

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el SECIHTI (Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

CICESE © 2025, Todos los Derechos Reservados, CICESE

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California



Maestría en Ciencias en Nanociencias

Investigación sobre la inhibición del virus del Zika mediante métodos computacionales de dinámica molecular e híbridos (QM/MM)

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Gabriel Martínez Gutiérrez

Ensenada, Baja California, México

2025

Tesis defendida por

Gabriel Martínez Gutiérrez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Andreas Goetz

Codirector de tesis

Dr. Jonathan Guerrero Sánchez

Codirector de tesis

Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez

Dra. Dalia Marcela Muñoz Pizza

Dr. José Israel Paez Ornelas



Dr. Alejandro Huerta Saquero

Coordinador del Posgrado en Nanociencias

Dra. Ana Denise Re Araujo

Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta Gabriel Martínez Gutiérrez como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

Investigación sobre la inhibición del virus del Zika mediante métodos computacionales de dinámica molecular e híbridos (QM/MM)

Resumen aprobado por:

Dr. Andreas Goetz

Codirector de tesis

Dr. Jonathan Guerrero Sánchez

Codirector de tesis

La infección por el virus del Zika carece de tratamiento específico; por ello, la helicasa NS3 del virus del Zika, esencial para la replicación viral, constituye un blanco atractivo. Se evaluaron 20 compuestos inhibitorios: 10 competitivos (CID) y 10 alostéricos (AID). Se realizó un acoplamiento molecular dirigido semiflexible con 'AutoDock4', empleando cinco cajas de búsqueda para mapear sitios propuestos por servicios web y la literatura. Para estudiar los estados conformacionales, se llevaron a cabo dinámicas moleculares gaussianas aceleradas (GaMD) con cinco réplicas por compuesto para promediar el comportamiento, así como simulaciones híbridas QM/MM semiempíricas para el análisis del proceso de hidrólisis del ATP. Este proceso se identificó mediante 'Steered Molecular Dynamics' (SMD), obteniendo la trayectoria más simple, y la barrera energética correspondiente se estimó con el 'Adaptive String Method' (ASM). Cuatro compuestos competitivos (CID-2, CID-5, CID-7 y CID-9) estabilizaron el motivo 'P-loop' y mostraron un comportamiento consistente con la ocupación del sitio activo, mientras que los compuestos AID no se logró determinar un cambio estructural asociado a una inhibición alostérica. La barrera energética estimada para la hidrólisis del ATP fue de 2.60Kcal/mol. En conjunto, los resultados señalan a un subconjunto de CID como candidatos competitivos y aportan una base para comprender la hidrólisis de ATP en la helicasa NS3 del virus del Zika en presencia de Mn^{2+} .

Palabras clave: Virus del zika, helicasa NS3, inhibición, dinámica molecular, QM/MM.

Abstract of the thesis presented by Gabriel Martínez Gutiérrez as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience.

Investigation of Zika virus inhibition using molecular dynamics and hybrid (QM/MM) computational methods

Abstract approved by:

Dr. Andreas Goetz

Thesis Co-Director

Dr. Jonathan Guerrero Sánchez

Thesis Co-Director

There is no specific treatment for Zika virus infection; for this reason, the NS3 helicase of the Zika virus, which is essential for viral replication, is an attractive target. Twenty inhibitory compounds were evaluated: 10 competitive (CID) and 10 allosteric (AID). Semi-flexible molecular docking was performed with AutoDock4, using five search boxes to map sites proposed by web services and the literature. To study the conformational states, accelerated Gaussian molecular dynamics (GaMD) were performed with five replicates per compound to average the behavior, as well as semi-empirical QM/MM hybrid simulations for the analysis of the ATP hydrolysis process. This process was identified using 'Steered Molecular Dynamics' (SMD), obtaining the simplest trajectory, and the corresponding energy barrier was estimated with the 'Adaptive String Method' (ASM). Four competitive compounds (CID-2, CID-5, CID-7, and CID-9) stabilized the P-loop motif and showed behavior consistent with active site occupancy, while no structural change associated with allosteric inhibition could be determined for the AID compounds. The estimated energy barrier for ATP hydrolysis was 2.60 kcal/mol. Taken together, the results point to a subset of CIDs as competitive candidates and provide a basis for understanding ATP hydrolysis in Zika virus NS3 helicase in the presence of Mn^{2+} .

Keywords: Zika virus, NS3 helicase, inhibition, molecular dynamics, QM/MM.

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico a mis padres, que, a pesar de nunca entender exactamente qué es lo que hacía y hago, siempre me apoyaron.

Agradecimientos

Principalmente, quiero agradecer a mi novia, ya que fue mi principal guía y orientadora. Muchas gracias por siempre escucharme y apoyarme en todo. Te amo, Karely, nunca lo olvides.

Agradezco al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, al Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México por generar las condiciones administrativas e infraestructurales ideales para desarrollar todas las actividades de este proyecto de tesis. Agradezco a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el apoyo económico brindado, el cual fue fundamental para la realización de este trabajo. También agradezco a los proyectos LNS-BUAP 202201042N y al centro de supercómputo THUBAT KAAL IPICYT (proyecto TKII-JGSA001) por el uso de sus recursos computacionales.

Agradecemos a los proyectos IG101124 e IA100624 de la DGAPA-UNAM por su apoyo financiero. Los cálculos se realizaron en el Centro de Supercomputación DGTIC-UNAM, proyectos LANCAD-UNAM-LANCAD-UNAM-DGTIC-368 y LANCAD-UNAM-DGTIC-422.

Agradecemos los recursos computacionales proporcionados a través del programa "Advanced Cyberinfrastructure Coordination Ecosystem: Services" & Support (ACCESS), que cuenta con el apoyo de las subvenciones n.º 2138259, n.º 2138286, n.º 2138307, n.º 2137603 y n.º 2138296 de la "National Science Foundation" (supercomputadora Expanse en el Centro de Supercomputación de San Diego a través de la asignación BIO250148).

Agradezco a mis directores de tesis, el Dr. Andreas Goetz y el Dr. Jonathan Guerrero Sánchez, por el apoyo brindado durante estos años, sobre todo por siempre confiar en mí y alentarme a probar e investigar cosas nuevas para mejorar día a día. De no ser por esa confianza, este trabajo no se hubiera podido realizar.

Agradezco al Dr. José Israel Paez Ornelas, al Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez y a la Dra. Dalia Marcela Muñoz Pizza por haber formado parte del comité evaluador de esta tesis. Gracias a su conocimiento y experiencia, se logró desarrollar una investigación de calidad.

Agradezco al Laboratorio Virtual de Modelado de Materiales por permitirme formar parte de este gran equipo, que me ha brindado su apoyo y agradables tardes de conversación y al Dr. Aldo Rodríguez por siempre solucionar los problemas técnicos que se presentaron.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xii
Capítulo 1. Introducción	
1.1. Antecedentes	4
1.2. Justificación	8
1.3. Hipótesis	8
1.4. Objetivos	8
1.4.1. Objetivo general	8
1.4.2. Objetivos específicos	9
Capítulo 2. Marco teórico	
2.1. Teoría clásica	10
2.2. Teoría Cuántica	17
2.2.1. Teoría del funcional de la densidad	23
2.2.2. Teoría Híbrida	26
Capítulo 3. Metodología	
3.1. Modelado y optimización de los compuestos candidatos a fármacos	30
3.2. Selección y preparación de la estructura de la NS3-helicasa	30
3.3. Acoplamiento molecular de los compuestos candidatos a fármacos	31
3.4. Carga de parámetros, solvatación y dinámica acelerada	32
3.4.1. Simulaciones QM/MM	33
3.5. Análisis de resultados	34
Capítulo 4. Resultados	
4.1. Modelado, optimización y selección de los compuestos candidatos a fármacos	35
4.2. Acoplamiento Molecular de los compuestos candidatos a fármacos	37
4.3. Dinámica Molecular de los compuestos candidatos a fármacos	40
4.3.1. Compuestos inhibidores competitivos	40
4.3.2. Compuestos inhibidores alostérico	46
4.3.3. Simulaciones del proceso de hidrólisis del ATP	50
Capítulo 5. Conclusiones	
Literatura citada	59

Lista de figuras

Figura	Página
1. Distribución geográfica de la transmisión del ZIKV en el mundo (datos al 29 de mayo de 2024). Los países en tono oscuro han registrado casos activos o históricos de infección por este virus; los tonos claros indican regiones con vectores competentes pero sin casos reportados; y los espacios en blanco corresponden a áreas sin vectores ni casos documentados. Imagen traducida de: Organización Mundial de la Salud, 2024.	2
2. Casos confirmados de enfermedad por ZIKV en México en un periodo de 2015 hasta el 17 de Julio de 2025, se representa por estado con un gradiente de color, que va de 1 caso (celeste claro) a 2,106 casos (azul rey), datos obtenidos de: (Lezana Fernández et al., 2025).	3
3. Proteínas no estructurales (NS) del ZIKV, a) NS-1 (PDB ID 5K6K de Brown et al., 2016), b) NS2B-NS3 proteasa (PDB ID 5LC0 de Lei et al., 2016), c) NS3 helicasa (PDB ID 5GJC de Tian et al., 2016), d) NS5 (PDB ID 5U04 de Godoy et al., 2017).	4
4. Estructuras 2D de los compuestos inhibitorios competitivos (CID) del 1 al 10. Fuente: Raubenolt et al. (2021).	6
5. Estructuras 2D de los compuestos inhibitorios alostérica (AID) del 1 al 10. Fuente: Raubenolt et al. (2021).	7
6. Representación tridimensional de los compuestos CID optimizados con su mapa de potencial electrostático (MEP). Las regiones rojas indican zonas de alta densidad electrónica (potencial negativo) y las azules zonas de baja densidad (potencial positivo).	35
7. Compuestos AID optimizados junto con su mapa de potencial electrostático (MEP). Se observan distribuciones de carga variadas, en su mayoría concentradas en regiones aromáticas o polares.	36
8. a) Diagrama de Ramachandran para la helicasa NS3, resaltando los residuos outliers. b) Representación estructural de la helicasa con sus dominios I (rosado), II (cian) y III (naranja), así como el sitio activo y la región del "P-loop".	37
9. Cajas de búsqueda utilizadas para el acoplamiento molecular en: a) Dominio I, b) Dominio II, c) Dominio III, d) Región alostérica PA y e) Sitio activo. La proteína se representa como superficie molecular.	38
10. Poses de acoplamiento y mapas de interacciones para los compuesto CID-2 y CID-5, respectivamente.	39
11. Poses de acoplamiento y sus respectivos mapas de interacciones para los compuestos AID-10 y AID-8 del dominio PA, respectivamente.	41
12. Visualización del sistema CID-1 para la primer trayectoria de producción, el compuesto se mantiene unido en el sitio activo a lo largo de 200 ns.	42
13. Análisis de RMSD de los compuestos CID en comparación con la proteína libre (5GJC) y con ATP en el sitio activo, de los compuestos CID-1 a CID-5.	43
14. Análisis de RMSD de los compuestos CID en comparación con la proteína libre (5GJC) y con ATP en el sitio activo, de los compuestos CID-6 a CID-10.	43

15.	Análisis de RMSF para los residuos del "P-loop" (H195 a R202) en presencia de los compuestos CID, ATP y en la proteína libre (5GJC). Se observa que la mayoría de los compuestos CID reducen la fluctuación relativa de los residuos en comparación con la proteína sin ligando, acercándose al comportamiento estabilizador observado con ATP.	44
16.	Análisis de contactos nativos (azul) y no nativos (rojo) para el compuesto AID-1 en el Dominio II, evaluado a lo largo de cinco réplicas de dinámica molecular. Se observa la ausencia de contactos persistentes con la proteína, indicando una disociación temprana del ligando y su incapacidad para mantenerse en el sitio de unión.	46
17.	Análisis de contactos nativos (azul) y no nativos (rojo) para el compuesto AID-10 en el Dominio PA, a lo largo de cinco réplicas. En cuatro de las cinco simulaciones se observa una interacción sostenida con la proteína, manteniendo parcial o totalmente los contactos nativos, lo cual indica permanencia del ligando en el sitio de unión original identificado por el acoplamiento molecular.	47
18.	Análisis de RMSD de los compuestos AID seleccionados en los dominios PA y III, en comparación con ATP y la proteína libre (5GJC).	48
19.	Análisis de RMSF para los residuos del "P-loop" (H195–R202), correspondiente al sitio activo, en presencia de los compuestos AID, ATP y la proteína libre (5GJC).	49
20.	Primera región QM definida para los cálculos QM/MM. Los átomos coloreados en rojo corresponden a los incluidos explícitamente en el tratamiento cuántico, mientras que el resto de la proteína se modela con mecánica molecular. Esta región abarca fragmentos de los residuos Arg462, Arg459, Gln455, Gly415, Gly286, Arg202, Thr201, Lys200, el ligando ATP y un ión metálico divalente (esfera roja), todos ellos involucrados en el mecanismo de hidrólisis.	51
21.	Primer acercamiento al mecanismo de hidrólisis del ATP obtenido mediante simulaciones SMD.	51
22.	Segundo acercamiento al mecanismo de hidrólisis del ATP sin participación directa del residuo Glu286.	52
23.	Tercer mecanismo propuesto para la hidrólisis del ATP mediado por una sola molécula de agua y el residuo Glu286.	52
24.	Sistemas obtenidos mediante los cálculos SMD.	53
25.	Coordenadas colectivas (CVs) utilizadas para describir el proceso de hidrólisis del ATP durante los cálculos de ASM. Cada CV representa una distancia clave involucrada en la transferencia protónica o en la ruptura/formación de enlaces fosfato.	54
26.	Sección de la nueva región QM; imagen modificada y obtenida de: García-Martínez et al. (2023).	54
27.	Evolución del proceso de optimización durante el cálculo ASM. Se muestra la convergencia de los nodos a lo largo de los primeros 40,000 pasos, seguida de una etapa de equilibrio de 10,000 pasos adicionales para estabilizar la trayectoria.	55

Figura	Página
28. Perfil de energía libre (PMF) obtenido mediante el método ASM. La curva púrpura muestra el valor promedio del PMF, mientras que las líneas verticales representan el error estimado en cada nodo.	56
29. Diagramas de interacción 2D de la proteína 5GJC y los compuestos a) CID-1, b) CID-2, c) CID-3, d) CID-4.	79
30. Diagramas de interacción 2D de la proteína 5GJC y los compuestos e) CID-5, f) CID-6, g) CID-7, h) CID-8.	80
31. Diagramas de interacción 2D de la proteína 5GJC y los compuestos i) CID-9, j) CID-10.	81
32. Diagramas de interacción 2D de la proteína 5GJC y los compuestos a) AID-1 (D-I), b) AID-2 (D-II).	81
33. Diagramas de interacción 2D de la proteína 5GJC y los compuestos c) AID-3 (D-PA), d) AID-4 (D-II), e) AID-5 (D-PA), f) AID-6 (D-I).	82
34. Diagramas de interacción 2D de la proteína 5GJC y los compuestos g) AID-7 (D-PA), h) AID-8 (D-PA), i) AID-9 (D-II), j) AID-10 (D-PA).	83

Lista de tablas

Tabla	Página
1.	Dimensiones y posiciones de las rejillas de acoplamiento (espaciado 2,0 Å). 31
2.	Resultados de afinidad obtenidos en el acoplamiento molecular. ^a Número de compuesto AID o CID; ^{b-e} Energía de interacción (kcal/mol) entre los compuestos AID y los dominios I, II, III y PA, respectivamente; ^f Energía de acoplamiento entre los compuestos CID y el sitio activo. 38
3.	Número de interacciones no covalentes entre cada compuesto y la proteína durante el acoplamiento molecular. 40
4.	Número de interacciones no covalentes entre los compuestos AID y la proteína en el acoplamiento molecular. Cada renglón representa la cantidad de interacciones en cada dominio D-I, D-II, D-III, D-PA, respectivamente, donde están separadas por un "—" para mostrar cada dominio. 40
5.	^a Compuesto inhibidor competitivo, ^b Energía de unión utilizando PBSA, ^c Energía de unión utilizando GBSA, ^d Peso molecular del compuesto, ^e Hidrofobicidad del compuesto (LogP < 0 muy hidrofílica, LogP ≈ 0 balanceada, LogP > 0 hidrofóbica), ^f Superficie Polar Aparente, mide el área superficial total de todos los átomos polares (PSA < 90 buena absorción oral, PSA > 140 baja permeabilidad celular y absorción oral), ^g Número de aceptores de enlaces de hidrógeno, ^h Número de donadores de enlaces de hidrógeno. 45
6.	Resumen de los compuestos AID y los dominios en los que cumplieron con el criterio de permanencia mínima (2 réplicas con comportamiento estable en el sitio de unión). Solo estos casos serán considerados para análisis estructurales y de interacción. 47
7.	^a Compuesto inhibidor alostérico, ^b Energía de unión utilizando PBSA, ^c Energía de unión utilizando GBSA, ^d Peso molecular del compuesto, ^e Hidrofobicidad del compuesto (LogP < 0 muy hidrofílica, LogP ≈ 0 balanceada, LogP > 0 hidrofóbica), ^f Superficie Polar Aparente, mide el área superficial total de todos los átomos polares (PSA < 90 buena absorción oral, PSA > 140 baja permeabilidad celular y absorción oral), ^g Número de aceptores de enlaces de hidrógeno, ^h Número de donadores de enlaces de hidrógeno. 50

Capítulo 1. Introducción

El virus del Zika (ZIKV) es un arbovirus perteneciente al género *Flavivirus* (familia *Flaviviridae*), transmitido principalmente por mosquitos del género *Aedes* (especialmente *A. aegypti*) (Organización Mundial de la Salud, 2022). También se han confirmado vías de transmisión alternativas, como la transmisión vertical (de madre a feto durante el embarazo), la sexual y la transfusión sanguínea (Musso et al., 2015). La mayoría de las personas infectadas por el ZIKV son asintomáticas, se estima que solo una de cada cuatro individuos desarrolla síntomas. Cuando estos aparecen, suelen ser leves y típicamente incluyen fiebre, erupciones cutáneas, conjuntivitis, cefalea y dolor articular. Los síntomas generalmente comienzan entre 3 y 12 días después de la infección, y persisten entre 4 y 7 días (City of Englewood, 2025). Debido a que estos síntomas son comunes a otras enfermedades transmitidas por mosquitos, como el dengue o el chikunguña, el diagnóstico clínico debe confirmarse mediante pruebas de laboratorio.

Aunque el ZIKV fue aislado por primera vez en 1947 en el bosque de Zika, en Uganda, su presencia se mantuvo limitada a brotes esporádicos en África y Asia hasta principios del siglo XXI. A partir de 2007, comenzó a propagarse por la región del Pacífico y, en 2014, llegó a las Américas. Durante el periodo 2015-2016 se registró la mayor epidemia, con especial impacto en Brasil, donde en septiembre de 2015 se asoció por primera vez la infección con un aumento dramático en los casos de microcefalia en recién nacidos (Organización Panamericana de la Salud, 2022). Esta relación causal entre la infección congénita por Zika y las malformaciones fetales fue confirmada en 2016 (Freitas et al., 2020). Como consecuencia, el 1 de febrero de 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró al ZIKV como una emergencia sanitaria internacional debido al riesgo de microcefalia y otros trastornos neurológicos asociados (Organización Mundial de la Salud, 2016), estatus que se mantuvo hasta noviembre de ese mismo año.

El ZIKV representa un riesgo elevado para ciertos grupos vulnerables. La infección durante el embarazo puede causar microcefalia y otras malformaciones congénitas graves en el feto (Rasmussen et al., 2016), cuadro clínico que se conoce como síndrome congénito por Zika. Además, en niños y adultos, la infección se ha asociado con un mayor riesgo de complicaciones neurológicas, particularmente el síndrome de Guillain-Barré, una forma de parálisis progresiva (Parra et al., 2016). Actualmente, no existen vacunas ni tratamientos antivirales específicos aprobados contra el ZIKV, el manejo clínico es únicamente de soporte, e incluye descanso, hidratación, y el uso de antipiréticos y analgésicos para aliviar los síntomas (Abbink et al., 2016; Shan et al., 2017).

Epidemiológicamente, la expansión del ZIKV ha sido notable. Tras el pico epidémico registrado en 2016,

los casos disminuyeron drásticamente, para el periodo 2017–2018, las cifras globales eran considerablemente menores. No obstante, la transmisión persiste a niveles bajos en varias regiones endémicas. Para finales de 2016, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) reportó que en América Latina y el Caribe se habían notificado más de 532,000 casos sospechosos de Zika (de los cuales 175,000 fueron confirmados), así como 2,439 casos congénitos asociados (Figura 1). A nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud indicó que, hasta el año 2024, se habían reportado casos autóctonos transmitidos por mosquitos en 92 países y territorios. Estos datos evidencian que el ZIKV continúa circulando en regiones tropicales, poniendo en riesgo a millones de personas en áreas donde habitan los mosquitos vectores de Zika, dengue y chikunguña (Organización Panamericana de la Salud, 2022; Organización Mundial de la Salud, 2022, 2024).

