T., Franceschi, S., Vignat, J., Burk, R. D., Sylla, B. S., Tommasino, M., Clifford, G. M. (2012). Human Papillomavirus Type 16 Genetic Variants: Phylogeny and Classification Based on E6 and LCR. *Journal of Virology*, 86. <https://doi.org/10.1128/jvi.00483-12>
- Díaz-Fernández, U. & Rodríguez-Ferreiro, A. O. (2016). Biotechnology uses in the development of personalized medicine. *MediSan*, 20(05), 678-687. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=65685>
- Duncan, K. J., Eckert, K. A. & Clawson, G. A. (2009). Mechanisms of growth inhibition in human papillomavirus positive and negative cervical cancer cells by the chloromethyl ketone protease inhibitor, succinyl-alanine-alanine-proline-

- phenylalanine chloromethyl ketone. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.*, 330 (1), 359-66. DOI:[10.1124/jpet.108.149765](https://doi.org/10.1124/jpet.108.149765).
- Ebuka-Arthur, D. & Uzairu, A. (2019). Molecular docking studies on the interaction of NCI anticancer analogues with human Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit. *Journal of King Saud University - Science*, 31 (4), 1151-1166. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.01.011>
- Escobar-Escamilla, N., González-Martínez, B. E., Araiza-Rodríguez, A., Fragoso-Fonseca, D. E., Pedroza-Torres, A., Landa-Flores, M. G., Garcés-Ayala, F., Mendieta-Condado, E., Díaz-Quíñonez, J. A., Castro-Escarpulli, G. & Ramírez-González, J. E. (2019). Mutational landscape and intra-host diversity of human papillomavirus type 16 long control region and E6 variants in cervical samples. *Archives of Virology.*, 164, 2953–2961. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04407-6>
- Faheem, A., Young, J. Y., Anupama, S., Young, W. K., Jeong, B. K. & Kyung, H. C. (2023). Network-based drug repurposing for HPV-associated cervical cancer. *Computational and Structural Biotechnology Journal* (21), 5186-5200, <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.10.038>
- Ferreira de Freitas, R. & Schapira, M. (2017). A systematic analysis of atomic protein–ligand interactions in the PDB. *MedChemComm*, 8 (10), 1970-1981. DOI: <https://doi.org/10.1039/C7MD00381A>
- Focaccetti, C., Bruno, A., Magnani, E., Bartolini, D., Principi, E., Dallaglio, K., Bucci, O. E., Finzi, G., Sessa, F., Noonan, M. D. & Albin, A. (2015). Effects of 5-Fluorouracil on Morphology, Cell Cycle, Proliferation, Apoptosis, Autophagy and ROS Production in Endothelial Cells and Cardiomyocytes. *PLoS ONE*, 10 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115686>
- Fragoso-Ontiveros, V., Alvarez-García, R. M., Contreras-Paredes, A., Vaca-Paniagua, F., Herrera, L. A., López-Camarillo, C., Jacobo-Herrera, N., Lizano-Soberón, M. & Pérez-Plasencia, C. (2012). Gene expression profiles induced by E6 from non-European HPV18 variants reveals a differential activation on cellular processes driving to carcinogenesis, *Virology*, 432 (1), 81-90. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.05.029>.