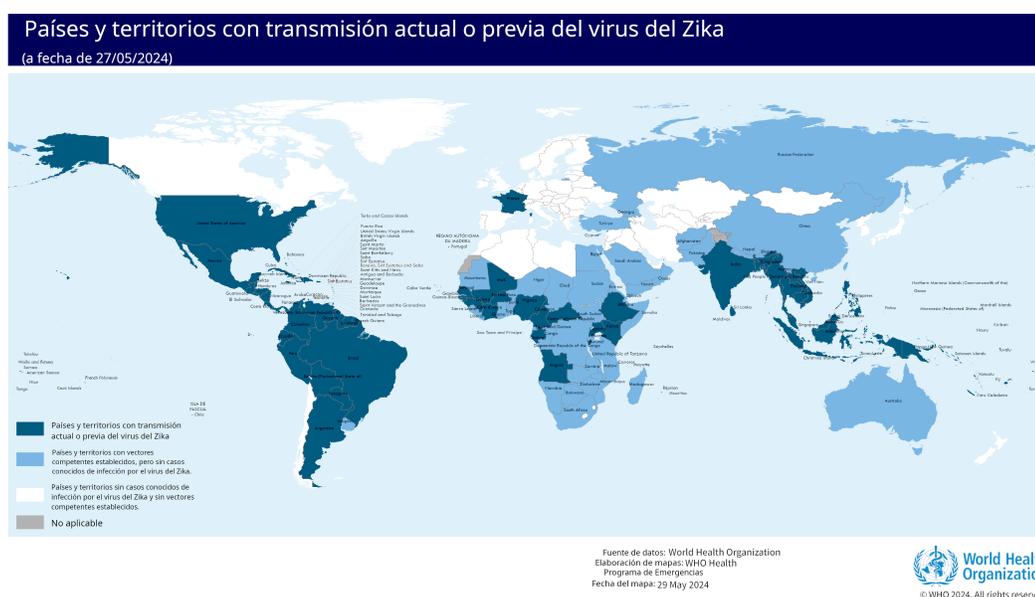


Figura 1. Distribución geográfica de la transmisión del ZIKV en el mundo (datos al 29 de mayo de 2024). Los países en tono oscuro han registrado casos activos o históricos de infección por este virus; los tonos claros indican regiones con vectores competentes pero sin casos reportados; y los espacios en blanco corresponden a áreas sin vectores ni casos documentados. Imagen traducida de: Organización Mundial de la Salud, 2024.

En México, la identificación del ZIKV ocurrió de forma relativamente tardía en comparación con otros países de la región. El primer caso importado se detectó en noviembre de 2015, y ese mismo mes se confirmó el primer caso autóctono en el estado de Quintana Roo (Secretaría de Salud, 2016). A partir de 2017, los casos comenzaron a disminuir notablemente, siguiendo la tendencia observada a nivel regional. De acuerdo con los datos reportados por el Gobierno de México en la semana epidemiológica 28 del año 2025, se puede observar en la Figura 2 el número acumulado de casos confirmados entre 2015 y 2025, siendo el estado de Veracruz el que presenta la mayor cantidad de reportes en el periodo, con 2,106 casos.

En total, se registraron 13,066 casos confirmados en el país durante este periodo (Lezana Fernández et al., 2025).

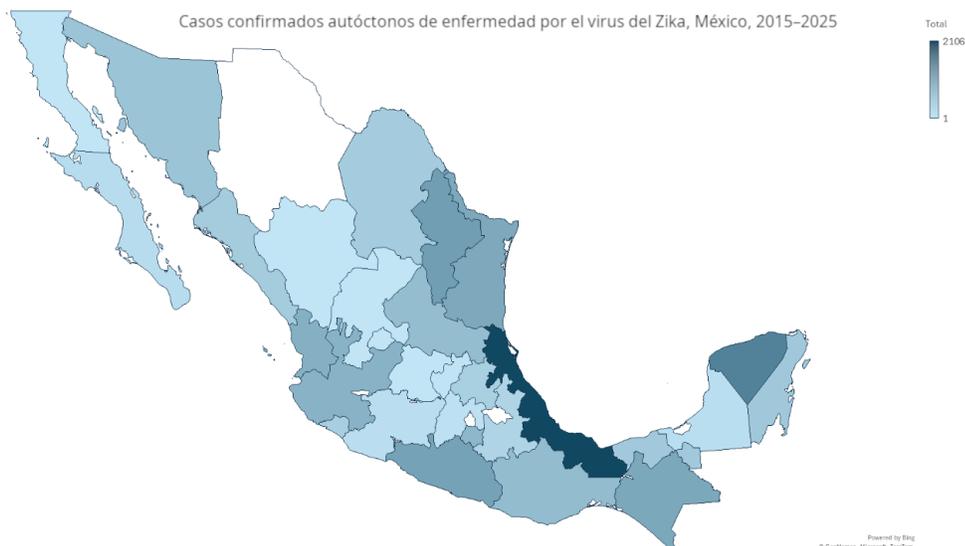


Figura 2. Casos confirmados de enfermedad por ZIKV en México en un periodo de 2015 hasta el 17 de Julio de 2025, se representa por estado con un gradiente de color, que va de 1 caso (celeste claro) a 2,106 casos (azul rey), datos obtenidos de: (Lezana Fernández et al., 2025).

El ZIKV, al igual que otros flavivirus, posee un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo que codifica una poliproteína única. Esta poliproteína se procesa de manera proteolítica para generar las proteínas estructurales (C, prM y E) y las no estructurales: NS1 (Brown et al., 2016), NS2A, NS2B (Lei et al., 2016), NS3 (Tian et al., 2016), NS4A, NS4B y NS5 (Godoy et al., 2017) (Figura 3). Entre estas últimas, NS3 es una proteína bifuncional de gran interés. El dominio N-terminal de NS3 actúa como una proteasa de serina (junto con el cofactor NS2B) encargada del procesamiento de la poliproteína viral. Por su parte, el dominio C-terminal presenta actividad helicasa/NTPasa (Van Den Elsen et al., 2023). La helicasa NS3 cataliza la apertura de la doble hélice del ARN viral, un paso esencial en la replicación del genoma (Xu et al., 2019). Para ello, esta enzima transfiere la energía resultante de la hidrólisis de ATP (u otro nucleósido trifosfato) al proceso de desenrollamiento del ARN, lo cual requiere la presencia de un catión divalente (generalmente Mg^{2+} o Mn^{2+}) en su sitio activo (Wang et al., 2022a; Cao et al., 2016). La unión del ATP y del ion metálico ocurre en una hendidura estructural conservada entre los dominios I y II de la helicasa, donde un motivo en horquilla (*P-loop*) acomoda la molécula de ATP. La hidrólisis del ATP desplaza el *P-loop* y produce cambios conformacionales en la helicasa que le permiten avanzar y desempaquetar el ARN viral (Ramharack et al., 2017).

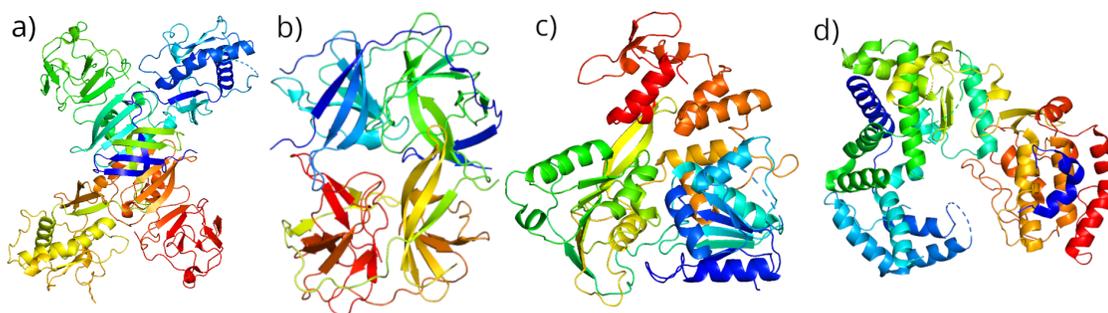


Figura 3. Proteínas no estructurales (NS) del ZIKV, a) NS-1 (PDB ID 5K6K de Brown et al., 2016), b) NS2B-NS3 proteasa (PDB ID 5LC0 de Lei et al., 2016), c) NS3 helicasa (PDB ID 5GJC de Tian et al., 2016), d) NS5 (PDB ID 5U04 de Godoy et al., 2017).

La inexistencia de opciones terapéuticas específicas y la gravedad de las secuelas perinatales subrayan la importancia de desarrollar nuevos fármacos antivirales (Wang et al., 2022b). Considerando que la helicasa NS3 constituye una maquinaria motora crucial para el ciclo de vida del virus ya que, sin su actividad, el virus no podría replicar eficientemente su genoma, esta proteína representa un blanco terapéutico atractivo. Además, la helicasa NS3 participa activamente en el complejo de replicación viral, en conjunto con la ARN polimerasa NS5 y otras proteínas no estructurales. Por estas razones, bloquear su sitio activo donde ocurre la hidrólisis de nucleósidos trifosfato (NTPasa), impediría el desenrollamiento del ARN viral y, en consecuencia, detendría su replicación.

Se han identificado nuevos sitios con potencial farmacológico en NS3 helicasa mediante técnicas como difracción de rayos X con fragmentos pequeños donde, Munawar et al. (2018) encontraron dos sitios de unión novedosos (A y B) estructuralmente conservados en helicasas de flavivirus; uno relacionado con la interacción proteína-proteína (NS3-NS5) y otro de tipo alostérico. Concluyendo que la NS3 helicasa es una diana válida para el diseño de nuevos antivirales.

1.1. Antecedentes

El ZIKV carece de una vacuna aprobada y de un antiviral específico, por ello, la principal estrategia de control se basa en evitar la proliferación de los mosquitos vectores. Para desarrollar nuevas vías de intervención, se han evaluado diversos compuestos, abarcando desde la reutilización de fármacos existentes hasta moléculas diseñadas para inhibir etapas tempranas y tardías del ciclo de replicación viral (Da Silva et al., 2018).

El grave problema de salud pública que representa el ZIKV motivó a Estoppey et al. (2017) a investigar la cavinafungina, un producto natural con actividad potente y selectiva tanto contra el Zika como contra los cuatro serotipos del dengue. Mediante un protocolo innovador de CRISPR/Cas9 en células humanas, identificaron a la peptidasa señal del retículo endoplásmico como el blanco molecular de la cavinafungina. De forma paralela, un perfil genético en *Saccharomyces cerevisiae* y la selección de mutantes resistentes señalaron a la subunidad catalítica SEC11 de dicha peptidasa como un objetivo evolutivamente conservado. Los análisis bioquímicos posteriores demostraron que la cavinafungina bloquea de manera rápida la escisión de las secuencias señal de proteínas tanto virales como del huésped, confirmando así el papel esencial de la peptidasa señal en el ciclo replicativo de los flavivirus.

Por otra parte, Xu et al. (2020) investigaron una serie de compuestos derivados de imidazolona fusionados con tetrahidroquinolina, que demostraron actividad contra la infección por ZIKV, aunque carecen de efecto virucida. Mediante análisis de Western blot y ELISA de las proteínas NS5 y NS1 del virus, se confirmó que estos compuestos reducen eficazmente la replicación viral. En ese mismo estudio, se determinó que la basicidad en la posición N10 no es imprescindible para su actividad antiviral y que la modificación de ciertos grupos farmacóforos, especialmente los sustituyentes en el anillo areno, podría optimizar su eficacia. Estos hallazgos abren nuevas vías para el diseño de candidatos anti-ZIKV y ofrecen perspectivas valiosas para investigaciones y estrategias terapéuticas futuras.

Andrade et al. (2023) llevaron a cabo un cribado de 2,320 compuestos procedentes de la biblioteca química del "Muséum National d'Histoire Naturelle de París" para la inhibición de la proteasa NS2B-NS3, identificando 96 moléculas que mostraron una inhibición superior al 90% a una concentración de 10 μ M. A continuación, se investigaron cinco posibles mecanismos de inhibición mediante ensayos cinéticos y enfoques computacionales, como el acoplamiento molecular, para caracterizar cómo estos compuestos interfieren con la actividad proteolítica de NS2B-NS3. Los resultados de Andrade et al. (2023) proporcionan una base sólida para el diseño de nuevos inhibidores de NS2B-NS3 y ofrecen direcciones valiosas para investigaciones futuras y estrategias terapéuticas contra el ZIKV.

Además de la proteasa NS2B-NS3, otras proteínas no estructurales del ZIKV constituyen blancos prometedores para el desarrollo de antivirales. En este contexto, Byler et al. (2016) emplearon herramientas computacionales para identificar posibles agentes anti-Zika derivados de fuentes naturales. Generaron modelos estructurales de la proteasa, la metiltransferasa, la ARN polimerasa y la helicasa dependiente de ARN del ZIKV; a continuación, realizaron análisis de acoplamiento molecular contra una biblioteca virtual de fitoquímicos. De los 2,263 metabolitos secundarios evaluados, 43 compuestos con propiedades farmacológicas favorables mostraron perfiles de unión destacados hacia una o más de estas proteínas

diana.

La proteína helicasa NS3 del ZIKV (NS3H) constituye un blanco terapéutico de gran relevancia debido a su papel esencial en la replicación del genoma viral. Estudios de dinámica molecular (MD) han mostrado que el bucle de unión al ARN de NS3H adopta una conformación cerrada y estabilizada al interactuar con ARN monocatenario (ssRNA), favoreciendo las funciones de desenrollado y síntesis de ARN (Mottin et al., 2017). Estos cambios conformacionales repercuten directamente en la arquitectura del sitio de unión al ligando, un aspecto crítico para el diseño racional de inhibidores eficaces.

Además, NS3H posee dos sitios de unión principales: uno para el ARN y otro para el ATP, cuya actividad es indispensable para la replicación viral. Estudios de acoplamiento molecular indican que la mayoría de los ligandos presentan energías de unión más favorables en el sitio de ATP que en el del ARN, lo que resalta la pertinencia de este sitio como objetivo farmacológico. La identificación de compuestos activos, algunos presentes en fitomedicamentos de uso relativamente común, sugiere la posibilidad de desarrollar terapias antivirales naturales, accesibles y de bajo costo contra esta enfermedad tropical emergente (Byler et al., 2016). Por tanto, comprender la dinámica estructural y las interacciones ligando-NS3H es crucial para guiar el diseño de estrategias terapéuticas efectivas.

Considerando esto último, destaca el exhaustivo estudio de Raubenolt et al. (2021), quienes evaluaron más de **12.6 millones de compuestos** mediante acoplamiento molecular de alto rendimiento. De este vasto universo químico, seleccionaron cuidadosamente veinte candidatos con potencial terapéutico para dirigirse a la NS3 helicasa del ZIKV. Diez de estos compuestos, capaces de generar una inhibición competitiva en el sitio activo, denominados **CID** (Figura 4), fueron diseñados para competir directamente con el ATP, bloqueando el sitio de hidrólisis esencial para la función de la enzima.

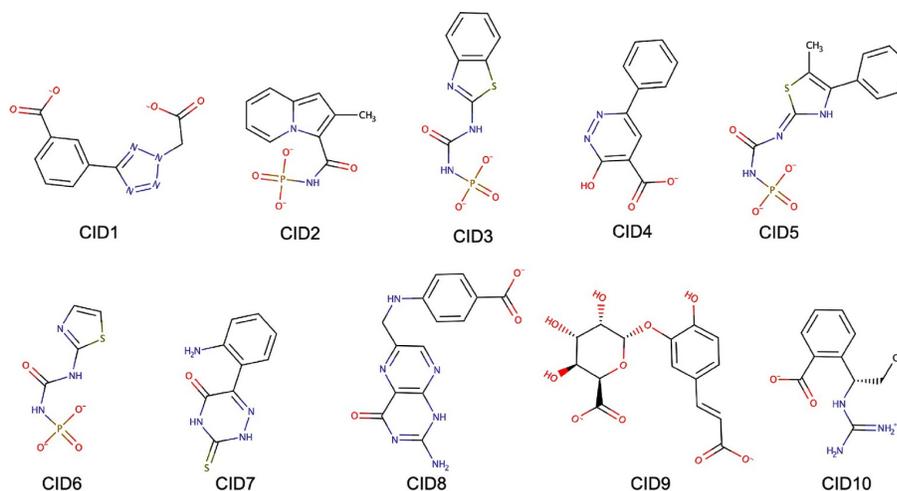


Figura 4. Estructuras 2D de los compuestos inhibitorios competitivos (CID) del 1 al 10. Fuente: Raubenolt et al. (2021).

Los otros diez, capaces de generar un cambio estructural o alostérico, denominados **AID** (Figura 5), se seleccionaron estratégicamente para explorar la inhibición alostérica, evaluando su capacidad de inducir cambios conformacionales críticos que alteren o bloqueen la actividad de la helicasa. Este enfoque integral combina estrategias de inhibición competitiva y alostérica, consolidándose como la base conceptual de este trabajo.

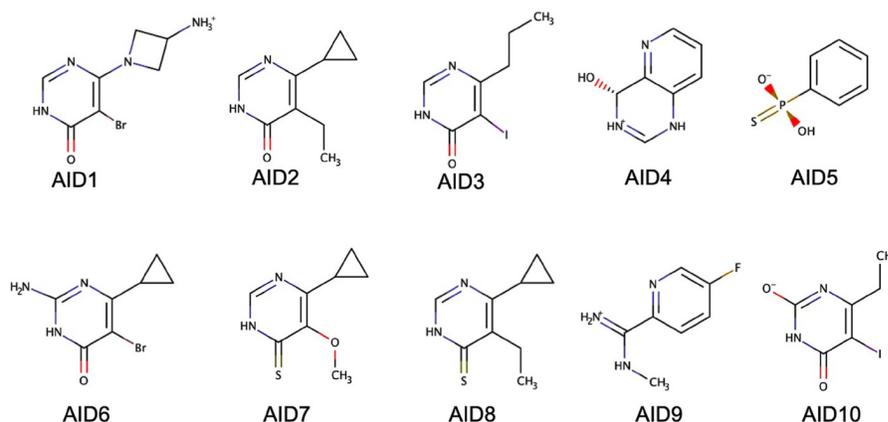


Figura 5. Estructuras 2D de los compuestos inhibitorios alostérica (AID) del 1 al 10. Fuente: Raubenolt et al. (2021).

Por otra parte, estudios como el de Yang et al. (2018) han propuesto mecanismos detallados para la hidrólisis de ATP en la helicasa NS3, en los cuales una molécula de agua protona un residuo ácido glutámico, iniciando así el proceso: primero se rompe la molécula de agua y posteriormente el enlace del fosfato γ del ATP. En contraste, trabajos más recientes, como el de García-Martínez et al. (2023), mediante cálculos computacionales híbridos QM/MM, han determinado este mismo proceso con su barrera energética, describiendo que inicialmente se rompe el enlace del fosfato γ del ATP seguido del rompimiento de la molécula de agua; en este mecanismo, el residuo ácido glutámico se protona y posteriormente se desprotona, permitiendo que el ciclo del mecanismo de reacción pueda repetirse.

Considerando lo anterior, se reafirma que la NS3 helicasa representa una diana farmacológica estratégica para el diseño de antivirales contra el ZIKV. En este trabajo, se retomarán los veinte compuestos seleccionados por Raubenolt et al. (2021) para profundizar su estudio mediante simulaciones que repliquen condiciones más cercanas al entorno biológico real, incorporando explícitamente la presencia del ion divalente esencial para la hidrólisis de ATP. Con ello, se busca aportar evidencia computacional robusta sobre la estabilidad, el modo de unión y el potencial inhibitorio de estos candidatos, sentando las bases para el desarrollo de terapias dirigidas que bloqueen de forma efectiva la actividad de la helicasa y, por ende, el ciclo replicativo viral.

1.2. Justificación

La helicasa NS3 del ZIKV es un componente esencial de su maquinaria replicativa, responsable del desenrollamiento del ARN viral mediante la hidrólisis de ATP. La ausencia de antivirales específicos frente a esta enzima y la alta tasa de mutación de los flavivirus evidencian la necesidad de enfoques innovadores que combinen inhibición competitiva y alostérica para maximizar el potencial terapéutico.

Este estudio se justifica al incorporar explícitamente el ion divalente (Mn^{2+} o Mg^{2+}) que coordina el sitio catalítico en las simulaciones de dinámica molecular, con el objetivo de reproducir con mayor fidelidad las condiciones biológicas reales. Asimismo, se aplicarán metodologías QM/MM para analizar detalladamente la variación energética y cuantificar las barreras de transición durante la hidrólisis de ATP, aportando una perspectiva mecanocuántica que complementa los análisis clásicos de MM/PBSA y RMSF. De esta manera, se generará evidencia computacional robusta sobre la estabilidad estructural, los modos de interacción y las energías de unión de los veinte inhibidores previamente identificados por Raubenolt et al. (2021), sentando las bases para el diseño racional de nuevos compuestos antivirales dirigidos a la NS3 helicasa.

1.3. Hipótesis

Los compuestos CIDs y AIDs inhibirán el sitio activo de la proteína NS3-Helicasa del virus Zika en la región de hidrólisis del ATP en presencia de un ion Mn^{2+} .

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Determinar la capacidad de los compuestos CID para inhibir el proceso de hidrólisis de la NS3-Helicasa del virus Zika, y el potencial de los compuestos AID para generar un cambio estructural en la NS3-Helicasa mediante simulaciones computacionales.

1.4.2. Objetivos específicos

- Modelar y optimizar compuestos CIDs y AIDs mediante simulaciones de primeros principios.
- Obtener la estructura de la NS3-Helicasa del virus Zika con ATP como ligando y un ion Mn_{+2} de Protein Data Bank (PDB).
- Realizar el acoplamiento molecular entre la NS3-Helicasa y los compuestos CIDs y AIDs.
- Identificar los cambios alostéricos generados por los AIDs en la NS3-Helicasa mediante simulaciones de dinámica clásica.
- Analizar compuestos inhibidores competitivos (CID) mediante simulaciones de dinámica clásica.
- Determinar la energía de unión de compuestos CIDs y AIDs.
- Estudiar la hidrólisis del ATP en el sitio activo de la NS3-Helicasa y su alteración por la presencia de AIDs.

Capítulo 2. Marco teórico

Las simulaciones computacionales predicen el comportamiento de macromoléculas, péptidos e incluso átomos mediante la solución numérica de ecuaciones físicas. Dependiendo del nivel de detalle, se pueden emplear Mecánica Molecular (MM) las cuales utilizan leyes de la física clásica con campos de fuerza paramétricos (Leach, 2001) o la Mecánica Cuántica (QM) en donde se da la resolución de la ecuación de Schrödinger, con primeros principios (Martin, 2020).

En ambos enfoques, el núcleo matemático es el *problema de N-cuerpos* (Diacu, 1996): un sistema de N partículas puntuales cuyas posiciones $r_i(t)$ evolucionan según fuerzas mutuas. Cada partícula aporta tres coordenadas (x_i, y_i, z_i) , lo que da lugar a $3N$ variables.

En la siguiente sección desarrollaremos las *ecuaciones de movimiento de Newton* que permiten integrar este conjunto de ecuaciones y avanzar en el tiempo la evolución del sistema.

2.1. Teoría clásica

Cada partícula se caracteriza dinámicamente por su posición $r_i(t)$, su velocidad $\dot{r}_i(t)$ y su aceleración $\ddot{r}_i(t)$, y estáticamente por su masa m_i . En dinámica molecular, que se basa en la física clásica y en las ecuaciones de Newton para el problema de N -cuerpos (Rapaport, 1999), la ley fundamental de movimiento se expresa como:

$$F_i = m_i a_i = m_i \ddot{r}_i = m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} \quad (1)$$

donde F_i es la fuerza neta sobre la partícula i , $r_i(t)$ su posición en función del tiempo y $a_i(t)$ la segunda derivada de dicha posición. Esta formulación da lugar a un sistema acoplado de $3N$ ecuaciones diferenciales de segundo orden para un conjunto de N partículas en tres dimensiones.

Una consideración esencial es que las fuerzas sean *conservativas*; esto garantiza la conservación de la energía mecánica total del sistema cuando éste se halla aislado (Brooks et al., 1983). La fuerza neta sobre cada partícula i se obtiene como el negativo del gradiente del potencial de interacción U con respecto a su posición:

$$F_i\{r_i\} = -\nabla_i U\{r_i\} \quad \text{de modo que} \quad m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = -\nabla_i U(r_i) \quad (2)$$

La trayectoria continua de cada partícula se aproxima mediante una sucesión de pasos de tiempo Δt . El

integrador actualiza posiciones y velocidades a partir de la información disponible en el instante presente; el esquema de uso más extendido en simulación molecular es el *Velocity Verlet*.

Para introducirlo, partimos del integrador de Verlet original (Verlet, 1967), que se obtiene al aplicar series de Taylor (truncadas al segundo orden) a la posición $\mathbf{r}(t)$, la velocidad $\mathbf{v}(t) = \dot{\mathbf{r}}(t)$ y la aceleración $\mathbf{a}(t) = \ddot{\mathbf{r}}(t)$:

$$\begin{aligned}\mathbf{r}(t + \Delta t) &= \mathbf{r}(t) + \Delta t \mathbf{v}(t) + \frac{1}{2} \Delta t^2 \mathbf{a}(t) + \frac{1}{6} \Delta t^3 \mathbf{b}(t) + \mathcal{O}(\Delta t^4) \\ \mathbf{r}(t - \Delta t) &= \mathbf{r}(t) - \Delta t \mathbf{v}(t) + \frac{1}{2} \Delta t^2 \mathbf{a}(t) - \frac{1}{6} \Delta t^3 \mathbf{b}(t) + \mathcal{O}(\Delta t^4)\end{aligned}\quad (3)$$

donde $\mathbf{b}(t) = d^3\mathbf{r}/dt^3$. Al sumar las dos expresiones se elimina la velocidad y se obtiene:

$$\boxed{\mathbf{r}(t + \Delta t) = 2\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t - \Delta t) + \Delta t^2 \mathbf{a}(t)} \quad (4)$$

Las velocidades no intervienen directamente en (4); pueden estimarse restando las dos expansiones de (3):

$$\mathbf{v}(t) = \frac{\mathbf{r}(t + \Delta t) - \mathbf{r}(t - \Delta t)}{2 \Delta t} \quad (5)$$

con error de orden $\mathcal{O}(\Delta t^4)$. Aunque el integrador original de Verlet es reversible y (aproximadamente) conserva la energía total del sistema, una formulación muy utilizada es el esquema *leapfrog*, en el que las velocidades se definen en semipasos temporales. Este desplazamiento de medio paso mantiene la simplicidad del método y sus propiedades geométricas. El esquema "*leapfrog*" se escribe como:

$$\begin{aligned}\mathbf{v}(t + \frac{\Delta t}{2}) &= \mathbf{v}(t - \frac{\Delta t}{2}) + \Delta t \mathbf{a}(t) \\ \mathbf{r}(t + \Delta t) &= \mathbf{r}(t) + \Delta t \mathbf{v}(t + \frac{\Delta t}{2})\end{aligned}\quad (6)$$

donde la aceleración $\mathbf{a}(t)$ se evalúa a partir de las fuerzas calculadas en $\mathbf{r}(t)$. Operativamente, el algoritmo se implementa en dos fases:

Actualización de la velocidad a medio paso:

$$\mathbf{v}(t + \frac{\Delta t}{2}) = \mathbf{v}(t - \frac{\Delta t}{2}) + \Delta t \mathbf{a}(t) \quad (7)$$

Actualización de posiciones y preparación del siguiente paso:

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = \mathbf{r}(t) + \Delta t \mathbf{v}(t + \frac{\Delta t}{2}) \quad (8)$$

tras lo cual se recalculan las fuerzas para obtener $\mathbf{a}(t + \Delta t)$ y se avanza la velocidad al siguiente semipaso:

$$\mathbf{v}(t + \frac{3\Delta t}{2}) = \mathbf{v}(t + \frac{\Delta t}{2}) + \Delta t \mathbf{a}(t + \Delta t) \quad (9)$$

Para magnitudes definidas en tiempos enteros, puede usarse directamente la velocidad a semipaso o una interpolación al tiempo entero. Con la primera opción siendo E_k la energía cinética:

$$E_k(t + \frac{\Delta t}{2}) = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m_i \|\mathbf{v}_i(t + \frac{\Delta t}{2})\|^2 \quad (10)$$

Alternativamente, una velocidad en tiempo entero se aproxima como:

$$\mathbf{v}(t) \approx \frac{1}{2} [\mathbf{v}(t + \frac{\Delta t}{2}) + \mathbf{v}(t - \frac{\Delta t}{2})] \quad (11)$$

y se emplea en $E_k(t)$.

El esquema *leapfrog* requiere almacenar $\mathbf{r}(t)$ y $\mathbf{v}(t \pm \frac{\Delta t}{2})$, es estable numéricamente, simétrico en el tiempo y sencillo de programar, razones por las que es ampliamente utilizado en simulación molecular (Allen & Tildesley, 2017).

Los *campos de fuerza* (o "*force fields*") definen la forma funcional y los parámetros numéricos del potencial de interacción U a partir del cual se obtienen las fuerzas $\mathbf{F}_i = -\nabla_i U$. A continuación se detalla su construcción y justificación matemática, siguiendo referencias clásicas como AMBER 94 (Cornell et al., 1995), OPLS-AA (Jorgensen et al., 1996), CHARMM 22/27 (MacKerell et al., 1998) y la revisión de Ponder & Case (2003).

El potencial de interacción U se expresa como en la Ec. (12), donde U es la suma de la energía potencial procedente de los términos enlazantes y no enlazantes:

$$U = U_{\text{bonded}} + U_{\text{nonbonded}} \quad (12)$$

Los términos enlazantes describen la energía potencial de enlaces, ángulos, torsiones e impropios (Kam-

beraj, 2020):

$$\begin{aligned}
 U_{\text{bonded}} = & \sum_{\text{enlaces}} \frac{k_{i,l}}{2} (l_i - l_{i,0})^2 + \sum_{\text{ángulos}} \frac{k_{i,\theta}}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 \\
 & + \sum_{\text{torsiones}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\omega - \gamma)] + \sum_{\text{impropios}} \frac{k_{i,\eta}}{2} (\eta_i - \eta_{i,0})^2
 \end{aligned} \quad (13)$$

Estos términos modelan *deformaciones internas* mediante resortes armónicos con fuerza constante k_i y funciones periódicas. El primer término representa la interacción entre pares de átomos enlazados: un potencial armónico que aumenta la energía cuando la longitud del enlace l_i se aparta de su valor de equilibrio $l_{i,0}$. El segundo término suma todos los ángulos A–B–C (A y C unidos a B), caracterizados por las constantes de fuerza $k_{i,\theta}$ y los valores de referencia $\theta_{i,0}$. El tercero es el potencial torsional, donde ω es el ángulo de torsión; la altura de barrera V_n , la multiplicidad n y la fase γ determinan su forma periódica. El cuarto término representa los impropios, útiles para imponer geometrías planas o quiralidad, mediante la constante $k_{i,\eta}$ y el valor de equilibrio $\eta_{i,0}$.

Los términos no enlazantes (Kamberaj, 2020) se escriben:

$$U_{\text{nonbonded}} = \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}} \quad (14)$$

Las interacciones no enlazadas se calculan para todos los pares de átomos i, j que están en moléculas diferentes o separados por al menos tres enlaces dentro de la misma molécula. El potencial de Lennard–Jones (parámetros ε_{ij} y σ_{ij}) modela la repulsión de Pauli y la dispersión de London; el término coulombico describe la interacción electrostática entre cargas parciales q_i y q_j .

Integrando los términos enlazantes y no enlazantes obtenemos la energía potencial total $U\{r_i\}$, tal como se muestra en la Ec. 12. Para describir por completo la dinámica del sistema necesitamos, además, la contribución cinética, definida en la Ec. 10. La suma de ambos términos da lugar al *Hamiltoniano*:

$$H = E_k + U = \sum_{i=1}^N \frac{p_i^2}{2m_i} + U(r_j) \quad (15)$$

donde $p_i = m_i v_i$ es el momento lineal del átomo i (Tuckerman, 2023).

El *teorema de equipartición* indica que, en equilibrio térmico clásico, cada grado de libertad (g.d.l.)

contribuye en promedio $\frac{1}{2}k_B T$ a la energía cinética (Pathria & Beale, 2011). Para una partícula aislada:

$$E_k = \frac{1}{2}m(v_x^2 + v_y^2 + v_z^2) = \frac{3}{2}k_B T_{\text{inst}} \quad (16)$$

donde T_{inst} es la *temperatura instantánea*, sujeta a fluctuaciones alrededor del valor objetivo. En un sistema con N partículas, el número efectivo de grados de libertad es $N_{\text{gd}} = 3N - N_{\text{lim}}$, donde N_{lim} recoge las restricciones internas (enlaces fijados, etc.). En las simulaciones descritas se empleó el algoritmo SHAKE para inmovilizar las vibraciones X–H más rápidas; dicho procedimiento no impuso restricciones adicionales relevantes, de modo que tomamos $N_{\text{lim}} \simeq 0$ y, por consiguiente, $N_{\text{gd}} \simeq 3N$.

$$E_k = \sum_{i=1}^N \frac{1}{2}m_i v_i^2 = \frac{1}{2}k_B N_{\text{gd}} T_{\text{inst}} = \frac{3}{2}Nk_B T_{\text{inst}} \quad (17)$$

lo que permite calcular la temperatura instantánea como:

$$T_{\text{inst}} = \frac{2E_k}{3Nk_B} \quad (18)$$

La relación $E_k \leftrightarrow T_{\text{inst}}$ es, por tanto, la variable de control que aprovechan los termostatos: al comparar T_{inst} con la temperatura deseada T_0 , el algoritmo escala o ajusta las velocidades para que el promedio temporal $\langle T_{\text{inst}} \rangle$ reproduzca la distribución canónica (Kamberaj, 2020).

Termostato

Los termostatos son algoritmos que mantienen la temperatura promedio de una simulación en torno a un valor objetivo T_0 . Existen varias estrategias Berendsen, Andersen, Nosé–Hoover, "*velocity rescaling*", entre otras, pero nos centraremos en el **termostato de Langevin**, que combina sencillez de implementación con un control robusto de la temperatura (Schneider & Stoll, 1978; Kamberaj, 2020).

Partimos de la ecuación de movimiento (Ec. 1) y añadimos un término disipativo junto con una fuerza estocástica que satisfacen la relación de fluctuación–disipación:

$$m_i \ddot{\mathbf{r}}_i = -\nabla_i U - m_i \gamma \dot{\mathbf{r}}_i + \mathbf{R}_i(t) \quad (19)$$

donde γ es la *frecuencia de colisión* (ps^{-1}) y $\mathbf{R}_i(t)$ es una fuerza aleatoria de media nula cuya autocor-

rrelación se define como:

$$\langle \mathbf{R}_i(t) \cdot \mathbf{R}_j(t') \rangle = 6 m_i \gamma k_B T_0 \delta_{ij} \delta(t - t') \quad (20)$$

El factor δ_{ij} indica que los impulsos sobre partículas diferentes son independientes, mientras que $\delta(t - t')$ garantiza que el ruido es *blanco* (Dirac, 1927)) (sin memoria temporal). La amplitud $6 m_i \gamma k_B T_0$ asegura que la disipación debida al término de fricción $-m_i \gamma \dot{\mathbf{r}}_i$ quede exactamente compensada, de modo que el sistema converge al equilibrio canónico a la temperatura T_0 . El parámetro γ es, por tanto, el único grado de libertad del termostato de Langevin.

Presión

Para mantener la presión promedio en un valor objetivo P_0 se introduce un *barostato*. De entre los muchos algoritmos disponibles (Parrinello–Rahman, Martyna–Tobias–Klein, Monte Carlo de volumen, etc.), se enfocara en el **barostato de Berendsen** con escalado de posiciones *isotrópico* (Berendsen et al., 1984).

El barostato de Berendsen modela la variación de volumen como un proceso de *relajación exponencial* hacia la presión deseada P_0 :

$$\frac{dV}{dt} = \frac{1}{\tau_P} (P - P_0) V \quad (21)$$

donde P es la presión instantánea y τ_P es el *tiempo de acoplamiento*. Si $P > P_0$ el volumen aumenta (la presión disminuye), si $P < P_0$ el volumen disminuye. La solución de (21) es $V(t) = V_0 \exp[-(t/\tau_P)(P - P_0)/P_0]$, lo que muestra la relajación exponencial en un tiempo τ_P .

En integración discreta se introduce el factor:

$$\mu = \left[1 + \frac{\Delta t}{\tau_P} (P - P_0) \right]^{1/3} \quad (22)$$

derivado de integrar (21) en un paso Δt y de que $V \propto L^3$ (siendo L una longitud característica de la caja). Multiplicar todas las coordenadas por μ escala el sistema de forma *isotrópica*, manteniendo las posiciones relativas y ajustando el volumen para acercar la presión a P_0 .

La presión se calcula mediante la traza del *tensor de virial*, que combina la contribución cinética (debida

al movimiento térmico) y la contribución potencial (debida a las fuerzas internas):

$$P = \frac{2E_k}{3V} - \frac{1}{3V} \sum_{i<j} \mathbf{r}_{ij} \cdot \mathbf{F}_{ij} \quad (23)$$

donde $E_k = \frac{1}{2} \sum_i m_i v_i^2$ es la energía cinética total y el segundo término representa la *virial mecánica*, el producto escalar $\mathbf{r}_{ij} \cdot \mathbf{F}_{ij}$ mide cuánto empujan (o tiran) los átomos j sobre los i en la dirección que los separa, la suma sobre todas las parejas y la división por $3V$ proporcionan la presión isotrópica del sistema.

Con el termostato de Langevin se fija la temperatura T y, mediante el barostato de Berendsen, se mantiene la presión promedio en un valor objetivo P_0 . Bajo estas condiciones la trayectoria de dinámica molecular muestrea el **ensamble isobárico–isotérmico** (N, P, T) , cuya magnitud termodinámica fundamental es la *energía libre de Gibbs* G .

En NPT la normalización de la distribución de Boltzmann incluye una integración sobre todos los volúmenes posibles, ponderada por el trabajo PV :

$$\Delta(N, P, T) = \frac{1}{N! h^{3N}} \int_0^\infty dV e^{-\beta PV} \int d^{3N} p d^{3N} r e^{-\beta H(\mathbf{p}, \mathbf{r}; V)}, \quad \beta = \frac{1}{k_B T} \quad (24)$$

en donde el factor $1/N!$ corrige el doble conteo de microestados debido a la indistinguibilidad de las partículas (corrección de Gibbs), h^{3N} convierte la antigua suma cuántica sobre niveles discretos en una integral clásica adimensional, la primera integración, $\int_0^\infty dV e^{-\beta PV}$, recorre todos los volúmenes posibles y pondera cada uno según el trabajo de compresión o expansión contra la presión externa P , la doble integral subsiguiente sobre momentos y posiciones, $\int d^{3N} p d^{3N} r e^{-\beta H}$, contabiliza el peso de Boltzmann de cada microestado para un volumen fijo e incluye tanto la parte cinética como el potencial U dentro del Hamiltoniano $H(\mathbf{p}, \mathbf{r}; V) = \sum_i p_i^2 / (2m_i) + U(r_j; V)$, finalmente, $\beta = 1/(k_B T)$ es el inverso de la energía térmica, con k_B la constante de Boltzmann.

El potencial conjugado al par de variables (P, T) es la energía libre de Gibbs:

$$G(N, P, T) = -k_B T \ln \Delta(N, P, T) \quad (25)$$

Esta función alcanza su mínimo en equilibrio a temperatura y presión constantes (Kamberaj, 2020; Pathria & Beale, 2011).

Periodicidad

En dinámica molecular se trabaja dentro de una **caja** delimitada por el intervalo $[0, L]$ en las tres coordenadas cartesianas. Esa caja se replica periódicamente formando una red infinita; así, cada partícula tiene imágenes idénticas en todas las celdas vecinas. Cuando, durante la simulación, una molécula abandona la caja central, la imagen correspondiente entra por la cara opuesta, de modo que el número de partículas y la densidad permanecen constantes. La caja no es más que un sistema de referencia conveniente para registrar las coordenadas de las N partículas y, al mismo tiempo, eliminar efectos de borde: al calcular distancias se toma siempre la *mínima imagen* entre dos partículas, garantizando que cada par interactúe una sola vez.

Solvatación

Para representar correctamente un sistema biológico, la caja periódica se rellena con moléculas de solvente que imitan el entorno experimental, evitando vacíos que darían lugar a efectos electrostáticos. Se utiliza agua explícita donde se emplean modelos parametrizados que reproducen propiedades como la densidad, el calor de vaporización y la constante dieléctrica. Entre los más utilizados se encuentran TIP3P, SPC/E (ambos de tres sitios) y TIP4P/Ew, que añade un “sitio fantasma” para mejorar la distribución de cargas, con el fin de rodear el soluto con un colchón de agua suficientemente grueso para que, al aplicar las condiciones periódicas, las interacciones entre una molécula y sus propias imágenes queden amortiguadas por el solvente.

2.2. Teoría Cuántica

En la primera parte de este capítulo se describe un sistema con las leyes de la mecánica clásica, basta integrar las ecuaciones de Newton junto con un potencial empírico para seguir la trayectoria de miles de átomos. Dicho enfoque es idóneo para procesos dominados por el movimiento nuclear, pero oculta la física de los electrones. Para acceder a propiedades puramente electrónicas como lo son energías de enlace, barreras de reacción, espectros, distribuciones de carga o polarizabilidades necesitamos trabajar desde los *primeros principios*, es decir, partir de la ecuación de Schrödinger y del Hamiltoniano cuántico

que incluye toda la interacción Coulomb entre electrones y núcleos.

La ecuación de Schrödinger independiente del tiempo se escribe:

$$\hat{H}\psi = E\psi \quad (26)$$

Para un sistema con M núcleos y N electrones la ecuación explícita se convierte en:

$$\hat{H}\psi_i(\mathbf{x}_1, \dots, \mathbf{x}_N; \mathbf{R}_1, \dots, \mathbf{R}_M) = E_i\psi_i(\mathbf{x}_1, \dots, \mathbf{x}_N; \mathbf{R}_1, \dots, \mathbf{R}_M) \quad (27)$$

donde $\mathbf{x}_i = (\mathbf{r}_i, \sigma_i)$ combina la coordenada espacial y el espín del electrón i .

La ecuación 28 describe el Hamiltoniano (\hat{H}) cuántico (unidades atómicas, sin campos externos) es:

$$\hat{H} = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 - \frac{1}{2} \sum_{A=1}^M \frac{1}{M_A} \nabla_A^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i<j}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A<B}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (28)$$

cuyos términos corresponden, respectivamente, a la energía cinética de los electrones (\hat{T}_e), la energía cinética nuclear (\hat{T}_N), la atracción núcleo–electrón (\hat{V}_{Ne}), la repulsión electrón–electrón (\hat{V}_{ee}) y la repulsión núcleo–núcleo (\hat{V}_{NN}).

El grado de complejidad cuántico supera con creces al problema clásico de N -cuerpos, la función de onda depende de $3N$ coordenadas electrónicas espaciales, N variables electrónicas de espín y $3M$ coordenadas electrónicas nucleares. Resolver la ecuación de Schrödinger *exactamente* es factible únicamente para el átomo de hidrógeno, para cualquier sistema mayor se requieren aproximaciones sistemáticas, la más importante es la **aproximación de Born–Oppenheimer** (Szabo & Ostlund, 1996).