- Gao, M. & Skolnick, J. (2012). The distribution of ligand-binding pockets around protein-protein interfaces suggests a general mechanism for pocket formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (10), 3784-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117768109>
- Gaspari, R., Prota, A. E., Bargsten, K., Cavalli, A. & Steinmetz, M. O. (2017). Structural Basis of cis- and trans-Combretastatin Binding to Tubulin. *Chem*, 2 (1), 102-113. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2016.12.005>.
- Glaunsinger, B. A., Lee, S. S., Thomas, M., Banks, L. & Javier, R. (2000). Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. *Oncogene*, 19 (46), 5270-5280. DOI: 10.1038/sj.onc.1203906.
- González-Losa, MdR., Rosado-Lopez, I., Valdez-González, N. & Puerto-Solís, M. (2004). High prevalence of human papillomavirus type 58 in Mexican colposcopy patients. *Journal of Clinical Virology*, 29 (3), 203-206. [https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(03\)00138-0](https://doi.org/10.1016/S1386-6532(03)00138-0).
- Gorshkov, K., Ni, S., Sun, W., Lu, B., Huang, W., Travers, T., Klumpp-Thomas, C., Michael, G. S., Xu, T., Huang, R., Lee, M. E., Cheng, X. & Zheng, W. (2019). Quantitative Chemotherapeutic Profiling of Gynecologic Cancer Cell Lines Using Approved Drugs and Bioactive Compounds. *Translational Oncology*, 12 (3), 441-452. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.11.016>.
- Hajji, H., Alaqarbeh, M., Lakhlifi, T., Aziz-Ajana, M., Alsakhen, N. & Bouachrine, M. (2022). Computational approach investigation bioactive molecules from Saussurea Costus plant as SARS-CoV-2 main protease inhibitors using reverse docking, molecular dynamics simulation, and pharmacokinetic ADMET parameters. *Computers in Biology and Medicine*, 150. <https://doi.org/10.1016/j.compbimed.2022.106209>
- He, J., Li, Q., Liu, Y., Li, T., Cheng, C., Li, N., Cui, Y., Shi, Y., Liu, Y., Wei, X., Ding, X. (2023). Screening of small molecular compounds with carcinogenic inhibition function of HPV-16 E6. *Arabian Journal of Chemistry*, 16 (8). <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.104759>.

- Hennequin, C., Giocanti, N. & Favaudon, V. (1995). S-phase specificity of cell killing by docetaxel (Taxotere) in synchronised HeLa cells. *British Journal of Cancer*, 71, 1194–1198. <https://doi.org/10.1038/bjc.1995.232>
- Ho, L., Chan, S. Y., Burk, R. D., Das, B. C., Fujinaga, K., Icenogle, J. P., Kahn, T., Kiviat, N., Lancaster, W., Mavromara-Nazos, P. (1993). The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *Journal of Virology*, 67. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.11.6413-6423.1993>
- Hong, Y., Najafi, S., Casey, T., Shea, J. E., Han, S. I. & Hwang, D. S. (2022). Hydrophobicity of arginine leads to reentrant liquid-liquid phase separation behaviors of arginine-rich proteins. *Nature Communications*. 28;13(1):7326. DOI: [10.1038/s41467-022-35001-1](https://doi.org/10.1038/s41467-022-35001-1)
- Hubbard, R. E. & Kamran-Haider, M. (2010). Hydrogen Bonds in Proteins: Role and Strength. *Encyclopedia of Life Sciences*, <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0003011.pub2>
- Huertas-Salgado, A., Martín-Gámez, D. C., Moreno, P., Murillo, R., Mercedes-Bravo, M., Villa, L. & Molano, M. (2011). E6 molecular variants of human papillomavirus (HPV) type 16: An updated and unified criterion for clustering and nomenclature. *Virology*, 410 (1), 201-215. DOI: [10.1016/j.virol.2010.10.039](https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.10.039)
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M. & Howley, P. M. (1993). Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Molecular and Cellular Biology*., 13(8), 4918-27. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.8.4918-4927.1993>
- Jave-Suárez, L. F., Ratkovich-González, S., Olimón-Andalón, V. & Aguilar-Lemarroy, A. (2015). Modulación de la apoptosis por el virus del papiloma humano. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 53 (2), S200-S205.
- Saenger, W. (1994). Hydrogen Bonding in Biological Structures. G. A. Jeffrey and W. Saenger. *Biophysical Journal*, 64.
- Jenkins, D. y Bosch, X. (Eds.) 2020. Human Papillomavirus : Proving and Using a Viral Cause for Cancer. *London, England: Academic Press*. Print