La clave es comparar las masas (y, por tanto, las velocidades) de núcleos y electrones, los núcleos son miles de veces más pesados, de modo que su movimiento es, en primera aproximación, cuasiestático frente al movimiento electrónico. Si se congelan las posiciones nucleares, la energía cinética nuclear \hat{T}_N se anula y la repulsión núcleo–núcleo \hat{V}_{NN} se vuelve un constante aditiva. El Hamiltoniano completo (Ec. 28) se reduce entonces al *Hamiltoniano electrónico*:

$$\hat{H}_{\text{elec}} = \underbrace{\hat{T}_e}_{\text{cinética electrónica}} + \underbrace{\hat{V}_{Ne}}_{\text{atracción núcleo–electrón}} + \underbrace{\hat{V}_{ee}}_{\text{repulsión electrón–electrón}} \quad (29)$$

y la ecuación de Schrödinger pasa a:

$$[\hat{T}_e + \hat{V}_{Ne} + \hat{V}_{ee}] \psi_{\text{elec}} = E_{\text{elec}} \psi_{\text{elec}} \quad (30)$$

donde ψ_{elec} depende explícitamente de las coordenadas electrónicas y sólo *paramétricamente* de las posiciones nucleares. Para un conjunto dado de núcleos fijos, la energía total se obtiene añadiendo la repulsión entre núcleos:

$$E_{\text{nuc}} = \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (31)$$

de modo que:

$$E_{\text{tot}} = E_{\text{elec}} + E_{\text{nuc}} \quad (32)$$

Resuelto el problema electrónico para un conjunto fijo de coordenadas nucleares $\{\mathbf{R}_A\}$, la energía total $E_{\text{tot}}(\{\mathbf{R}_A\}) = E_{\text{elec}}(\{\mathbf{R}_A\}) + E_{\text{nuc}}(\{\mathbf{R}_A\})$ define la *superficie de energía potencial* sobre la que se mueven los núcleos. Su dinámica se rige por el Hamiltoniano nuclear:

$$\hat{H}_{\text{nuc}} = -\frac{1}{2} \sum_{A=1}^M \frac{1}{M_A} \nabla_A^2 + E_{\text{tot}}(\{\mathbf{R}_A\}) \quad (33)$$

cuyo operador cinético actúa sólo sobre los núcleos y cuyo término potencial es la superficie obtenida en la ecuación 33.

La función de onda nuclear $\psi_{\text{nuc}}(\{\mathbf{R}_A\})$ satisface:

$$\hat{H}_{\text{nuc}} \psi_{\text{nuc}} = E \psi_{\text{nuc}} \quad (34)$$

Dentro de la aproximación Born–Oppenheimer la función de onda completa se separa como el producto de la parte electrónica y la nuclear:

$$\Psi(\{\mathbf{r}_i\}; \{\mathbf{R}_A\}) = \psi_{\text{elec}}(\{\mathbf{r}_i\}; \{\mathbf{R}_A\}) \psi_{\text{nuc}}(\{\mathbf{R}_A\}) \quad (35)$$

Con esta descomposición se tratan, de manera jerárquica, primero los electrones (rápidos) y después los núcleos (lentos), reduciendo drásticamente la complejidad del problema cuántico total.

Para incorporar el espín, cada electrón se describe mediante la coordenada generalizada $\mathbf{x} = \{\mathbf{r}, s\}$,

donde \mathbf{r} es la posición y s el espín. La densidad de probabilidad conjunta es:

$$|\Psi(\mathbf{x}_1, \dots, \mathbf{x}_N)|^2 d\mathbf{x}_1 \cdots d\mathbf{x}_N \quad (36)$$

que debe permanecer *invariante* al intercambiar dos electrones, ya que son partículas indistinguibles. Para fermiones, la forma más sencilla de garantizar esa invarianza es exigir que la función de onda cambie de signo tras un intercambio:

$$\Psi(\dots, \mathbf{x}_i, \mathbf{x}_j, \dots) = -\Psi(\dots, \mathbf{x}_j, \mathbf{x}_i, \dots) \quad (37)$$

Esta condición de **antisimetría** implica que dos electrones con el mismo espín no pueden ocupar simultáneamente el mismo estado espacial. En consecuencia, cualquier solución de la ecuación de Schrödinger para electrones debe satisfacer a la vez $\hat{H}\Psi = E\Psi$ y la propiedad antisimétrica mostrada en la ecuación 37.

Calcular las eigenfunciones ψ_i y eigenvalores E_i exactos de \hat{H} es, salvo para sistemas muy simples, inabordable. El **principio variacional** ofrece una vía práctica, se elige una función de prueba ψ_{trial} (normalizable, continua y cuadrado-integrable) y se evalúa:

$$E_{\text{trial}} = \frac{\langle \psi_{\text{trial}} | \hat{H} | \psi_{\text{trial}} \rangle}{\langle \psi_{\text{trial}} | \psi_{\text{trial}} \rangle} \quad (38)$$

lo que garantiza el límite superior:

$$E_{\text{trial}} \geq E_0 \quad (39)$$

siendo E_0 la energía del estado fundamental y $E_{\text{trial}} = E_0$ sólo cuando $\psi_{\text{trial}} = \psi_0$ Szabo & Ostlund (1996).

En la práctica se restringe ψ_{trial} a un *subespacio* manejable, la minimización de E_{trial} dentro de ese subespacio produce la mejor aproximación posible al verdadero estado base. El esquema más extendido que sigue esta filosofía es el método *ab initio* de Hartree-Fock, punto de partida de técnicas post-HF y siendo la implementación más práctica la teoría del funcional de la densidad (DFT).

Aproximación Hartree–Fock

La aproximación Hartree–Fock (HF) busca la mejor función de onda monodeterminante dentro del determinante de Slater (Löwdin, 1955), garantizando la antisimetría exigida por el principio de exclusión de Pauli. La función de onda se construye como:

$$\Psi_{\text{HF}} = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \phi_1(\mathbf{x}_1) & \cdots & \phi_N(\mathbf{x}_1) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \phi_1(\mathbf{x}_N) & \cdots & \phi_N(\mathbf{x}_N) \end{vmatrix} \quad (40)$$

donde cada orbital molecular $\phi_i(\mathbf{x})$ combina coordenadas espaciales y de espín, y se expande en un conjunto finito de funciones base $\{\chi_\mu(\mathbf{r})\}$:

$$\phi_i(\mathbf{r}) = \sum_{\mu} c_{\mu i} \chi_{\mu}(\mathbf{r}) \quad (41)$$

Al aplicar el principio variacional $\delta\langle\Psi|\hat{H}|\Psi\rangle = 0$ sujeto a la ortonormalidad de los orbitales, se derivan las *ecuaciones de Hartree–Fock*:

$$\hat{F}[\{\phi_j\}] \phi_i = \varepsilon_i \phi_i \quad (42)$$

El *operador de Fock* \hat{F} reúne tres contribuciones fundamentales, el operador cinético electrónico \hat{T}_e y el potencial núcleo–electrón \hat{V}_{Ne} , que representan respectivamente la energía cinética de cada electrón y su atracción por los núcleos, el potencial de Hartree:

$$V_H(\mathbf{r}) = \int \frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' \quad (43)$$

que describe la repulsión clásica de Coulomb debida a la densidad electrónica total $\rho(\mathbf{r})$, y el operador de intercambio:

$$\hat{K}_i \phi_i(\mathbf{r}) = \sum_{j=1}^N \phi_j(\mathbf{r}) \int \frac{\phi_j^*(\mathbf{r}') \phi_i(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' \quad (44)$$

que corrige el sobre conteo del término de Hartree al imponer la antisimetría de la función de onda.

Al proyectar \hat{F} en la base de funciones $\{\chi_\mu\}$ se obtiene un problema generalizado de autovalores.

$$\sum_{\nu} F_{\mu\nu} c_{\nu i} = \varepsilon_i \sum_{\nu} S_{\mu\nu} c_{\nu i}, \quad S_{\mu\nu} = \langle\chi_\mu|\chi_\nu\rangle \quad (45)$$

donde la matriz de Fock $F_{\mu\nu} = \langle\chi_\mu|\hat{F}|\chi_\nu\rangle$ codifica toda la física anterior y la matriz de solapamientos

$S_{\mu\nu}$ refleja la no ortonormalidad de la base si existe.

Finalmente, la energía total de Hartree–Fock se escribe como:

$$E_{\text{HF}} = \sum_{i=1}^N \langle \phi_i | \hat{T}_e + \hat{V}_{Ne} | \phi_i \rangle + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N (\langle ij | ij \rangle - \langle ij | ji \rangle) \quad (46)$$

donde $\langle ij | kl \rangle = \int \int \chi_i^*(\mathbf{r}) \chi_k(\mathbf{r}) |\mathbf{r} - \mathbf{r}'|^{-1} \chi_j^*(\mathbf{r}') \chi_l(\mathbf{r}') \, d\mathbf{r} \, d\mathbf{r}'$ son las integrales de repulsión electrón–electrón en la base de expansión. Aquí, el primer término suma las energías cinéticas y de atracción núcleo–electrón de cada orbital, mientras el doble sumatorio incorpora la repulsión clásica (Hartree) y la corrección de intercambio que anula la auto-interacción.

Conjunto de Bases

La calidad de la solución depende críticamente del *conjunto de bases*: un espacio finito de funciones $\{\chi_\mu\}$ debe aproximar la riqueza de la función de onda real. Las bases gaussianas se construyen a partir de primitivas $e^{-\alpha|\mathbf{r}-\mathbf{R}|^2}$ agrupadas en contracciones para equilibrar precisión y coste. Incluir funciones de mayor angularidad (polarización) y de exponente pequeño (difusas) amplía la flexibilidad de la base, mejorando la descripción de enlaces, cargas y correlación a costa de un incremento en el número de coeficientes $c_{\mu i}$ y, por tanto, en el coste computacional (Hehre et al., 1969).

En última instancia, el tamaño y la composición del conjunto de bases determinan la exactitud de la energía y propiedades optimizadas por el SCF, una base demasiado reducida introduce errores sistemáticos de *incompletitud*, mientras que una sobredimensionada puede conducir a redundancias y aumento excesivo del coste numérico.

Hasta ahora hemos aproximado la energía del sistema mediante funciones de onda que dependen explícitamente de las N partículas, cada electrón añade tres coordenadas espaciales más una variable de espín, de modo que Ψ vive en un espacio de $4N$ dimensiones. Para sistemas poliatómicos el tamaño de ese espacio crece tan rápido que resulta inviable determinar Ψ con métodos exactos o incluso con aproximaciones de alto nivel.

2.2.1. Teoría del funcional de la densidad

La **teoría del funcional de la densidad** (DFT) esquiva este cuello de botella cambiando la variable fundamental, en lugar de trabajar con la función de onda $\Psi(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N)$, se emplea la *densidad electrónica* $\rho(\mathbf{r})$, que sólo depende de tres coordenadas espaciales.

La densidad electrónica $\rho(\mathbf{r})$ representa la probabilidad de hallar un electrón en el elemento de volumen situado en \mathbf{r} . Se obtiene integrando el cuadrado de la función de onda sobre todas las coordenadas de espín y sobre las $N - 1$ coordenadas espaciales restantes:

$$\rho(\mathbf{r}) = N \int \cdots \int |\Psi(\mathbf{r}, \sigma_1; \mathbf{x}_2, \dots, \mathbf{x}_N)|^2 d\sigma_1 d\mathbf{x}_2 \cdots d\mathbf{x}_N \quad (47)$$

donde $\mathbf{x}_i = (\mathbf{r}_i, \sigma_i)$ combina posición y espín del electrón i . El factor N compensa la indistinguibilidad de los electrones: dado que cualquiera de ellos puede ocupar el punto \mathbf{r} , multiplicar por N convierte la “probabilidad de un electrón particular” en la probabilidad total de encontrar *algún* electrón en ese volumen. Así, $\rho(\mathbf{r})$ condensa toda la información relevante para DFT en una función que depende únicamente de las tres coordenadas espaciales.

Teoremas Hohenberg-Kohn

Al adoptar la densidad electrónica $\rho(\mathbf{r})$ como variable fundamental, Hohenberg y Kohn establecieron los pilares de la teoría del funcional de la densidad (DFT) (Hohenberg & Kohn, 1964). Sus resultados se condensan en dos teoremas:

1. **Teorema 1 (unicidad).** Dada una densidad $\rho(\mathbf{r})$ que corresponde a un estado fundamental no degenerado, existe *un único* potencial externo $V_{\text{ext}}(\mathbf{r})$ que genera esa densidad. En consecuencia, $\rho(\mathbf{r})$ determina de forma unívoca la función de onda del estado base Ψ_0 y todas las propiedades observables.
2. **Teorema 2 (principio variacional).** Para cualquier densidad admisible $\tilde{\rho}(\mathbf{r})$ se cumple:

$$E[\tilde{\rho}] \geq E[\rho_0]$$

donde $E[\rho]$ es el funcional de energía total y ρ_0 la densidad exacta del estado fundamental. La minimización de $E[\rho]$ sobre todas las densidades normalizadas devuelve simultáneamente la energía mínima E_0 y la densidad ρ_0 .

El segundo teorema extiende el principio variacional ya comentado para funciones de onda, ahora se busca la densidad $\tilde{\rho}$ que haga mínimo $E[\rho]$ en lugar de la función de onda que minimice $\langle \Psi | \hat{H} | \Psi \rangle$. Así, la densidad de prueba fija un límite superior para la energía exacta, proporcionando una ruta práctica para aproximar el estado fundamental sin manejar directamente la función de onda multielectrónica.

Sin embargo, se desconoce la forma exacta de la energía cinética y, en particular, resulta difícil construir buenas aproximaciones para ella.

Apoyándose en los teoremas de Hohenberg–Kohn, Kohn y Sham propusieron reemplazar el problema real de N electrones interactuantes por un *sistema auxiliar* de electrones independientes que reproduce la misma densidad $\rho(\mathbf{r})$ (Kohn & Sham, 1965). La energía electrónica se escribe como:

$$E[\rho] = T_s[\rho] + J[\rho] + E_{xc}[\rho] + \int \rho(\mathbf{r}) V_{\text{ext}}(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (48)$$

donde $T_s[\rho]$ es la energía cinética de electrones *no interactuantes* (muy parecida a la cinética de Hartree–Fock, pero evaluada con orbitales de Kohn–Sham), $J[\rho] = \frac{1}{2} \iint \rho(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r}')/|\mathbf{r} - \mathbf{r}'| d\mathbf{r} d\mathbf{r}'$ es la repulsión de Coulomb clásica, conocida exactamente, $E_{xc}[\rho]$ contiene *todo lo demás*, la diferencia entre T real y T_s más los efectos de intercambio y correlación que Hartree–Fock no capta.

Minimizando $E[\rho]$ con la restricción de normalización ($\int \rho = N$) se obtienen las **ecuaciones de Kohn–Sham**:

$$\left[-\frac{1}{2}\nabla^2 + V_{\text{ext}}(\mathbf{r}) + V_H(\mathbf{r}) + V_{xc}(\mathbf{r}) \right] \varphi_i(\mathbf{r}) = \varepsilon_i \varphi_i(\mathbf{r}) \quad (49)$$

donde $V_H(\mathbf{r}) = \int \rho(\mathbf{r}')/|\mathbf{r} - \mathbf{r}'| d\mathbf{r}'$ y $V_{xc}(\mathbf{r}) = \delta E_{xc}[\rho]/\delta \rho(\mathbf{r})$ son, respectivamente, los potenciales de Hartree y de intercambio–correlación. Las orbitales $\{\varphi_i\}$ generan la densidad $\rho(\mathbf{r}) = \sum_i^{\text{ocupados}} |\varphi_i(\mathbf{r})|^2$, cerrando el ciclo auto-consistente (SCF).

El principal logro de Kohn y Sham y la base de la DFT es la incorporación de energías desconocidas en esta única energía de intercambio y correlación. De hecho, si se conoce exactamente E_{xc} , es posible conocer la energía exacta del sistema. Hasta ahora no es posible saber la E_{xc} exacta, sin embargo, al agruparla, puedes trabajar con aproximaciones específicas para una mejor estimación.

Aproximación de la densidad local (LDA)

El supuesto básico es que cada punto del sistema se comporta como un *gas electrónico homogéneo*, la energía de intercambio–correlación se expresa como:

$$E_{xc}^{\text{LDA}}[\rho] = \int \rho(\mathbf{r}) \varepsilon_{xc}(\rho(\mathbf{r})) d\mathbf{r} \quad (50)$$

con $\varepsilon_{xc} = \varepsilon_x + \varepsilon_c$. La parte de *intercambio* es conocida de forma exacta:

$$\varepsilon_x(\rho) = -\frac{3e^2}{4} \left(\frac{3}{\pi}\right)^{1/3} \rho^{4/3}, \quad (51)$$

mientras que ε_c se tabula a partir de cálculos de Monte Carlo cuántico para el gas uniforme (Perdew & Wang, 1992).

Aproximación de gradiente generalizado (GGA)

Para introducir la *no homogeneidad* de la densidad, los funcionales GGA incorporan el gradiente $\nabla\rho$:

$$E_{xc}^{\text{GGA}}[\rho] = \int \varepsilon_{xc}(\rho(\mathbf{r}), \nabla\rho(\mathbf{r})) d\mathbf{r} \quad (52)$$

Diferentes elecciones de ε_{xc} originan los funcionales más usados en química computacional, PBE (Perdew et al., 1996), BLYP, PW91, etc. La inclusión del gradiente mejora energías de disociación, geometrías y constantes de red respecto a LDA, manteniendo un coste computacional comparable.

En un sólido periódico el número de electrones es finito dentro de la *celda unidad*, la dificultad proviene de que la red se repite infinitamente. El **teorema de Bloch** permite separar ese problema infinito en bloques manejables, para cada vector de onda \mathbf{k} del primer irreducible de Brillouin, la función de onda adopta la forma:

$$\psi_{n\mathbf{k}}(\mathbf{r}) = u_{n\mathbf{k}}(\mathbf{r}) e^{i\mathbf{k}\cdot\mathbf{r}} \quad (53)$$

donde $u_{n\mathbf{k}}(\mathbf{r})$ tiene la periodicidad de la red (Bloch, 1929).

La parte periódica se desarrolla en *ondas planas* de la red recíproca:

$$u_{n\mathbf{k}}(\mathbf{r}) = \sum_{\mathbf{G}} C_{n,\mathbf{k}+\mathbf{G}} e^{i\mathbf{G}\cdot\mathbf{r}} \quad \Longrightarrow \quad \psi_{n\mathbf{k}}(\mathbf{r}) = \sum_{\mathbf{G}} C_{n,\mathbf{k}+\mathbf{G}} e^{i(\mathbf{k}+\mathbf{G})\cdot\mathbf{r}} \quad (54)$$

El conjunto $\{\mathbf{G}\}$ es infinito, pero las amplitudes con alta energía cinética, $\frac{\hbar^2}{2m_e} |\mathbf{k}+\mathbf{G}|^2$, aportan poco a la energía total. Se introduce un *energy cutoff* E_c y se conservan sólo los \mathbf{G} que satisfacen $\frac{\hbar^2}{2m_e} |\mathbf{k}+\mathbf{G}|^2 < E_c$. Así la base de ondas planas se vuelve finita y sistemáticamente convergente, aumentar E_c incrementa

el número de funciones y mejora la precisión. El número continuo de puntos- \mathbf{k} se sustituye por una malla finita (Monkhorst–Pack), aumentar la densidad de esa malla mejora las integraciones en espacio recíproco con coste controlable.

En los cálculos con ondas planas la eficiencia está limitada por el *cutoff* de energía necesario para describir las oscilaciones rápidas de los orbitales *core* cerca del núcleo. La solución práctica es sustituir el potencial coulombiano exacto y las funciones de onda fuertemente nodales por un **pseudopotencial** que reproduce con fidelidad el comportamiento de valencia pero es suave en la región interna:

$$\hat{H}_{\text{all-electron}} \implies \hat{H}_{\text{pseudo}} = -\frac{1}{2}\nabla^2 + V_{\text{pseudo}}(\mathbf{r}) \quad (55)$$

Un pseudopotencial de calidad debe cumplir, para $r > r_c$ (radio de corte) la pseudo-función de onda coincide con la función *all-electron* en fase y amplitud. Conserva las fases de dispersión (mismo *scattering* que el potencial verdadero) para cada canal angular l . Produce la misma carga total Z_{core} dentro de r_c (*norm-conserving*). Donde los más utilizados son Norm-conserving (Hamann–Schlüter–Chiang, Troullier–Martins) (Hamann et al., 1979), ultrasoft (Vanderbilt) (Vanderbilt, 1990), PAW (Projector Augmented-Wave) (Blöchl, 1994).

Al igual que en las simulaciones de dinámica molecular, los cálculos DFT con ondas planas y pseudopotenciales se realizan bajo **condiciones periódicas de frontera**. La celda unitaria se replica infinitamente en las tres direcciones del espacio y, gracias al teorema de Bloch, las funciones de onda se representan mediante un conjunto finito de puntos \mathbf{k} en el primer Brillouin. Para sistemas aislados (moléculas, superficies) se emplea una supercelda lo bastante grande para que las interacciones entre cada entidad y sus imágenes periódicas queden despreciadas, preservando así la validez de los resultados.

2.2.2. Teoría Híbrida

Anteriormente analizamos las teorías clásica y cuántica en simulaciones computacionales. Aunque cada una tiene sus ventajas, su verdadero potencial radica en combinarlas en una sola simulación, lo que se conoce como *QM/MM*. En este enfoque, la mayor parte de la caja se trata con mecánica molecular (MM) y una pequeña región activa se describe con métodos cuánticos (QM).

En el esquema QM/MM el sistema se particiona en dos dominios complementarios, la *región cuántica* (QM), donde ocurre la química de interés, y la *región clásica* (MM), que aporta el entorno estructural

y dinámico (Warshel & Levitt, 1976; Field et al., 1990). La región QM, limitada por criterios químicos (sitio reactivo, enlaces a formar/romper) y computacionales (suele contener decenas o pocos cientos de átomos), mientras que la región MM abarca el resto (proteína, disolvente, cristal) y se describe con un campo de fuerza paramétrico (Groenhof, 2013).

Formalmente, si $\{\mathbf{R}_{QM}\}$ y $\{\mathbf{R}_{MM}\}$ son las coordenadas atómicas de las regiones QM y MM, la energía total se expresa como:

$$E_{\text{tot}} = E_{QM}[\{\mathbf{R}_{QM}\}] + E_{MM}(\{\mathbf{R}_{MM}\}) + E_{QM/MM}(\{\mathbf{R}_{QM}\}, \{\mathbf{R}_{MM}\}) \quad (56)$$

donde $E_{QM/MM}$ agrupa las interacciones cruzadas (electrostáticas, van der Waals, etc.) entre ambas regiones (Senn & Thiel, 2009). Este término de acoplamiento $E_{QM/MM}$ en la Ec 56 se descompone según el esquema de "embedding" elegido.