- Juneja T., Pandya M. D., Shah S. (2021). Molecular Landscape and Computational Screening of the Natural inhibitors against HPV16 E6 Oncoprotein. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 22 (8), 2461-2469. [10.31557/APJCP.2021.22.8.2461](https://doi.org/10.31557/APJCP.2021.22.8.2461)
- Keil, R. G. & Mayer, L. M. (2014). Mineral Matrices and Organic Matter. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. 337-359. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-095975-7.01024-X>
- Khalil, S. H., Mitev, V., Vlaykova, T., Cavicchi, L. & Zhelev, N. (2015). Discovery and development of Seliciclib. How systems biology approaches can lead to better drug performance. *Journal of Biotechnology*, 202, 40-49. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.02.032>
- Khazanov, N. A. & Carlson, H. A. (2013). Exploring the Composition of Protein-Ligand Binding Sites on a Large Scale. *PLoS Computational Biology*, 9(11). DOI: [10.1371/journal.pcbi.1003321](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003321)
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, BA., Thiessen, PA., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J. & Bolton, EE. (2023). PubChem 2023 update. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D1373–D1380. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac956>
- Kolluru, S., Momoh, R., Lin, L., Mallareddy, J. R. & Krstenansky, J. L. (2019). Identification of potential binding pocket on viral oncoprotein HPV16 E6: a promising anti-cancer target for small molecule drug discovery. *BMC Molecular and Cell Biology* 20, (30). <https://doi.org/10.1186/s12860-019-0214-3>
- Kumar, A., Rathi, E. & Kini, S.G. (2020). Drug repurposing approach for the identification and designing of potential E6 inhibitors against cervical cancer: an in silico investigation. *Structural Chemistry* (31), 141–153. <https://doi.org/10.1007/s11224-019-01378-x>
- Kumar, S., Jena, L., Mohod, K., Sangeeta, D. & Varma, K. A. (2015). Virtual Screening for Potential Inhibitors of High-Risk Human Papillomavirus 16. *Interdiscip Sci Computational Life Sciences* 7, 136–142. <https://doi.org/10.1007/s12539-015-0008-Z>
- Lee, S. S., Glaunsinger, B., Mantovani, F., Banks, L. & Javier, R. (2000). Multi-PDZ Domain Protein MUPP1 Is a Cellular Target for both Adenovirus E4-ORF1 and High-Risk

- Papillomavirus Type 18 E6 Oncoproteins. *Journal of Virology*, 74(20):9680–9693. DOI: [10.1128/jvi.74.20.9680-9693.2000](https://doi.org/10.1128/jvi.74.20.9680-9693.2000)
- Lizano, M., De la Cruz-Hernández, E., Carrillo-García, A., García-Carrancá, A., Ponce de León-Rosales, S., Dueñas-González, A., Hernández-Hernández, D. M. & Mohar, A. (2006). Distribution of HPV16 and 18 intratypic variants in normal cytology, intraepithelial lesions, and cervical cancer in a Mexican population. *Gynecologic Oncology*, 102 (2), 230 - 23. DOI: [10.1016/j.ygyno.2005.12.002](https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2005.12.002).
- López-Sánchez, R., Laurents, D. V. & Mompeán, M. (2024). Hydrogen bonding patterns and cooperativity in polyproline II helical bundles. *Communications Chemistry*, 7 (191). <https://doi.org/10.1038/s42004-024-01268-2>
- Madushanka, A., Moura, R. T. Jr., Verma, N. & Kraka, E. (2023). Quantum Mechanical Assessment of Protein-Ligand Hydrogen Bond Strength Patterns: Insights from Semiempirical Tight-Binding and Local Vibrational Mode Theory. *International Journal of Molecular Science.*, 24 (7), 6311. <https://doi.org/10.3390/ijms24076311>
- Medrano-Guzmán, R. (2022). Epidemiología del cáncer Cérvicouterino. *Instituto Mexicano del Seguro Social*. <https://www.gob.mx/imss/articulos/epidemiologia-del-cancer-Cérvicouterino?idiom=es>
- Meng, E. C., Pettersen, E. F., Couch, G. S., Huang, C. C. & Ferrin, T. E. (2006). Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera. *BMC Bioinformatics*, 7(339), 1-10. DOI: [10.1186/1471-2105-7-339](https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-339)
- Mohan, A., Krishnamoorthy, S., Sabanayagam, R., Schwenk, G., Feng, E., Ji, H. F., Muthusami, S. (2023). Pharmacophore based virtual screening for identification of effective inhibitors to combat HPV 16 E6 driven cervical cancer. *European Journal of Pharmacology*, 957. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175961>.
- Munishwar, N. G. & Vladimir, N. U. (2023). Biological Importance of Arginine: Roles in Structure, Disorder, and Functionality of Peptides and Proteins. *Preprints*. doi: [10.20944/preprints202310.1723.v1](https://doi.org/10.20944/preprints202310.1723.v1)
- Muñoz-Bello, J. O, Carrillo-García, A., Lizano, M. (2022). Epidemiology and Molecular Biology of HPV Variants in Cervical Cancer: The State of the Art in Mexico. *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (15), 8566. <https://doi.org/10.3390/ijms23158566>