"Embedding" mecánico. Las interacciones QM–MM se tratan exclusivamente a nivel clásico: se incluyen únicamente términos de van der Waals y de Coulomb clásico entre átomos de QM y MM, usando las cargas puntuales de MM como fuentes externas que no alteran el Hamiltoniano QM (Olsen et al., 2015). Este esquema es sencillo y estable, pero no permite la polarización de la región cuántica por el entorno.

"Embedding" electrostático. Aquí, las cargas puntuales de MM se incorporan directamente al Hamiltoniano QM como:

$$V_{\text{embed}}(\mathbf{r}) = \sum_{J \in MM} \frac{q_J}{|\mathbf{r} - \mathbf{R}_J|}$$

de modo que el campo eléctrico del entorno polariza la densidad electrónica QM (Olsen et al., 2015). Este método mejora la descripción de interacciones electrostáticas sin aumentar demasiado el coste computacional.

"Embedding" polarizable. En el nivel más avanzado, la región MM responde de forma dinámica a los cambios electrónicos de QM mediante dipolos inducidos o multipolos autoconsistentes con la densidad $\rho(\mathbf{r})$ (Bondanza et al., 2020). Así, tanto QM polariza a MM como MM polariza a QM. Cuando la partición QM/MM corta un enlace covalente, es necesario "cerrar" la región QM de modo que la frontera no introduzca problemas. Los dos métodos más habituales son:

"Link-atom" (átomo enlace). Se sustituye el fragmento de enlace cortado por un átomo ligero (habitualmente hidrógeno) que "enlaza" al átomo QM con el entorno MM (Groenhof, 2013). El átomo MM vecino proporciona sólo las fuerzas estéricas y electrostáticas, mientras que el enlace QM–H enlazado se

parametriza para reproducir la geografía electrónica original.

"Frozen-orbital" o "pseudobond". En lugar de añadir un átomo extra, se conserva un orbital(s) de enlace precomputado en la frontera y se "congela" durante el cálculo QM, de modo que el resto de la molécula MM se comporta como si el enlace siguiera intacto (Philipp & Friesner, 1999; Gao et al., 1998). Alternativamente, se usan *pseudobonds* con potenciales suaves que emulan la densidad electrónica del enlace original.

Las distintas estrategias de "*embedding*" y el tratamiento de fronteras covalentes se reflejan directamente en la forma del Hamiltoniano QM/MM. Partiendo del Hamiltoniano cuántico puro \hat{H}_{QM} y del Hamiltoniano clásico \hat{H}_{MM} , el operador total se construye como:

$$\hat{H}_{\text{QM/MM}} = \hat{H}_{\text{QM}} + \hat{H}_{\text{MM}} + \hat{V}_{\text{QM/MM}} \quad (57)$$

Donde el Hamiltoniano QM–MM híbrido se construye partiendo del Hamiltoniano electrónico $\hat{H}_{\text{QM}} = \hat{T}_e + \hat{V}_{Ne} + \hat{V}_{ee}$, al que se añade un término de "*embedding*" que puede incluir cargas puntuales de MM ("embedding" electrostático), o dipolos inducidos ("embedding" polarizable) (Senn & Thiel, 2009). El Hamiltoniano de la región clásica corresponde al de la mecánica molecular, \mathcal{H}_{MM} . Por su parte, el término de acoplamiento $\hat{V}_{\text{QM/MM}}$ recoge las interacciones cruzadas no incluidas en el término de incrustación, como las interacciones de van der Waals tratadas clásicamente y las correcciones de frontera cuando se cortan enlaces covalentes de forma clásica (*link atoms* o *frozen orbitals*) (Groenhof, 2013; Philipp & Friesner, 1999; Gao et al., 1998). En un esquema de incrustación mecánica, las interacciones electrostáticas entre las regiones QM y MM no se acoplan explícitamente al Hamiltoniano cuántico (se tratan a nivel MM), mientras que en incrustación electrostática sí se incorporan en $\hat{V}_{\text{QM/MM}}$.

En la práctica, durante un ciclo SCF/MD, \hat{H}_{QM} se actualiza cada paso con la posición actual de los átomos MM, se resuelve para obtener E_{QM} y fuerzas $\{\mathbf{F}_i\}$, luego se evalúa E_{MM} y $\hat{V}_{\text{QM/MM}}$ para integrar las ecuaciones de movimiento de toda la caja. De este modo, el Hamiltoniano híbrido captura de forma coherente la estructura electrónica local y las dinámicas clásicas del entorno a coste controlable.

La complejidad de los métodos *ab initio* motiva el uso de aproximaciones semiempíricas, que reducen drásticamente el coste computacional a cambio de parametrizar parte del Hamiltoniano electrónico. En estos esquemas se omiten o combinan ciertos integrales electrón–electrón difíciles de evaluar y se sustituyen por constantes empíricas ajustadas para reproducir datos experimentales (energías de enlace, geometrías, momentos dipolares) o resultados de cálculos de alto nivel.

En la práctica, el Hamiltoniano semiempírico conserva la forma general de Hartree–Fock, pero simplifica los términos de repulsión de dos y cuatro centros, de modo que la evaluación de la energía y las fuerzas escala casi linealmente con el tamaño del sistema Stewart (1989). Los parámetros (exponentes gaussianos, coeficientes de contracción, constantes de interacción) se optimizan por mínimos cuadrados sobre un amplio conjunto de moléculas de referencia, garantizando precisión razonable (5–10 kcal/mol) para química orgánica y bioquímica Dewar & Thiel (1977).

Entre los métodos más utilizados se cuentan MNDO, AM1, PM3 y sus sucesores PM6 y RM1. Cada variante difiere en el nivel de simplificación de los integrales y en la selección de datos de ajuste, ofreciendo compromisos entre rapidez y fidelidad.

Capítulo 3. Metodología

3.1. Modelado y optimización de los compuestos candidatos a fármacos

Los compuestos CIDs y AIDs se modelaron a partir de los esquemas 2D (Figura 4 y Figura 5 de la sección Sección 1.1) y se ajustaron sus cargas de acuerdo con el estado iónico de cada uno. Posteriormente, se optimizaron geoméricamente mediante cálculos de primeros principios basados en la teoría del funcional de la densidad (DFT) con QUICK-24.03, usando el funcional híbrido B3LYP y la corrección de dispersión de Grimme D3 (Shajan et al., 2023; Raubenolt et al., 2021; Manathunga et al., 2020, 2023; Miao & Merz Jr, 2015; Kastner et al., 2009). Para ello se empleó el conjunto de bases 6-311G** y se estableció un criterio de convergencia de la energía de 10^{-6} a.u.

Utilizando VASP (Kresse & Furthmüller, 1996) se calcularon los mapas de potencial electrostático. Para ello se aplicó la aproximación del gradiente generalizado (GGA) con el funcional PBE Perdew et al. (1996), en modo de precisión "Accurate", usando un ensanchamiento gaussiano de 0.01 eV. La optimización estructural se realizó manteniendo fija la celda unitaria y relajando solo las posiciones atómicas, con un corte de energía de 450 eV y hasta 500 pasos iónicos; el algoritmo RMM-DIIS alcanzó la convergencia cuando la variación en el bucle de autoconsistencia electrónica fue menor a 10^{-4} , permitiéndose un máximo de 600 iteraciones.

Las interacciones de van der Waals se incluyeron mediante el método DFT-D3 de Grimme con amortiguamiento cero (Grimme et al., 2010). Para evitar interacciones espurias entre imágenes periódicas, se aplicó un vacío de 20 Å en cada dirección y se utilizó una malla de k -puntos $1 \times 1 \times 1$ centrada en Γ (Monkhorst & Pack, 1976).

3.2. Selección y preparación de la estructura de la NS3-helicasa

Para seleccionar la estructura de la helicasa NS3 del virus del Zika, se realizó una búsqueda en la **RCSB Protein Data Bank** (<http://www.rcsb.org/>) (Berman et al., 2000; Burley et al., 2025) buscando entradas que incluyeran dos ligandos; la molécula de ATP y un ion Mn^{2+} . La estructura elegida corresponde al PDB ID: 5GJC (Tian et al., 2016), la cual contiene dichos ligandos y cinco moléculas de agua en el sitio activo. La proteína consta de tres dominios: dominio I (residuos 182–327), dominio II

(328–480) y dominio III (481–617) (Ramharack et al., 2017). Además, el sitio activo contiene la región conocida como *P-loop* (residuos 196–203), localizada entre los dominios I y II. La estructura (5GJC) se limpió y protonó a pH fisiológico (7.4) (Proksch, 2018) empleando el servidor H++ en la versión 4.0 (<http://biophysics.cs.vt.edu/H++>) (Anandkrishnan et al., 2012; Myers et al., 2006; Gordon et al., 2005), mientras que los ligandos se protonaron en UCSF Chimera versión 1.17.3 (Pettersen et al., 2004) y recibieron cargas AM1–BCC mediante Antechamber (Wang et al., 2006).

Para la identificación de sitios alostéricos en la proteína se utilizó 2 servidores en línea, el primero PASSer (<https://passer.smu.edu/>) (Tian et al., 2023) y el segundo AlloSitePro 2.0 (<https://mdl.shsmu.edu.cn/AST/>) (Song et al., 2017), empleando en PASSer un modelo de AutoML y en AlloSitePro el método original desarrollado por Song et al. (2017).

3.3. Acoplamiento molecular de los compuestos candidatos a fármacos

El acoplamiento molecular se llevó a cabo con AutoDock4 (Morris et al., 2009) en donde se entra en detalle de su funcionamiento en el Anexo A. Para cubrir todas las regiones susceptibles de interacción alostérica y el sitio catalítico, se definieron cinco cajas de búsqueda con un espaciado de 2.0 Å en los tres ejes, cuatro correspondiendo a los sitios alostéricos utilizados por Raubenolt et al. (2021) de los dominios I–III y a un cuarto nombrado dominio PA por ser el sitio identificado por PASSer y AlloSitePro 2.0, y una al sitio activo, durante el acoplamiento se mantuvo rígido el receptor y se permitió flexibilidad total de los ligandos. Las dimensiones y centros de cada caja se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Dimensiones y posiciones de las rejillas de acoplamiento (espaciado 2,0 Å).

Caja	Puntos (X,Y,Z)	Centro (X,Y,Z)
Dominio I	74, 82, 76	43, 61, 35
Dominio II	74, 82, 82	68, 19, 30
Dominio III	76, 82, 92	51, 53, 72
Dominio PA	84, 104, 90	70, 48, 68
Sitio activo	60, 60, 80	40, 43, 27

Se utilizó el algoritmo "Lamarckian Genetic Algorithm" con población de 300 individuos, 50,000 generaciones, 25,000,000 evaluaciones de energía, 10 corridas independientes y un criterio de agrupamiento de poses con un umbral de RMSD de 1.0 Å. Todos los hidrógenos se conservaron y se empleó el modelo

de referencia unido para seleccionar la pose de afinidad óptima.

3.4. Carga de parámetros, solvatación y dinámica acelerada

Para las simulaciones de dinámicas moleculares clásicas se prepararon los sistemas, utilizando LEaP para cargar los parámetros ff19SB (Tian et al., 2019) para la proteína, TIP3P (Price & Brooks III, 2004) para el agua y gaff2 (Wang et al., 2004) para los ligandos. A continuación, se solvató el complejo en una caja cúbica de 10 Å de agua TIP3P y se neutralizó con iones de sodio y cloruro. Mediante ParmEd se habilitó el término de interacción 12–6–4 (Li et al., 2020; Sengupta et al., 2021; Li et al., 2021) para describir adecuadamente las fuerzas de van der Waals y electrostáticas del ión metálico.

Las simulaciones de dinámica molecular se realizaron utilizando el software Amber 24 (Salomon-Ferrer et al., 2013a) y AmberTools 24 (Case et al., 2023), todas las dinámicas moleculares se realizaron utilizando pmemd.CUDA a través de aceleración por "GPU" utilizando 2 GPU diferentes una RTX 2080Ti y NVIDIA V100 SXM2 (Gotz et al., 2012; Salomon-Ferrer et al., 2013b) y se desarrollaron en cuatro etapas: minimización, calentamiento, equilibrio y, por último, producción en donde se emplea un radio de corte de 8 Å para todas las interacciones no enlazantes, y se calcula las interacciones electrostáticas de largo alcance mediante el método "Particle Mesh Ewald" (PME) (Darden et al., 1993). La primera etapa consistió en una minimización energética estricta, donde el programa avanzó únicamente en el descenso de gradiente durante un máximo de veinte mil ciclos de optimización. Para las etapas de calentamiento y equilibrio se mantienen fijas las coordenadas del ligando en el sitio de minimización, en donde para los compuestos AID se mantuvieron distancias fijas obtenidas por la minimización y se restringieron en las fases de calentamiento y equilibrio, dejándolas completamente libres en la fase de producción.

Posteriormente, el sistema se calentó de 0 a 300 K (temperatura ambiente) en diez mil pasos de integración, utilizando un paso de tiempo de 2 fs, en esta fase, las velocidades iniciales se generaron aleatoriamente y se empleó el control térmico por acoplamiento de Langevin, con una fricción de 2 ps^{-1} para garantizar una correcta distribución de velocidades. Además, se aplicaron restricciones SHAKE a todos los enlaces que involucraban hidrógenos, de modo que sus longitudes permanecieran fijas durante el calentamiento.

Para equilibrar la presión y la temperatura se efectuaron 40 ns de simulación utilizando un paso de tiempo de 4 fs, divididos en dos etapas de 20 ns cada una. En la primera, se mantuvo el volumen constante, sin

control de presión, para estabilizar la temperatura a 300 K mediante el mismo acoplamiento de Langevin. La segunda etapa activó el control isotérmico-isobárico, regulando la presión a 1 atm con el barostato de Berendsen (Bussi et al., 2007), y manteniendo las mismas restricciones cinemáticas y configuraciones de salida periódica de coordenadas, y energías cada 10,000 pasos.

Con el sistema ya equilibrado, se realizaron cinco simulaciones de producción de 200 ns cada una empleando la metodología Gaussian Accelerated Molecular Dynamics (GaMD) (Miao et al., 2015; Wang et al., 2021) (para más información ir al Anexo B). Para aprovechar un paso de integración de 4 fs y, al mismo tiempo, evitar que los enlaces átomo-hidrógeno (X-H) se distorsionen o rompan bajo la mayor inercia, se aplicó una estrategia de “heavy-hydrogen mass repartitioning” en el archivo de topología (Hopkins et al., 2015). Al redistribuir parte de la masa del átomo unido al hidrógeno hacia el propio hidrógeno, se reducen las frecuencias de vibración de los enlaces H-X, permitiendo pasos de tiempo más largos sin comprometer la estabilidad ni la precisión del muestreo dinámico.

3.4.1. Simulaciones QM/MM

Para los cálculos QM/MM se aplicó un radio de corte de 8,0 Å a todas las interacciones no enlazantes y se mantuvo un mismo esquema de acoplamiento QM-MM. El Hamiltoniano cuántico se modeló con el método semiempírico PM6, mientras que las interacciones electrostáticas de largo alcance (QM-QM y QM-MM) se trataron mediante Particle Mesh Ewald (PME). Con el fin de preservar la precisión cuántica de las geometrías, se desactivó SHAKE en la región QM. Se definieron dos regiones complementarias con protocolos diferenciados.

Para la primera región, se empleó dinámica molecular dirigida (SMD) usando el método de Jarzynski (Park et al., 2003; Jarzynski, 1997) (véase Anexo C), que aplica fuerzas dirigidas a lo largo de una coordenada de reacción para inducir cambios conformacionales o la ruptura de enlaces, permitiendo muestrear estados de transición y estimar perfiles de trabajo basados en la relación de Jarzynski. Esta etapa describió el proceso de hidrólisis y generó las configuraciones para el siguiente método.

La segunda región se utilizó para obtener la barrera energética de la reacción mediante el *Adaptive String Method* (ASM) (Zinovjev & Tunon, 2017); véase Anexo D), una técnica de muestreo de rutas de reacción que representa la trayectoria entre los estados inicial y final mediante una cadena de nodos optimizados iterativamente para minimizar la energía libre a lo largo del camino. Este enfoque permite

trazar el perfil de energía libre (PMF) sin necesidad de definir coordenadas de reacción estrictas.

3.5. Análisis de resultados

Para evaluar la estabilidad y la movilidad de los ligandos en el sitio de unión de la NS3-Helicasa, se calcularon la Raíz de la Desviación Cuadrática Media (RMSD) y la Fluctuación Cuadrática Media (RMSF) de los átomos (no hidrógeno) de cada compuesto utilizando CPPTRAJ (Roe & Cheatham III, 2013). El RMSD se obtuvo alineando, en cada fotograma, la columna vertebral ("*backbone*") de la proteína en un sistema que contenga únicamente la proteína solvatada con la estructura inicial, y midiendo la desviación de los átomos pesados del ligando a lo largo de la trayectoria. De forma complementaria, el RMSF se empleó para cuantificar la fluctuación promedio de cada átomo del ligando, identificando regiones de alta movilidad que indiquen cambios conformacionales inducidos por la interacción con la helicasa (para más información ir al Anexo E).

Para cuantificar la afinidad de unión ligando–proteína se realizaron cálculos end-point MM-GBSA y MM-PBSA mediante el script MMPBSA.py de AmberTools (Ylilauri & Pentikainen, 2013; Miller III et al., 2012). Se extrajeron los últimos 50 ns de las simulaciones de producción de cada réplica. En MM-GBSA se usó el modelo GB_OBC2 con constantes dieléctricas interna de 1.0 y externa de 80.0, mientras que en MM-PBSA se resuelve la ecuación de Poisson–Boltzmann con una malla de 0.5 Å de resolución. Las energías de unión se descomponen en contribuciones electrostáticas, de van der Waals y de polarización/solvación, y adicionalmente se estima la contribución entrópica mediante análisis quasi-harmónico sobre 50 ns seleccionados al final de la simulación (para más información ir al Anexo F).

Capítulo 4. Resultados

4.1. Modelado, optimización y selección de los compuestos candidatos a fármacos

Las figuras 4 y 5 muestran los diez compuestos CID y AID representados en formato 2D. En cambio, las figuras 6 y 7 se presentan las estructuras modeladas y optimizadas de dichos compuestos, junto con sus respectivos mapas de potencial electrostático molecular (MEP) proyectados sobre la densidad electrónica. Estas figuras corresponden a sus estructuras en representación 2D, con excepción del compuesto CID-10, al cual se eliminó el grupo metilo ubicado en la región posterior de la molécula con el propósito de favorecer interacciones hidrofóbicas más estables con el sitio activo, y se protonó su parte reactiva en el oxígeno.

Esta representación permite identificar las regiones cargadas de cada molécula, el color azul indica zonas de potencial positivo (ausencia de densidad electrónica), mientras que el rojo señala regiones de alta densidad electrónica (potencial negativo).

En general, los compuestos CID muestran zonas de carga negativa prominentes en grupos funcionales polares (C-O), lo que sugiere una posible capacidad para establecer interacciones electrostáticas con residuos cargados positivamente en el sitio activo de la helicasa.

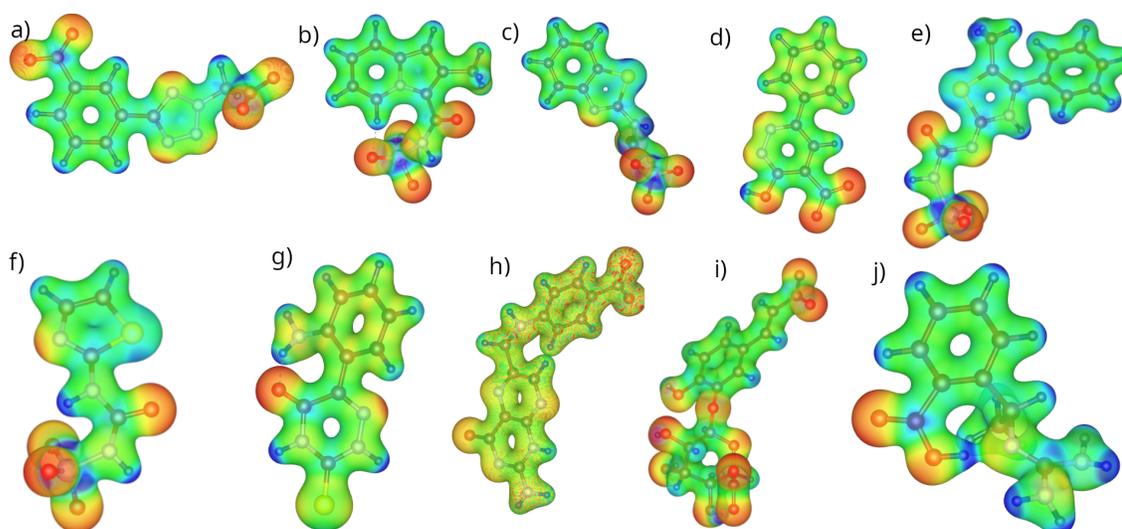


Figura 6. Representación tridimensional de los compuestos CID optimizados con su mapa de potencial electrostático (MEP). Las regiones rojas indican zonas de alta densidad electrónica (potencial negativo) y las azules zonas de baja densidad (potencial positivo).

En contraste, varios compuestos AID presentan una distribución de carga más dispersa, a menudo centrada sobre anillos aromáticos, lo cual es coherente con su potencial para interactuar mediante contactos apolares o interacciones $\pi-\pi$ en sitios alostéricos.

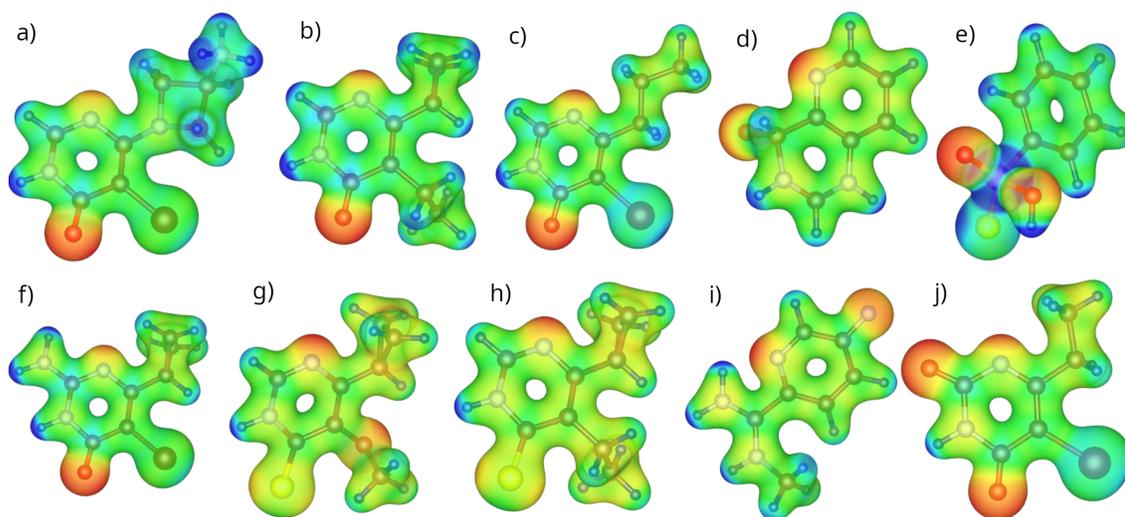


Figura 7. Compuestos AID optimizados junto con su mapa de potencial electrostático (MEP). Se observan distribuciones de carga variadas, en su mayoría concentradas en regiones aromáticas o polares.

La estructura cristalográfica con PDB ID 5GJC, presenta una resolución de 2.20Å, en cuanto a la calidad general del modelo, se observó que el 87 % de la cadena completa de los residuos se encuentran en regiones sin ningún criterio geoméricamente desfavorable, mientras que el 10 % presenta al menos un residuo fuera de las regiones permitidas ("outlier"), y solo un 2 % de los residuos muestran tres o más desviaciones. Adicionalmente, se identificó la ausencia de residuos de aminoácidos entre la treonina 246 y la glicina 254.

La calidad geométrica fue evaluada mediante el análisis de Ramachandran utilizando la herramienta MolProbity (<https://molprobity.biochem.duke.edu/index.php>). En dicho análisis, el 96.2 % de los residuos se ubicaron en regiones favorecidas, y el 99.1 % en regiones permitidas. Solo se identificaron cuatro residuos como "outliers", correspondiendo a Lys185, Lys186, Arg237 y Asp481. Estos residuos se localizan fuera del sitio activo y no participan en regiones funcionales clave, por lo que no arriesga la calidad del modelo. En la Figura 8, se muestra el diagrama de Ramachandran correspondiente a los residuos del caso general (a), con los "outliers" resaltados, y la representación tridimensional de la helicasa NS3 con sus dominios funcionales (I-III) y la región del "P-loop" (b).

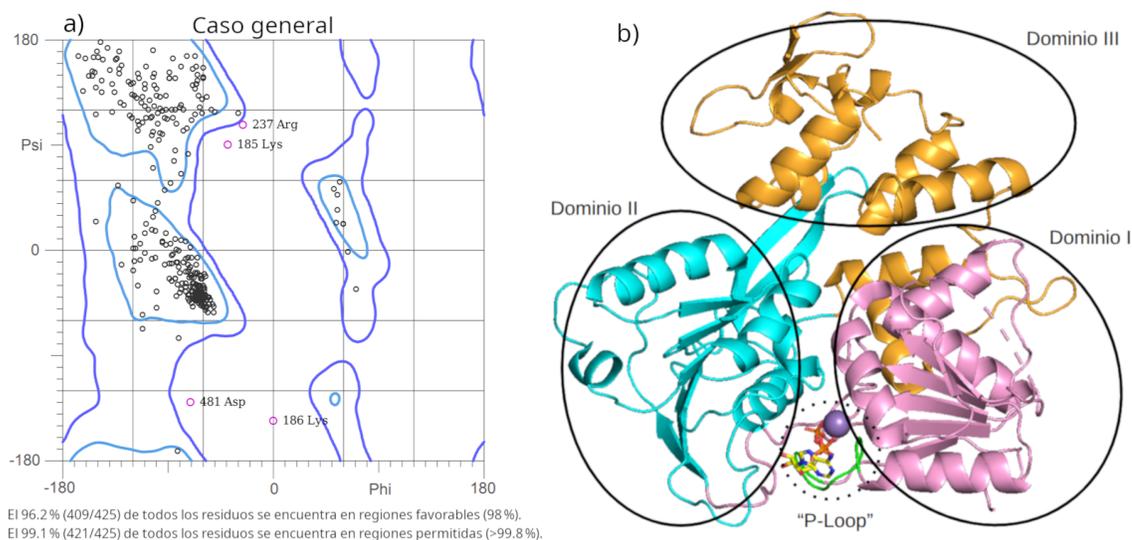


Figura 8. a) Diagrama de Ramachandran para la helicasa NS3, resaltando los residuos outliers. b) Representación estructural de la helicasa con sus dominios I (rosado), II (cian) y III (naranja), así como el sitio activo y la región del "P-loop".

4.2. Acoplamiento Molecular de los compuestos candidatos a fármacos

A partir de la estructura protonada descrita anteriormente, se realizó el **acoplamiento molecular** para evaluar la afinidad de los compuestos en diferentes regiones de la helicasa NS3. En la Figura 9 se ilustran las cajas de búsqueda dirigida para el acoplamiento sobre los dominios I, II, III y PA, correspondientes a posibles regiones alostéricas, y el sitio activo de la proteína.

La proteína NS3 helicasa del virus del Zika se representa mediante su superficie molecular, lo que permite visualizar con claridad el entorno estructural de cada zona de interés. Las regiones de la Figura 9 identificadas como a, b y c fueron propuestas por Raubenolt et al. (2021), mientras que las regiones a y d fueron identificadas como posibles sitios alostéricos mediante los servidores AlloSitePro 2.0 y PASSer y la caja ubicada en e corresponde a la parte del sitio activo de la proteína.

Las afinidades obtenidas para cada compuesto se presentan en la Tabla 2. En donde se reportan los valores de energía de acoplamiento (kcal/mol) calculados mediante *AutoDock Tools* para cada dominio. Las mejores afinidades de cada compuesto AID (valores más negativos) se encuentran resaltadas en **negritas**. Es importante señalar que un valor más negativo indica una interacción proteína–ligando más estable.

En promedio, los compuestos CID mostraron una mayor afinidad, con un valor medio de -9.23 kcal/mol.

En contraste, los compuestos AID presentaron afinidades más moderadas, con promedios por dominio de -2.84 kcal/mol (D-I), -2.95 kcal/mol (D-II), -2.19 kcal/mol (D-III) y -2.92 kcal/mol (D-PA).

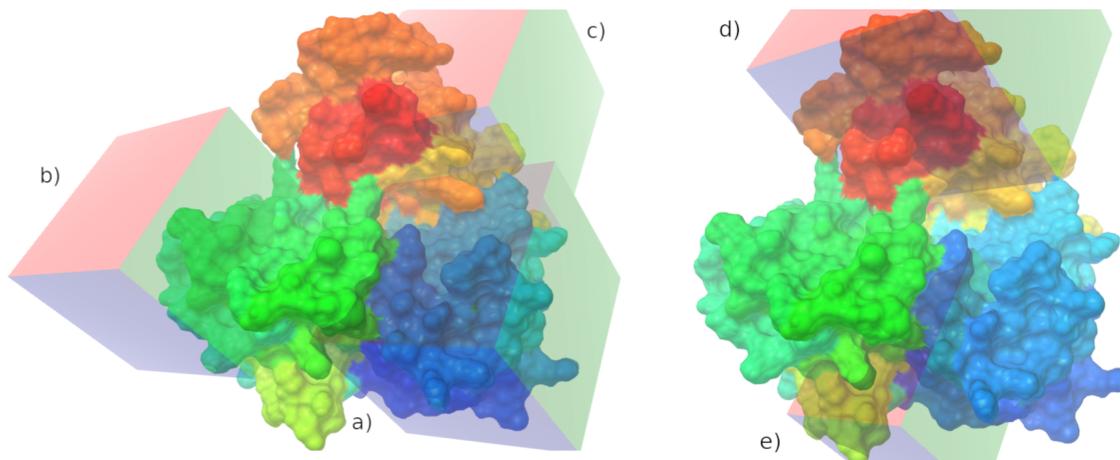


Figura 9. Cajas de búsqueda utilizadas para el acoplamiento molecular en: a) Dominio I, b) Dominio II, c) Dominio III, d) Región alostérica PA y e) Sitio activo. La proteína se representa como superficie molecular.

Estas diferencias se explican principalmente por la naturaleza del sitio de unión. El sitio activo, donde se unen los compuestos CID, corresponde a una cavidad bien definida y parcialmente cerrada, que permite una mayor superficie de interacción y presencia de residuos catalíticos o cargados. Por el contrario, los compuestos AID se unen a regiones alostéricas en la superficie de la proteína, donde el área de contacto es menor y la selectividad del entorno limita el establecimiento de interacciones fuertes.

Tabla 2. Resultados de afinidad obtenidos en el acoplamiento molecular. ^a Número de compuesto AID o CID; ^{b-e} Energía de interacción (kcal/mol) entre los compuestos AID y los dominios I, II, III y PA, respectivamente; ^f Energía de acoplamiento entre los compuestos CID y el sitio activo.

Compuesto ^a	Dominio-I (kcal/mol) ^b	Dominio-II (kcal/mol) ^c	Dominio-III (kcal/mol) ^d	Dominio-PA (kcal/mol) ^e	Sitio activo (kcal/mol) ^f
1	-4.13	-3.72	-2.55	-3.40	-9.20
2	-2.72	-2.72	-1.85	-2.48	-8.64
3	-3.37	-3.35	-2.57	-3.42	-9.39
4	-3.21	-3.70	-2.31	-3.28	-8.83
5	-1.77	-2.01	-1.69	-2.17	-11.02
6	-2.66	-2.60	-2.26	-2.33	-10.21
7	-2.68	-2.67	-2.21	-3.61	-2.56
8	-2.73	-2.75	-2.14	-2.93	-7.22
9	-2.89	-3.26	-2.04	-2.35	-10.31
10	-2.25	-2.72	-2.29	-3.23	-4.96

Para cada afinidad obtenida mediante el acoplamiento molecular, se generó una pose representativa, las mejores poses de los compuestos CID-2 y CID-5 se encuentran en la Figura 10 y en la Figura 11 para los compuestos AID-8 y AID-10 del dominio PA, se utilizaron estos compuestos para dar una visualización de las poses de forma representativa. Adicionalmente, se construyeron mapas de interacciones 2D utilizando

el software *BIOVIA Discovery Studio* (Baroroh et al., 2023), los cuales permitieron identificar con mayor detalle los contactos específicos entre los ligandos y la proteína (en el Anexo G se encuentran todos los mapas de interacción para los CID y AID, respectivamente).

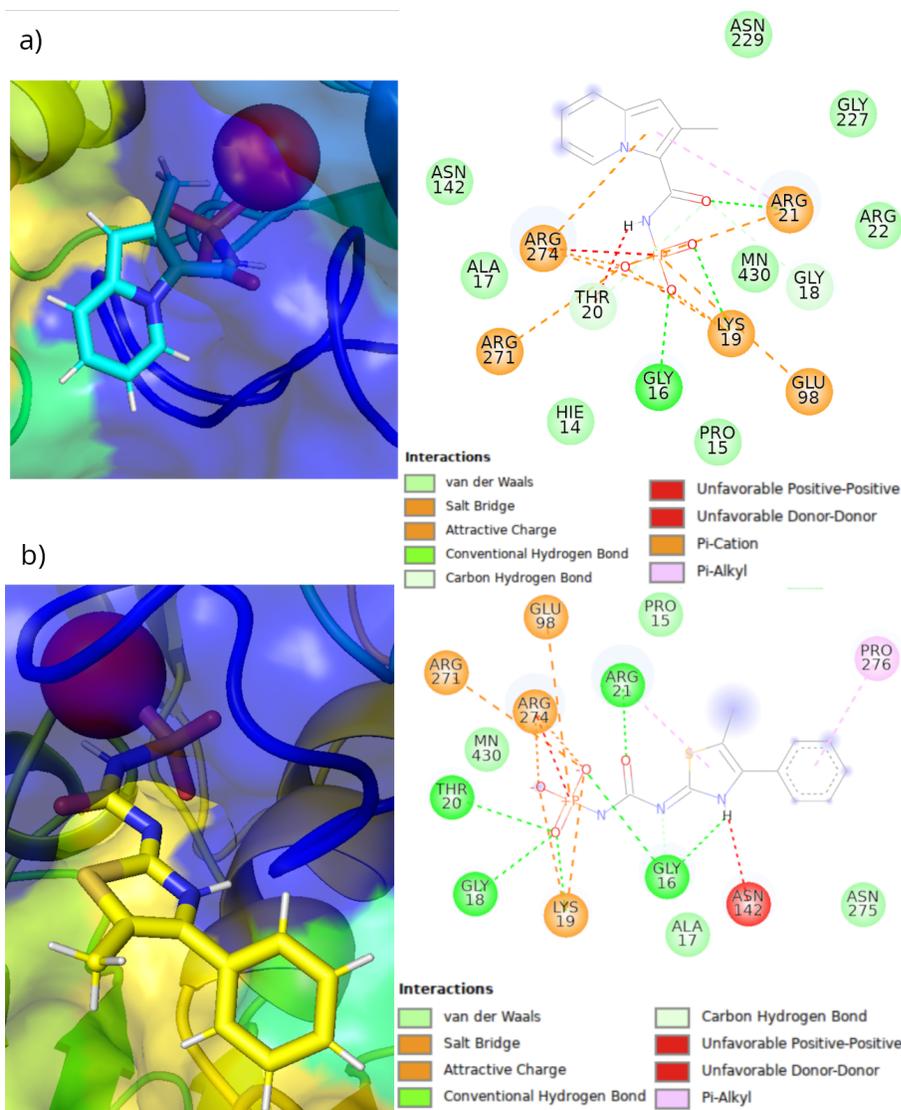


Figura 10. Poses de acoplamiento y mapas de interacciones para los compuesto CID-2 y CID-5, respectivamente.

Como se mencionó anteriormente con los mapas de potencial electrostático (MEP), los compuestos CID fueron diseñados para favorecer interacciones fuertes con el sitio activo de la proteína. En este sentido, la Tabla 3 enumera las interacciones no covalentes identificadas entre dichos compuestos y la helicasa NS3. Tal como se anticipó a partir de los MEP, se observó una gran cantidad de interacciones, destacándose principalmente las interacciones iónicas atractivas y los enlaces de hidrógeno convencionales, las cuales pueden contribuir significativamente a la estabilización de los compuestos en el sitio de unión.

Tabla 3. Número de interacciones no covalentes entre cada compuesto y la proteína durante el acoplamiento molecular.

Compuesto	Puente salino	Interacción iónica atractiva	Puente de hidrógeno convencional	Interacción π -catión	Van der Waals
CID-1	0	5	5	0	7
CID-2	6	7	3	1	8
CID-3	4	5	5	0	5
CID-4	2	2	2	1	8
CID-5	5	6	6	0	4
CID-6	5	6	5	1	4
CID-7	0	0	5	2	6
CID-8	0	2	3	1	7
CID-9	0	1	6	0	7
CID-10	0	0	4	1	7

Por otro lado, las interacciones observadas en la Tabla 4 (compuestos AID) reflejan una actividad más flexible, donde predominan contactos de tipo Van der Waals, enlaces de hidrógeno y algunas interacciones aromáticas. Esta tendencia concuerda con los MEP de los compuestos AID, los cuales muestran una distribución de carga más dispersa y menos concentrada en zonas polares o cargadas, lo que favorece interacciones transitorias en regiones alostéricas superficiales. En este contexto, el objetivo es mantener a los compuestos AID unidos a la proteína sin restringir completamente su movilidad, lo cual puede ser clave para inducir cambios conformacionales.

Tabla 4. Número de interacciones no covalentes entre los compuestos AID y la proteína en el acoplamiento molecular. Cada renglón representa la cantidad de interacciones en cada dominio D-I, D-II, D-III, D-PA, respectivamente, donde están separadas por un “—” para mostrar cada dominio.

Compuesto	Van der Waals	Pi-Pi en T	Puente H (Carbono)	Puente H conv.
AID-1	4—5—3—4	0—0—0—0	0—3—0—1	3—1—1—2
AID-2	6—5—5—7	1—4—0—0	1—1—0—1	2—2—2—1
AID-3	6—7—6—5	1—3—0—2	1—1—0—1	2—2—2—2
AID-4	2—2—4—6	0—0—0—0	3—2—0—3	3—2—3—3
AID-5	6—2—3—2	0—1—1—2	0—0—0—1	2—2—3—2
AID-6	4—6—4—2	0—1—1—1	0—0—0—1	3—2—3—3
AID-7	4—4—2—5	0—3—0—2	2—1—2—3	2—2—2—2
AID-8	6—4—3—7	1—4—0—2	1—1—2—1	2—2—2—1
AID-9	3—6—2—3	1—0—0—0	1—2—0—1	4—1—4—2
AID-10	5—4—5—3	1—1—0—2	1—0—0—1	1—1—2—2

4.3. Dinámica Molecular de los compuestos candidatos a fármacos

4.3.1. Compuestos inhibidores competitivos

Los resultados de las dinámicas moleculares se promediaron a partir de cinco réplicas de producción, por lo que todos los valores mostrados a continuación representan el comportamiento promedio del sistema.

En el caso de los compuestos CID, se realizó un análisis visual para evaluar si los ligandos permanecen en

el sitio activo a lo largo de los 200 ns de simulación. En la Figura 12 se muestra un ejemplo representativo correspondiente al compuesto CID-1 durante la primera réplica, en la cual se observa que el ligando se mantiene anclado al sitio activo de forma estable.

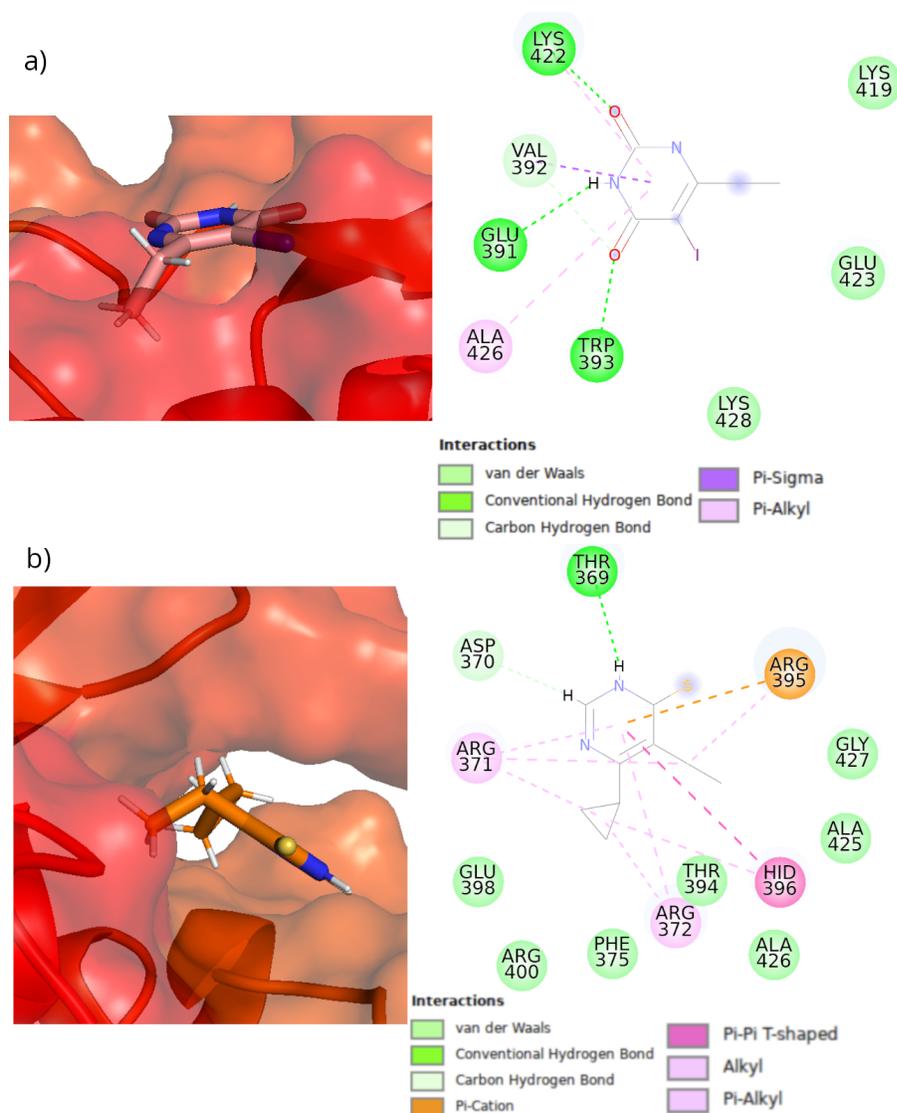


Figura 11. Poses de acoplamiento y sus respectivos mapas de interacciones para los compuestos AID-10 y AID-8 del dominio PA, respectivamente.

Este comportamiento se repitió en las cuatro réplicas restantes, y fue consistente también para los demás compuestos CID, los cuales permanecieron en el sitio activo durante toda la simulación (200 ns) sin desplazarse significativamente. Estos resultados sugieren una unión estable y sostenida con la proteína a lo largo del tiempo.