- Muñoz, N., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., Snijders, P. JF. & Meijer, C. JLM. (2003). Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 348 (6), 518-527. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa021641>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [cited 2024]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Némethy, G. (1967). Hydrophobic Interactions. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 6(3), 195-206. <https://doi.org/10.1002/anie.196701951>
- Omar, S., Mohd-Tap, F., Shameli, K., Rasit-Ali, R., Che-Jusoh, N. W. & Ahmad-Khairudin, N. B. (2018). Sequence analysis and comparative modelling of nucleocapsid protein from *pseudomonas stutzeri*. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 458 (012025). DOI: [10.1088/1757-899X/458/1/012025](https://doi.org/10.1088/1757-899X/458/1/012025)
- Ong, C. K., Chan, S. Y., Campo, M. S., Fujinaga, K., Mavromara-Nazos, P., Labropoulou, V., Pfister, H., Tay, S. K, ter Meulen, J., Villa, L. L. (1993). Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *Journal of Virol*, 67. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.11.6424-6431.1993>
- Ortiz-Ortiz, J., Alarcón-Romero, LdC., Jiménez-López, M. A., Garzón-Barrientos, V. H., Calleja-Macías, I., Barrera-Saldaña, H. A., Leyva-Vázquez, M. A. & Illades-Aguilar, B. (2015). Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico. *Virology Journal*, 12 (29). <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0242-3>
- Ozbun M. A., (2019). Extracellular events impacting human papillomavirus infections: Epithelial wounding to cell signaling involved in virus entry. *Papillomavirus Research*, 7, 188-192. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2019.04.009>
- Pal, A. & Kundu, R. (2020). Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. *Frontiers in Microbiology*. 21 (10). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03116>

- Pantsar, T. & Poso, A. (2018). Binding Affinity via Docking: Fact and Fiction. *Molecules*, 23 (8), 1899. <https://doi.org/10.3390/molecules23081899>
- Pérez-Quintanilla, M., Méndez-Martínez, R., Vázquez-Vega, S., Espinosa-Romero, R., Sotelo-Regil, R., Pérez-Montiel, M. D., Ramos-Alamillo, U., Cabrera-López, T. J., Barquet-Muñoz, S. A., Pérez-Plascencia, C., García-Carrancá, A. & Cantú de León, D. (2020). Alta prevalencia del virus del papiloma humano y variantes europeas del VPH 16 que infectan concomitantemente el cuello uterino y la cavidad bucal en mujeres VIH positivas. *PLoS ONE*, 15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227900>
- Pippa F. C., Bradley, S., Luo, Q., Kimple, J. R. (2021). Biology of HPV Mediated Carcinogenesis and Tumor Progression. *Seminars in Radiation Oncology*, 31 (4), 265-273. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2021.02.006>.
- Ricci-López, J., Vidal-Limón, A., Zúñiga, M., Jiménez, V. A., Alderete, J. B., Brizuela, C. A. & Águila, S. (2019). Molecular modeling simulation studies reveal new potential inhibitors against HPV E6 protein. *PLoS One*, 14 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213028>
- Rodríguez-Ruiz, H. A., Garibay-Cerdenares, O. L., Illades-Aguilar, B., Montañó, S., Jiang, X. & Leyva-Vázquez, M. A. (2019). In silico prediction of structural changes in human papillomavirus type 16 (HPV16) E6 oncoprotein and its variants. *BMC Molecular and Cell Biology* 20 (35). <https://doi.org/10.1186/s12860-019-0217-0>
- Roth, C. M., Neal, B. L. & Lenhoff, A. M. (1996). Van der Waals Interactions Involving Proteins. *Biophysical Journal*, 70, 977-987. DOI: [10.1016/S0006-3495\(96\)79641-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79641-8)
- Sahu, U., Khare, P. & Yadav, A. (2022). Potential drug against HPV and repurposing of existing drugs. En P. Khare & A. Jain (Eds.), *Immunopathology, Diagnosis and Treatment of HPV induced Malignancies* (129-143). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91797-1.00007-7>
- Salamanca-Viloria, J., Allega, M. F., Lambrugh, M. & Papaleo, E. (2017). An optimal distance cutoff for contact-based Protein Structure Networks using side-chain centers of mass. *Scientific Reports*, 7(1). DOI: [10.1038/s41598-017-01498-6](https://doi.org/10.1038/s41598-017-01498-6).
- Salcedo, M., Pina-Sanchez, P., Vallejo-Ruiz, V., Monroy-Garcia, A., Aguilar-Lemarroy, A., Cortes-Gutierrez, E. I., Santos-Lopez, G., Montoya-Fuentes, H., Grijalva, R.,