Para evaluar si un compuesto ejerce un efecto inhibitorio sobre la proteína, es necesario contar con

referencias comparativas, por un lado, la proteína completamente libre (sin ligando) y, por otro, su ligando natural o rival directo, en este caso la molécula de ATP. Ambos sistemas fueron sometidos a las mismas etapas preparativas y a cinco simulaciones independientes de dinámica molecular, con el objetivo de obtener un comportamiento promedio representativo.

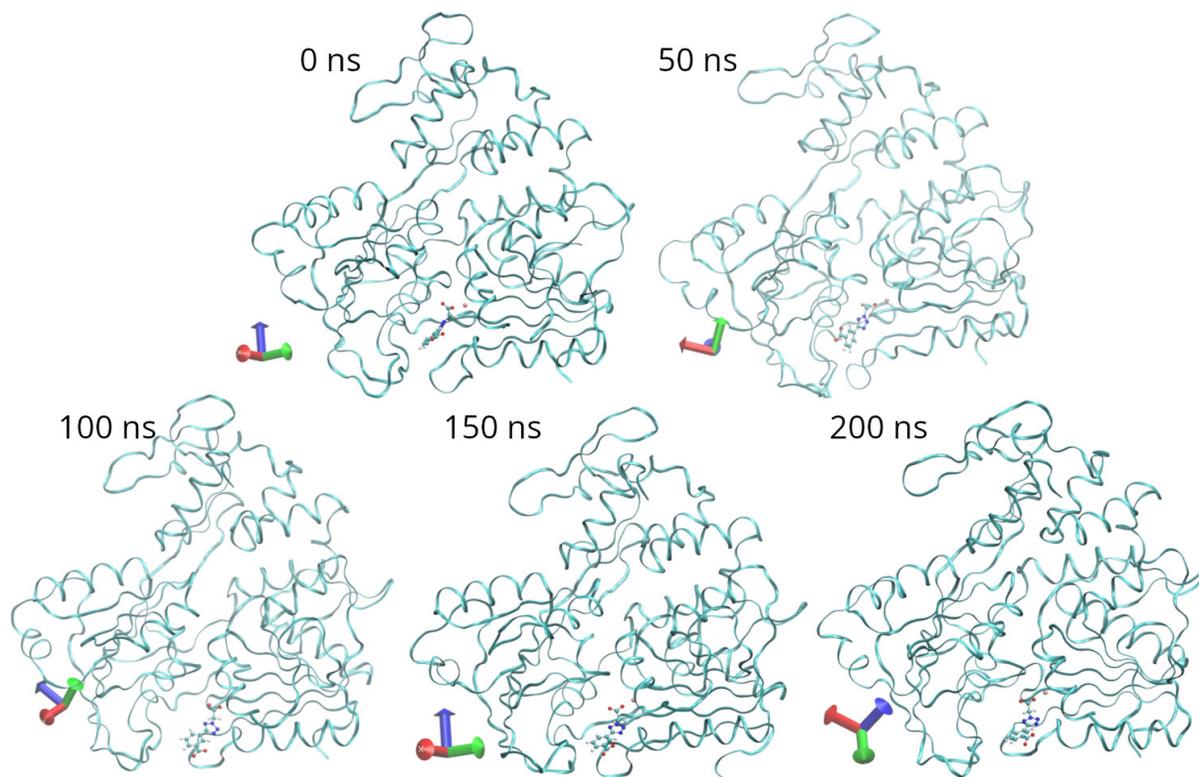


Figura 12. Visualización del sistema CID-1 para la primer trayectoria de producción, el compuesto se mantiene unido en el sitio activo a lo largo de 200 ns.

A partir de estas simulaciones se generaron gráficas de RMSD que permiten cuantificar la variación temporal de los residuos seleccionados. Este análisis ofrece un marco de referencia para comparar el comportamiento dinámico del sistema con y sin inhibidores durante 200 ns de simulación. En particular, se analizaron los átomos C_{α} de los residuos del motivo "*P-loop*", y el RMSD se calculó respecto a la estructura 5GJC libre en equilibrio.

En las figuras 13 y 14 se presenta el análisis de RMSD de los compuestos CID, junto con dos referencias clave: la proteína completamente libre (5GJC, línea negra con mayor fluctuación iniciando alrededor de 0.5 Å) y la proteína en presencia de ATP (línea negra con menor fluctuación, iniciando cerca de 2.6 Å). La gráfica fue dividida en dos gráficos para facilitar la visualización del comportamiento individual de cada compuesto.

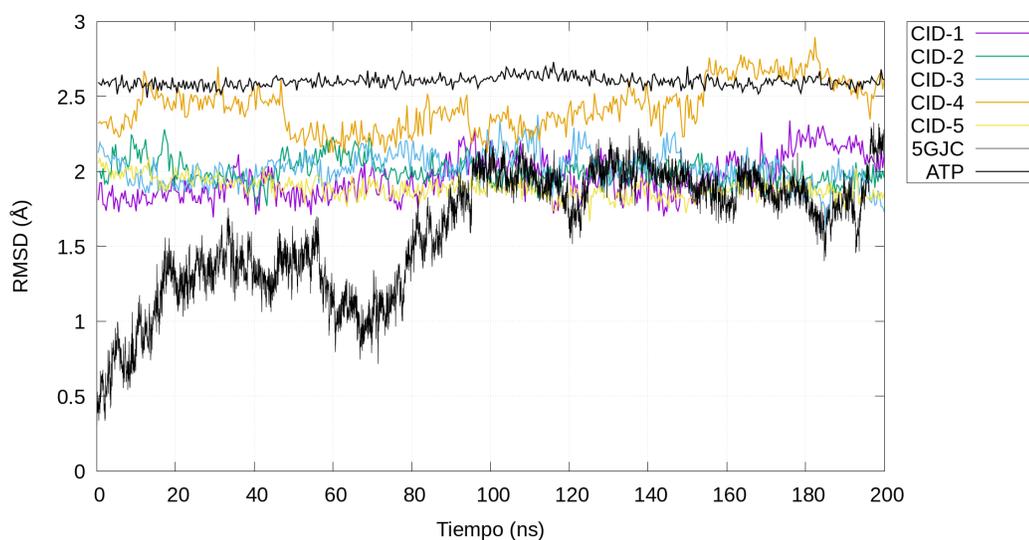


Figura 13. Análisis de RMSD de los compuestos CID en comparación con la proteína libre (5GJC) y con ATP en el sitio activo, de los compuestos CID-1 a CID-5.

Se puede observar que los compuestos CID-1, CID-2, CID-3, CID-5, CID-7 y CID-9 inducen una reducción notable en la movilidad del sitio activo, mostrando perfiles de RMSD similares al del sistema con ATP. Esto sugiere que estos compuestos podrían estabilizar el sitio de unión de manera efectiva, imitando el efecto estabilizador del ligando natural. Por otro lado, compuestos como CID-4, CID-6 y CID-10 presentan una mayor fluctuación, aunque aún menor en comparación con la proteína completamente libre, lo que indica un posible efecto restrictivo más débil sobre la flexibilidad del sitio activo.

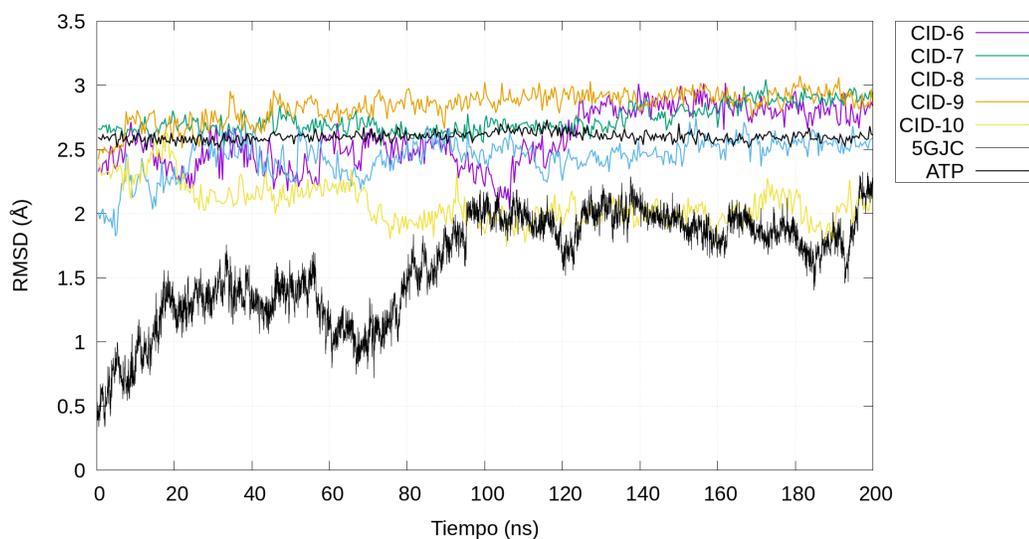


Figura 14. Análisis de RMSD de los compuestos CID en comparación con la proteína libre (5GJC) y con ATP en el sitio activo, de los compuestos CID-6 a CID-10.

Para evaluar el efecto de los compuestos CID sobre la dinámica local, se calculó la fluctuación cuadrática media por residuo (RMSF) de los átomos C_{α} respecto de su posición media a lo largo de la simulación. A diferencia del RMSD, que resume cambios globales, el RMSF permite identificar regiones específicas cuya movilidad se modifica en presencia de cada compuesto, evidenciando posibles estabilizaciones o flexibilizaciones en el motivo "P-loop". El análisis se restringe a la comparación entre compuestos CID mediante sus perfiles de RMSF por residuo.

En la Figura 15, se muestra la fluctuación de los residuos del sitio de unión correspondientes al "P-loop" (residuos H195 a R202). El objetivo de este análisis es determinar si los compuestos CID logran reducir la movilidad de estos residuos en comparación con la proteína completamente libre (5GJC), idealmente acercándose al perfil observado en el sistema con ATP.

En general, la mayoría de los compuestos CID presentan una reducción en la fluctuación respecto a la proteína libre, especialmente en los residuos más móviles. Sin embargo, en el caso de la prolina 196 (P196), los compuestos CID-1, CID-3 y CID-6 muestran valores por encima de la proteína libre. Asimismo, para la glicina 197 (G197), el compuesto CID-3 presenta una fluctuación ligeramente mayor. Estos resultados sugieren que, si bien hay una tendencia general a la estabilización del sitio de unión, algunos compuestos pueden no restringir por completo el movimiento de ciertos residuos clave.

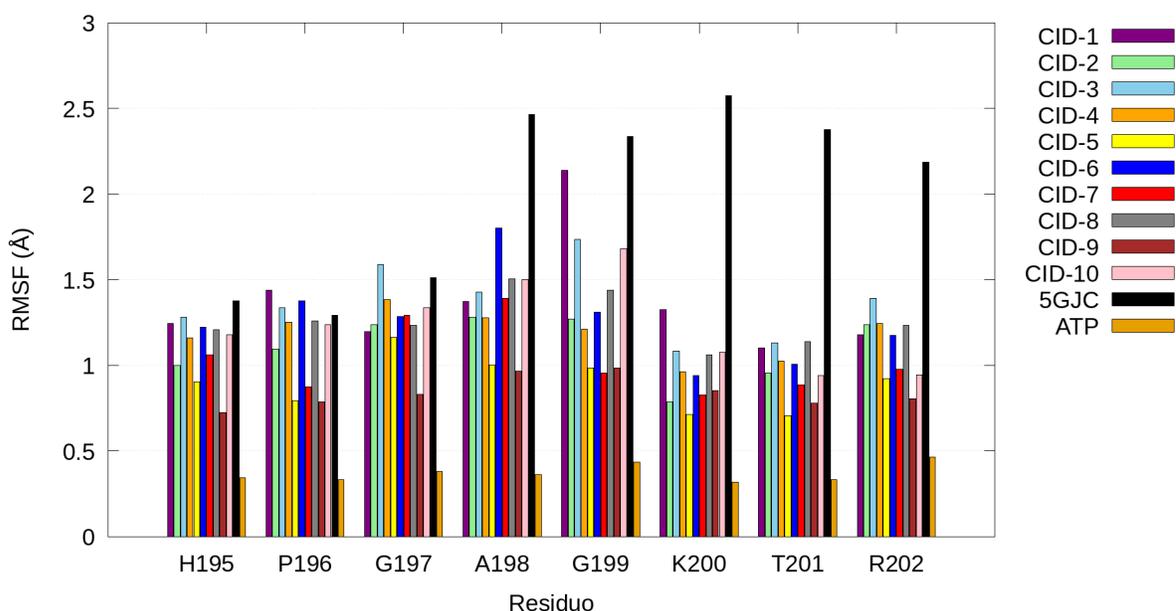


Figura 15. Análisis de RMSF para los residuos del "P-loop" (H195 a R202) en presencia de los compuestos CID, ATP y en la proteína libre (5GJC). Se observa que la mayoría de los compuestos CID reducen la fluctuación relativa de los residuos en comparación con la proteína sin ligando, acercándose al comportamiento estabilizador observado con ATP.

Por último, para los compuestos CID se evaluó la energía libre de unión entre el ligando y la proteína mediante los métodos MM-PBSA y MM-GBSA. Adicionalmente, se calcularon propiedades fisicoquímicas relevantes de los ligandos, tales como el peso molecular (PM), el coeficiente de partición (logP), la superficie polar aparente (TPSA) y el número de aceptores y donadores de enlaces de hidrógeno. Esta información, resumida en la Tabla 5, permite caracterizar el comportamiento de cada compuesto y su potencial como fármaco.

De acuerdo con la regla de Lipinski (Lipinski et al., 1997), se recomienda que el peso molecular sea menor a 500 g/mol, criterio que cumplen todos los compuestos analizados. En cuanto al coeficiente de partición (LogP), la mayoría de los compuestos presentan un carácter predominantemente hidrofílico, con excepción de los compuestos CID-4 y CID-5, que exhiben un perfil más balanceado, mientras que el CID-7 muestra una mayor hidrofobicidad. Por otro lado, los valores de superficie polar aparente oscilan entre 90 y 180 Å², intervalo que se encuentra dentro de los parámetros adecuados para minimizar la probabilidad de atravesar barreras como la hematoencefálica y la placentaria (Clark, 2011; Mao & Chen, 2022).

Se observaron diferencias apreciables entre los valores de energía de enlace obtenidos con MM-PBSA y MM-GBSA. Parte de esta discrepancia puede atribuirse a diferencias metodológicas: GBSA estima la energía de solvatación mediante un modelo de Born generalizado (más aproximado pero menos ruidoso), mientras que PBSA trata la electrostática en un medio continuo con frontera dieléctrica, lo que lo hace más sensible a las variaciones conformacionales. Además, al emplear dinámicas gaussianas aceleradas (GaMD) sin reponderación, el muestreo incluye estados de mayor energía no representativos de una distribución de Boltzmann, lo que puede sesgar los " ΔG_{bind} " en ambos enfoques. En consecuencia, estos valores deben interpretarse de manera cualitativa: permiten ordenar aproximadamente los compuestos de mayor a menor afinidad, pero no se recomienda extraer conclusiones a partir de valores absolutos.

Tabla 5. ^a Compuesto inhibidor competitivo, ^b Energía de unión utilizando PBSA, ^c Energía de unión utilizando GBSA, ^d Peso molecular del compuesto, ^e Hidrofobicidad del compuesto (LogP < 0 muy hidrofílica, LogP \approx 0 balanceada, LogP 0 > hidrofóbica), ^f Superficie Polar Aparente, mide el área superficial total de todos los átomos polares (PSA < 90 buena absorción oral, PSA > 140 baja permeabilidad celular y absorción oral), ^g Número de aceptores de enlaces de hidrógeno, ^h Número de donadores de enlaces de hidrógeno.

Compuesto ^a	PBSA- ΔG (Kcal/mol) ^b	GBSA- ΔG (Kcal/mol) ^c	PM (g/mol) ^d	LogP ^e	TPSA (Å ²) ^f	Aceptores de H ^g	Donadores de H ^h
CID-1	-1.72 \pm 0.64	-10.09 \pm 0.85	246.18	-2.55	123.86	8	0
CID-2	-23.47 \pm 1.20	-31.90 \pm 1.00	252.17	-0.19	96.70	5	1
CID-3	0.94 \pm 0.87	-19.57 \pm 0.79	273.21	-0.60	120.37	7	3
CID-4	7.53 \pm 0.98	-11.01 \pm 0.75	215.18	0.21	86.14	5	1
CID-5	-17.31 \pm 1.09	-29.82 \pm 1.26	311.25	0.49	120.44	5	2
CID-6	-12.31 \pm 0.80	-17.69 \pm 0.99	221.13	-0.91	117.21	6	2
CID-7	7.31 \pm 0.53	-11.56 \pm 0.45	220.26	1.08	87.56	4	3
CID-8	7.60 \pm 0.83	-14.02 \pm 0.63	311.28	-0.73	149.71	8	3
CID-9	13.29 \pm 1.43	-12.36 \pm 0.89	354.27	-3.91	179.64	10	4
CID-10	17.94 \pm 0.65	-3.91 \pm 0.58	207.23	-2.22	103.77	2	3
ATP	-79.61 \pm 2.17	-109.91 \pm 3.46	505.17	-4.27	289.06	18	4

4.3.2. Compuestos inhibidores alostérico

Para la evaluación de los compuestos AID se estableció un criterio mínimo de permanencia en el sitio de unión de al menos 70 ns. Aquellos compuestos que se disociaron antes de este tiempo fueron descartados del análisis posterior. Una forma de detectar dicha disociación fue mediante el análisis de contactos nativos y no nativos a lo largo del tiempo.

En la Figura 16 se muestra el comportamiento del compuesto AID-1 en el Dominio II a lo largo de las cinco réplicas de simulación. Este compuesto no mantuvo interacciones estables con la proteína, como se observa, las líneas correspondientes a los contactos nativos (azul) y no nativos (rojo) están prácticamente ausentes, lo que indica que el ligando se disoció completamente de su sitio inicial y de la proteína.

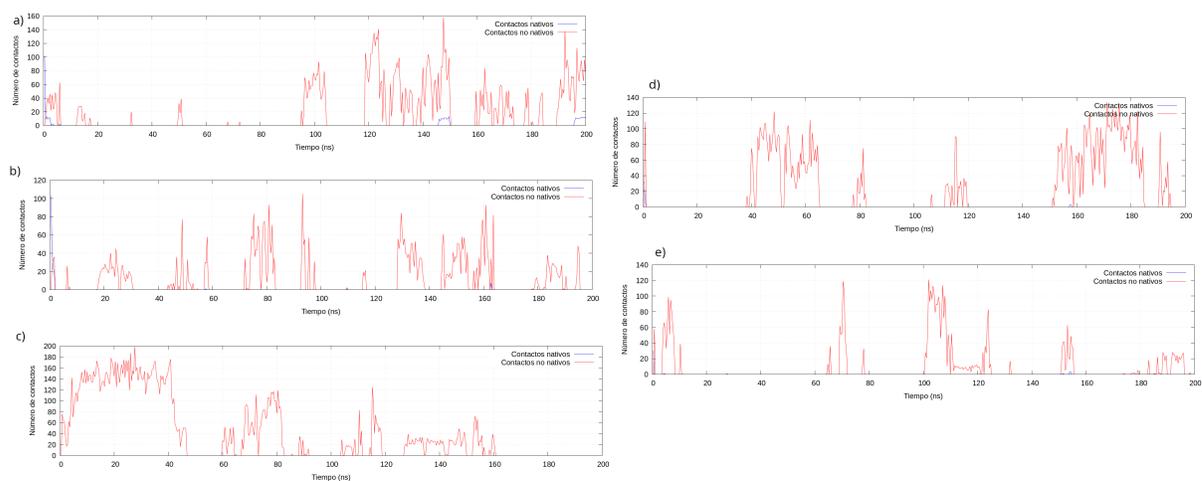


Figura 16. Análisis de contactos nativos (azul) y no nativos (rojo) para el compuesto AID-1 en el Dominio II, evaluado a lo largo de cinco réplicas de dinámica molecular. Se observa la ausencia de contactos persistentes con la proteína, indicando una disociación temprana del ligando y su incapacidad para mantenerse en el sitio de unión.

En contraste, en la Figura 17 se presenta el comportamiento del compuesto AID-10 en el Dominio PA. En este caso, en cuatro de las cinco simulaciones con excepción de a se observa una interacción persistente con la proteína. En los gráficos, la línea azul representa los contactos nativos (es decir, aquellos presentes al inicio del acoplamiento), mientras que la línea roja corresponde a nuevos contactos formados durante la simulación. Idealmente, el compuesto debe conservar los contactos nativos, lo cual indica que permanece en la misma región de unión identificada durante el acoplamiento molecular. La pérdida de estos contactos y la aparición predominante de contactos no nativos suelen implicar un desplazamiento del ligando hacia otra región de la proteína.

Un criterio adicional que se estableció para considerar un compuesto AID como válido en un dominio

específico, fue que al menos dos de las cinco réplicas de simulación mostraran el comportamiento deseado, es decir, permanencia estable en el sitio de unión. En estos casos, los análisis se promediaron únicamente sobre la cantidad de réplicas que cumplieron con este criterio.