- Madrid-Marina, V., Apresa-Garcia, T., Hernandez, D. M., Jave-Suarez, L. F., Romero, P., Poot, A., Salgado, E., Ramos-Gonzalez, P., Gonzalez-Hernandez, R., Canton, J. C., Jimenez-Aranda, L., Parra-Melquiadez, M., Paniagua, L., Mendoza, M., Arreola, H., Villegas, V., Torres-Poveda, K., Bahena-Roman, M., Gonzalez-Yebra, B., Taniguchi, K., Rodea, C., Mantilla-Morales, A., Mora-Garcia M. L., Velazquez-Velazquez, C. K., Cordova-Uscanga, C., Peralta, R., Lopez-Romero, R., Marrero, D., Bandala, C., Reyes-Leyva, J., Furuya, M. E., Almeida, E., Galvan, M. E. & Grijalva, I. (2014). Human papillomavirus genotypes among females in Mexico: a study from the Mexican institute for social security. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.*, 15(23), 10061-6.
<http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.23.10061>
- Sanclemente, G. (2003). Lo que los clínicos deben saber acerca de las vacunas contra el virus del papiloma humano. *Gaceta Médica de México*, 139 (2), 173-183.
file:///C:/Users/prueb/Downloads/gm032n.pdf
- Shaikh, F., Sanehi, P. & Rawal, R. (2012). Molecular screening of compounds to the predicted Protein-Protein Interaction site of Rb1-E7 with p53- E6 in HPV. 8 (13), 607-612. DOI: [10.6026/97320630008607](https://doi.org/10.6026/97320630008607)
- Shao, J., Kuiper, B. P., Thunnissen, A. M. W. H., Cool, R. H., Zhou, L., Huang, C., Dijkstra, B. W. & Bross, J. (2022). The Role of Tryptophan in π Interactions in Proteins: An Experimental Approach. *Journal of the American Chemical Society*, 144 (30), 13815-13822. DOI: [10.1021/jacs.2c04986](https://doi.org/10.1021/jacs.2c04986)
- Sharma, S., Baksi, R. & Agarwal, M. Repositioning of anti-viral drugs as therapy for cervical cancer. (2016). *Pharmacological Reports*. 68(5), 983-9.
DOI:[10.1016/j.pharep.2016.05.007](https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.05.007)
- Shimada, M., Yamashita, A., Saito, M., Ichino, M., Kinjo, T., Mizuki, N., Klinman, D. M. & Okuda, K. (2020). The human papillomavirus E6 protein targets apoptosis-inducing factor (AIF) for degradation. *Scientific reports*, 10 (14195).
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-71134-3>
- Snoeck, R., Noel, J. C., Muller, C., De Clercq, E. & Bossens, M. (1999). Cidofovir, a new approach for the treatment of cervix intraepithelial neoplasia grade III (CIN III).

- Journal of Medical Virology*, 60(2), 205-209. DOI: [10.1002/\(sici\)1096-9071\(200002\)60:2<205::aid-jmv16>3.0.co;2-8](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9071(200002)60:2<205::aid-jmv16>3.0.co;2-8)
- Soumia, M., Hajji, H., El Mzibri, M., Zegzouti-Younes, F., Mohammed, B., Mohammed, B. & Benaissa, M. (2022). In-Silico Molecular Modeling Studies to Identify Novel Potential Inhibitors of HPV E6 Protein. *Vaccines*, 10(9), 1452. <https://doi.org/10.3390/vaccines10091452>
- Sun, Q. (2022). The Hydrophobic Effects: Our Current Understanding. *Molecules*, 27(20), 7009. <https://doi.org/10.3390/molecules27207009>
- Tan, S., de Vries, E. G. E., van der Zee, A. G. J., de Jong, S. (2012). Anticancer Drugs Aimed at E6 and E7 Activity in HPV-Positive Cervical Cancer. *Current Cancer Drug Targets*, 12, 170-184. DOI: [10.2174/156800912799095135](https://doi.org/10.2174/156800912799095135)
- Tungteakkhun, S. S. & Duerksen-Hughes, P. J. (2008). Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Archives of Virology*, 153, 397–408. <https://doi.org/10.1007/s00705-007-0022-5>
- Thomas, M. & de Lawrence, B. (1998). Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene*, 17, (2943–2954). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202223>
- Thomas, M., Tomaić, V., Pim, D., Myers, M. P., Tommasino, M. & Banks, L. (2013). Interactions between E6AP and E6 proteins from alpha and beta HPV types. *Virology*, 435 (2), 357-62. DOI: [10.1016/j.virol.2012.11.004](https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.11.004)
- UCSF Computer Graphics Laboratory. (2015). Matchmaker. <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/docs/ContributedSoftware/matchmaker/matchmaker.html>
- Vos, R. M., Altreuter, J., White, E. A. & Howley, P. M. (2009). The Ubiquitin-Specific Peptidase USP15 Regulates Human Papillomavirus Type 16 E6 Protein Stability. *Journal of Virology*, 83 (17). <https://doi.org/10.1128/jvi.00605-0>
- Vande-Pol & Klingelhutz, A. J. (2013). Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*, 445 (1-2), 115-1137. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.026>
- Wang, J. C. K., Baddock, H. T., Mafi, A., Foe, T. I, Bratkowski, M., Lin, T. Y., Jensvold, Z. D., Preciado-López, M., Stokoe, D., Eaton, D., Hao, Q. & Nile, A. H. (2024).

- Structure of the p53 degradation complex from HPV16. *Nature Communications*, 15. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45920-w>
- Wang, Z., Fan, F., Li, Z., Ye, F., Wang, Q., Gao, R., Qiu, J., Lv, Y., Lin, M., Xu, W., Luo, C., Yu, X. (2024) Structural insights into the functional mechanism of the ubiquitin ligase E6AP. *Nature Communications*, 15(1), 3531. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-47586-w>
- Yamada, T., Manos, M. M., Peto, J., Greer, C. E., Munoz, N., Bosch, F. X., & Wheeler, C. M. (1997). Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *Journal of Virology*, 71(3), 2463-2472. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.3.2463-2472.1997>
- Yang, J., Dai, L., Chen, M., Li, B., Ding, N., Li, G., Liu, Y., Li, M., Wang, B., Shi, X. & Tan, H. (2016). Inhibition of antiviral drug cidofovir on proliferation of human papillomavirus-infected cervical cancer cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12 (5), 2965-2973. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3718>
- Yuan, C. H., Filippova, M., Tungteakkhun, S. S., Duerksen-Hughes, P. J. & Krstenansky, J. L. (2012). Small molecule inhibitors of the HPV16-E6 interaction with caspase 8. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22 (5), 2125-2129. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.12.145>
- Zacapala-Gómez, A. E., Del Moral-Hernández, O., Villegas-Sepúlveda, N., Hidalgo-Miranda, A., Romero-Córdoba, S. L., Beltrán-Anaya, F. O., Leyva, M. A., Alarcón-Romero, LdelC. & Illades-Aguir, B. (2016). Changes in global gene expression profiles induced by HPV 16 E6 oncoprotein variants in cervical carcinoma C33-A cells. *Virology*, 488, 187-195. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.11.017>
- Zanier, K., Charbonnier, S., M'Hamed-Ould-Sidi, A. O., McEwen, A. G., Ferrario, M.G., Poussin-Courmontagne, P., Cura, V., Brimer, N., Ould-Babah, K., Ansari, T., Muller, I., Stote, R. H., Cavarelli, J., Vande-Pol, S. & Travé, G. (2013). Structural Basis for Hijacking of Cellular LXXLL Motifs by Papillomavirus E6 Oncoproteins. *Science*, 339, 694-698. [10.1126/science.1229934](https://doi.org/10.1126/science.1229934)
- Zhebe, I., Richard, C., DeCarlo, C. A., Shai, A., Lambert, P. F., Lichtig, H., Tommasino, M. & Sherman, L. (2009). Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their

dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis. *Virology*, 383 (1), 69-77. [doi: 10.1016/j.virol.2008.09.036](https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.09.036)

Zhuang, W. R, Wang, Y., Cui, P. F., Xing, L., Lee, J., Kim, D., Jiang, H. L. & Oh, Y. K. (2019). Applications of π - π stacking interactions in the design of drug-delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 294, 311-326. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.12.014>