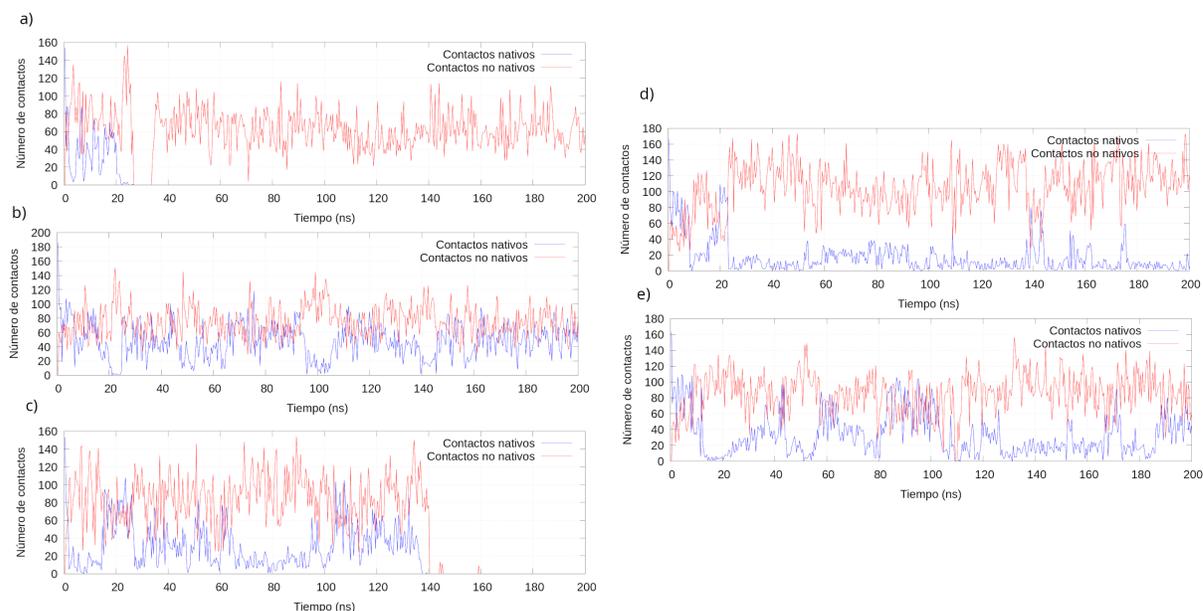


Figura 17. Análisis de contactos nativos (azul) y no nativos (rojo) para el compuesto AID-10 en el Dominio PA, a lo largo de cinco réplicas. En cuatro de las cinco simulaciones se observa una interacción sostenida con la proteína, manteniendo parcial o totalmente los contactos nativos, lo cual indica permanencia del ligando en el sitio de unión original identificado por el acoplamiento molecular.

La Tabla 6 resume qué compuestos cumplieron con este umbral mínimo y en qué dominios serán considerados para los análisis posteriores.

Tabla 6. Resumen de los compuestos AID y los dominios en los que cumplieron con el criterio de permanencia mínima (2 réplicas con comportamiento estable en el sitio de unión). Solo estos casos serán considerados para análisis estructurales y de interacción.

Compuesto	Dominio I	Dominio II	Dominio III	Dominio PA
AID-1	No	No	No	No
AID-2	No	No	No	Sí
AID-3	No	No	No	Sí
AID-4	No	No	No	No
AID-5	No	No	No	No
AID-6	No	No	No	No
AID-7	No	No	No	No
AID-8	No	No	Sí	Sí
AID-9	No	No	No	No
AID-10	No	No	Sí	Sí

Dado que los compuestos AID se diseñaron para inducir un efecto alostérico, el análisis dinámico se centró en evaluar cómo la unión en dominios distantes afecta indirectamente al sitio activo de la helicasa. En este contexto, se espera que una inhibición alostérica efectiva provoque un cambio conformacional en el sitio activo que altere su flexibilidad, geometría o estabilidad, en comparación con su comportamiento natural.

La Figura 18 muestra el perfil de RMSD para los sistemas con compuestos AID seleccionados en los dominios PA y III en donde se utilizó de referencia la estructura completamente libre en equilibrio y se analizaron los C_{α} y nuevamente se tiene 2 controles, los cuales inician en 0.5 Å referente a la proteína completamente libre y 2.6 Å en donde se encuentra el ATP. Se observa que, si bien la mayoría de los sistemas presentan mayores fluctuaciones estructurales que ATP, algunos compuestos como AID-2 y AID-3 en el dominio PA muestran un patrón relativamente estable, no logra un perfil similar al sistema con la molécula de ATP. En contraste, compuestos como AID-6 del dominio PA y los AID-8 y AID-10 del dominio III exhiben desviaciones más elevadas, similares al sistema completamente libre.

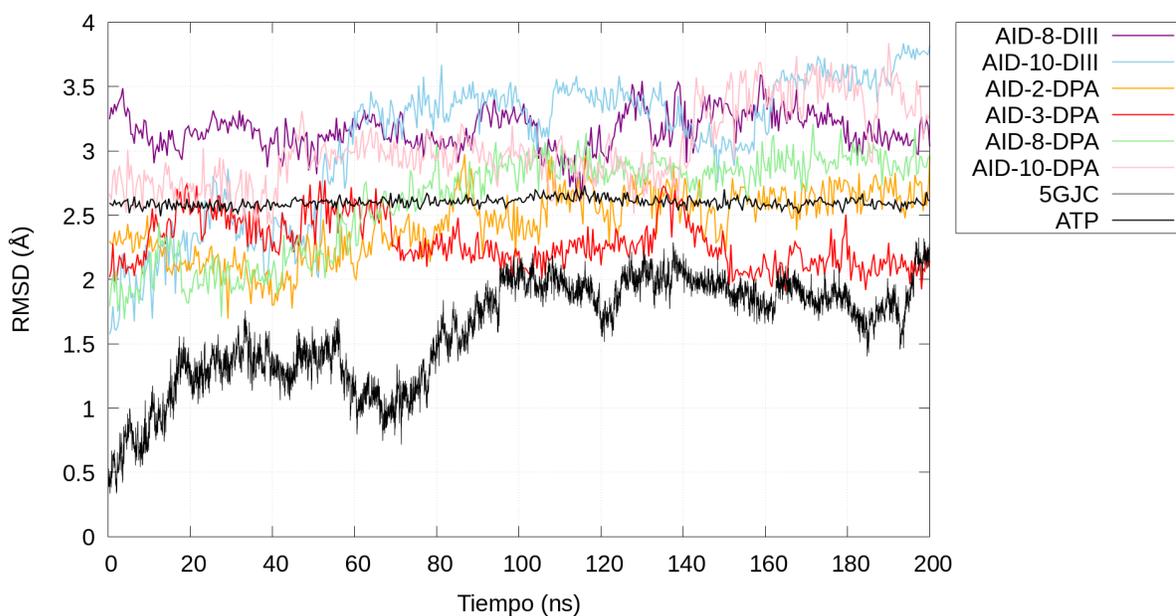


Figura 18. Análisis de RMSD de los compuestos AID seleccionados en los dominios PA y III, en comparación con ATP y la proteína libre (5GJC).

Complementariamente, el análisis de RMSF por residuo (Figura 19) revela cómo la flexibilidad local del "P-loop" (residuos H195–R202) responde a la presencia de cada compuesto. De forma consistente con un efecto alostérico, es esperable una variación considerable en la movilidad conformacional de esta región, ya sea mediante una disminución (estabilización) o un incremento en la movilidad respecto a la proteína libre. Dependiendo del mecanismo de acción del compuesto, donde un incremento en la fluctuación

también puede ser indicativo de un cambio estructural inducido alostéricamente, que potencialmente interfiere con la funcionalidad del sitio activo.

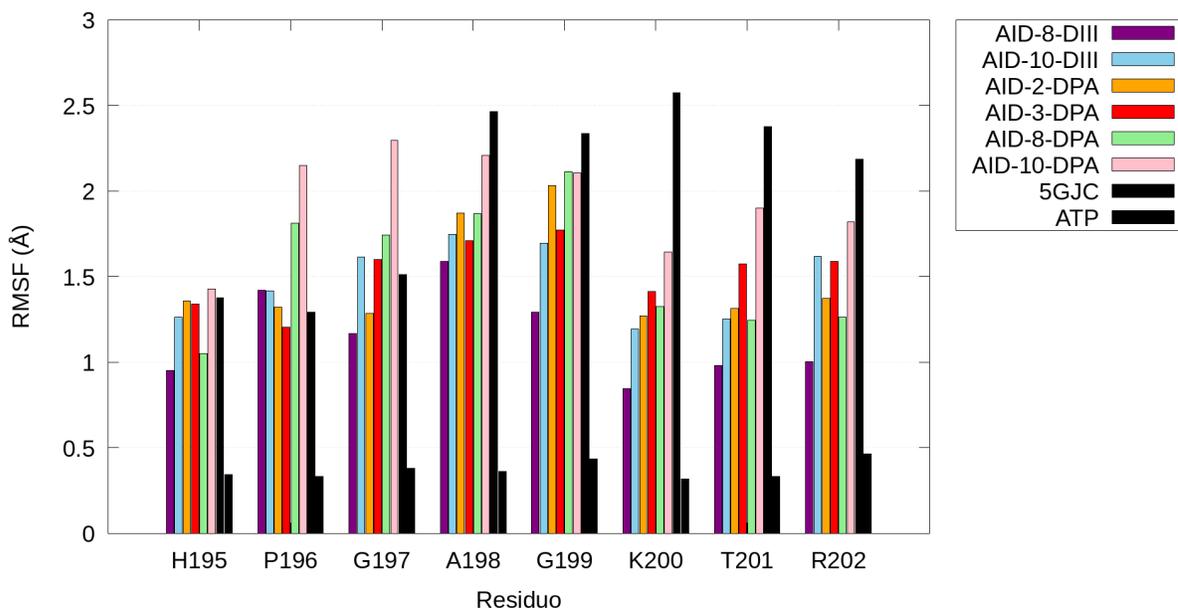


Figura 19. Análisis de RMSF para los residuos del "P-loop" (H195–R202), correspondiente al sitio activo, en presencia de los compuestos AID, ATP y la proteína libre (5GJC).

Se encontró que los compuestos no logran reflejar un comportamiento similar al sistema con ATP, por lo que no producen un efecto estabilizador. En particular, para los residuos H195–P196–G197, el compuesto AID-3-DPA no logra superar a la proteína libre; si bien los demás compuestos sí superan el movimiento, para los demás residuos (del A198 al R202) no es el caso, por lo que no se detecta una inhibición por cambio estructural basado en la modificación de las fluctuaciones en los residuos del "P-loop".

De igual forma, se evaluaron las energías de unión entre los compuestos y la proteína utilizando los métodos MM-PBSA y MM-GBSA, además de calcularse las propiedades fisicoquímicas de los compuestos, como se muestra en la Tabla 7. En este caso, los pesos moleculares se encuentran dentro de intervalos aceptables, entre 164 y 268 g/mol. Únicamente el compuesto AID-10 presenta un perfil balanceado, mientras que los demás muestran un carácter más hidrofóbico.

Cabe destacar que los valores de superficie polar aparente obtenidos son menores a 90 \AA^2 , lo cual resulta preocupante, ya que incrementa el riesgo teórico de que estos compuestos puedan atravesar barreras como la hematoencefálica y la placentaria (Clark, 2011; Mao & Chen, 2022).

Tabla 7. ^a Compuesto inhibidor alostérico, ^b Energía de unión utilizando PBSA, ^c Energía de unión utilizando GBSA, ^d Peso molecular del compuesto, ^e Hidrofobicidad del compuesto (LogP < 0 muy hidrofílica, LogP ≈ 0 balanceada, LogP 0 > hidrofóbica), ^f Superficie Polar Aparente, mide el área superficial total de todos los átomos polares (PSA < 90 buena absorción oral, PSA > 140 baja permeabilidad celular y absorción oral), ^g Número de aceptores de enlaces de hidrógeno, ^h Número de donadores de enlaces de hidrógeno.

Compuesto ^a	PBSA-ΔG (Kcal/mol) ^b	GBSA-ΔG (Kcal/mol) ^c	PM (g/mol) ^d	LogP ^e	TPSA (Å ²) ^f	Aceptores de H ^g	Donadores de H ^h
AID-2	-0.98 ± 0.29	-12.64 ± 0.34	164.21	1.21	45.75	2	1
AID-3	-0.83 ± 0.21	-7.94 ± 0.43	246.10	1.33	45.75	2	1
AID-8	-1.95 ± 0.27 — -0.2 ± 0.28	-8.97 ± 0.57 — -11.95 ± 0.4	180.28	2.58	28.68	2	1
AID-10	-2.27 ± 0.32 — -2.32 ± 0.22	-9.70 ± 0.54 — -6.32 ± 0.43	267.05	-0.58	64.52	3	1

4.3.3. Simulaciones del proceso de hidrólisis del ATP

Para los cálculos QM/MM mencionados en la sección de metodología (Capítulo 3.4.1), se definieron dos regiones principales. La primera de ellas se diseñó con el propósito de estudiar el proceso de hidrólisis del ATP en el sitio activo. Esta región incluye fragmentos de residuos clave que participan directa o indirectamente en la reacción, y como es habitual en este tipo de enfoques, varios residuos fueron truncados en los enlaces peptídicos, por lo que se emplearon átomos de enlace ("link atoms") para cerrar los extremos y mantener la integridad electrónica del sistema cuántico.

En la Figura 20 se muestra la primera región QM considerada; en rojo se destacan los átomos incluidos explícitamente en la región cuántica. Esta región comprende fragmentos de los residuos Arg462, Arg459, Gln455, Gly415, Gly286, Arg202, Thr201 y Lys200, así como el ATP y el ión divalente Mn²⁺ (representado como una esfera roja) en (a). Por otra parte, la región con la que se trabajó es la indicada en (b), donde los terminales de los residuos se saturan con hidrógenos (actuando como "link atoms"). En esta representación, el color verde corresponde a los carbonos, el rojo a los oxígenos, el azul a los nitrógenos, el amarillo a los átomos de fósforo (grupos fosfato) y el blanco a los hidrógenos. Esta selección se realizó considerando la proximidad al sitio catalítico y la relevancia electrostática y estructural de los residuos implicados en el mecanismo de hidrólisis (Yang et al., 2018).

Utilizando simulaciones de dinámica molecular dirigida (SMD), se exploraron diferentes rutas posibles para el proceso de hidrólisis del ATP en el sitio activo. La Figura 21 muestra un primer acercamiento de este proceso, siendo una reacción de un paso. En donde, una molécula de agua se aproxima al residuo Glu286⁻ y se desprotona, transfiriendo su protón hacia dicho residuo. Simultáneamente, una segunda molécula de agua transfiere su protón a la primera, la cual a su vez se enlaza con el grupo fosfato del ATP, dando lugar a la formación de HPO₄²⁻, ADP, GluH y la molécula de agua se mantiene intacto al final del proceso.

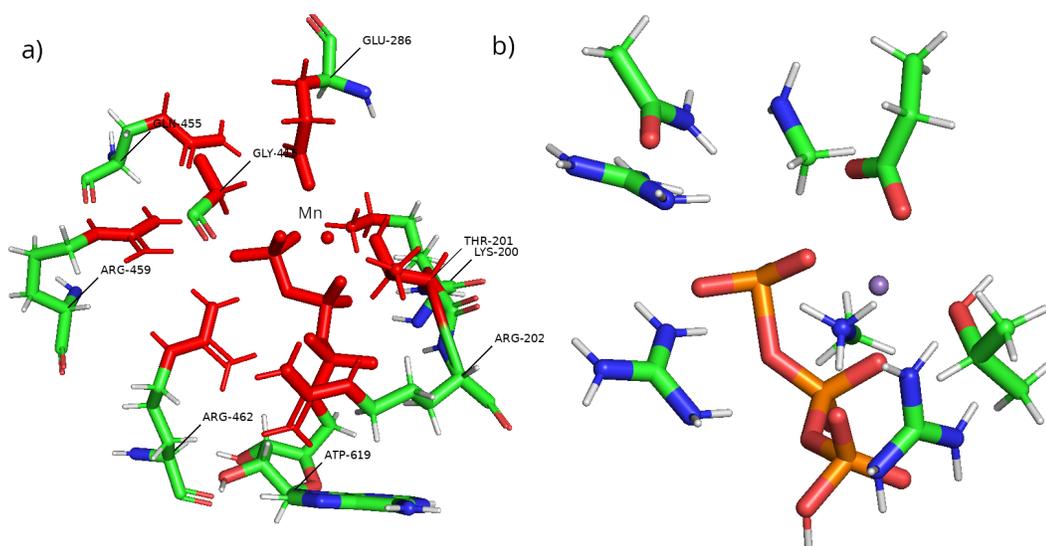


Figura 20. Primera región QM definida para los cálculos QM/MM. Los átomos coloreados en rojo corresponden a los incluidos explícitamente en el tratamiento cuántico, mientras que el resto de la proteína se modela con mecánica molecular. Esta región abarca fragmentos de los residuos Arg462, Arg459, Gln455, Gly415, Gly286, Arg202, Thr201, Lys200, el ligando ATP y un ión metálico divalente (esfera roja), todos ellos involucrados en el mecanismo de hidrólisis.

Este mecanismo descrito en la Figura 21 sugiere una cooperación entre dos moléculas de agua: una actúa como puente de protones y la otra como nucleófilo directo, mediado por la participación activa del residuo Glu286.

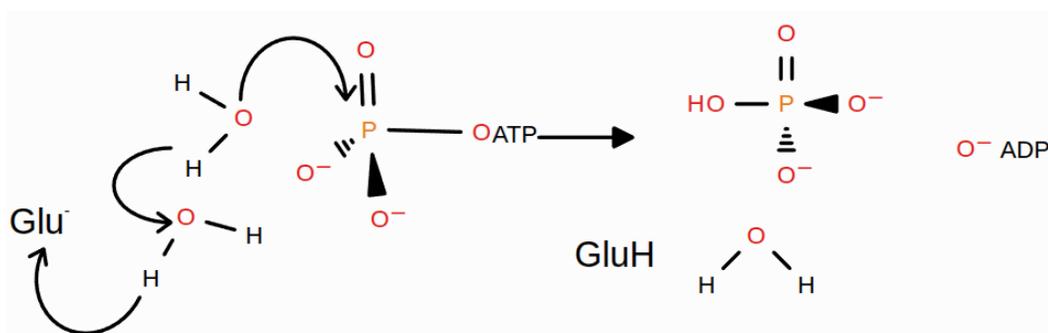


Figura 21. Primer acercamiento al mecanismo de hidrólisis del ATP obtenido mediante simulaciones SMD.

Por otra parte, se identificó un segundo posible mecanismo de hidrólisis del ATP en el cual no participa el residuo Glu286 como aceptor de protones. En este escenario alternativo, una molécula de agua desprotonada ataca directamente al grupo fosfato terminal (PO_3), mientras que una segunda molécula de agua actúa como fuente de protones para estabilizar el sistema. Como resultado, se forma el producto: $\text{ADP} + \text{H}_2\text{PO}_4^-$, que representa un sistema con una mayor estabilización por duplicación del grupo fosfato protonado.

La Figura 22 ilustra este mecanismo. Se parte nuevamente del sistema inicial, pero en este caso la primera molécula de agua se desprotona hacia un oxígeno reactivo del grupo fosfato mientras que, la segunda molécula de agua dona su hidrógeno a la primera, para así enlazarse al grupo fosfato, formando ahora $\text{ADP} + \text{H}_2\text{PO}_4^-$.

Aunque este mecanismo implica una mayor estabilización en los productos, su desventaja radica en un mayor coste energético comparado con el mecanismo mediado por Glu286 (García-Martínez et al., 2023).

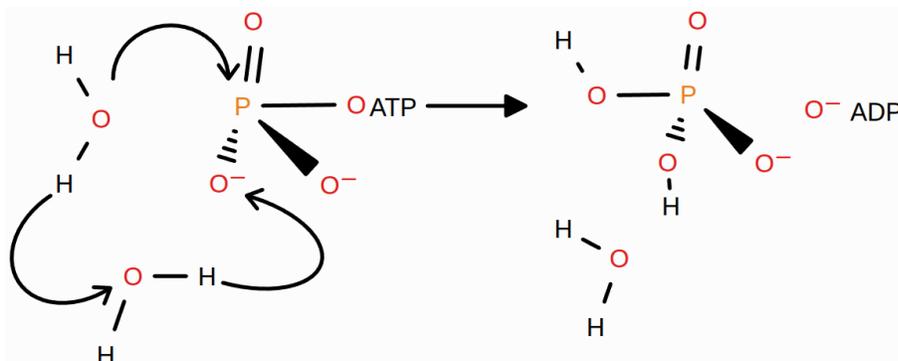


Figura 22. Segundo acercamiento al mecanismo de hidrólisis del ATP sin participación directa del residuo Glu286.

Para explorar una vía alternativa más simplificada del mecanismo de hidrólisis, se propuso un modelo en el cual únicamente participa una molécula de agua, la cual transfiere su protón directamente al residuo Glu286. El grupo hidroxilo resultante (OH^-) ataca el fosfato terminal del ATP, y posteriormente, el residuo Glu286 transfiere el protón al grupo fosfato, permitiendo la formación de los productos $\text{ADP} + \text{H}_2\text{PO}_4^-$ como se observa en la Figura 23. Este mecanismo más directo fue inducido mediante cálculos de dinámica molecular dirigida (SMD) los cuales podemos visualizar en la Figura 24 para obtener los sistemas iniciales y finales, para posteriormente relajarlos mediante minimización, calentamiento y equilibrio con restricciones para su uso en cálculos posteriores.

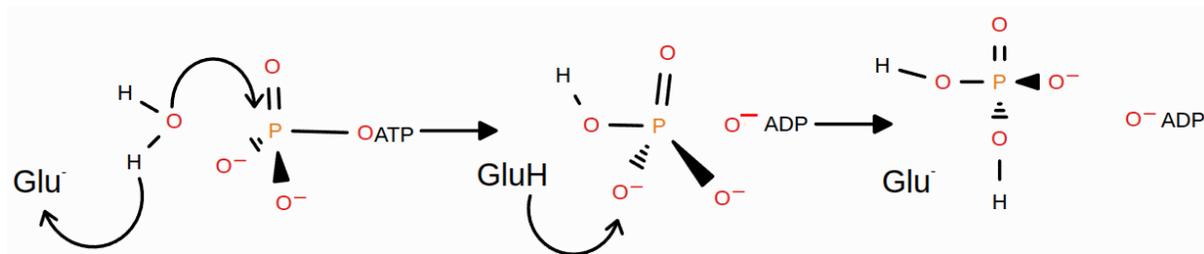


Figura 23. Tercer mecanismo propuesto para la hidrólisis del ATP mediado por una sola molécula de agua y el residuo Glu286.

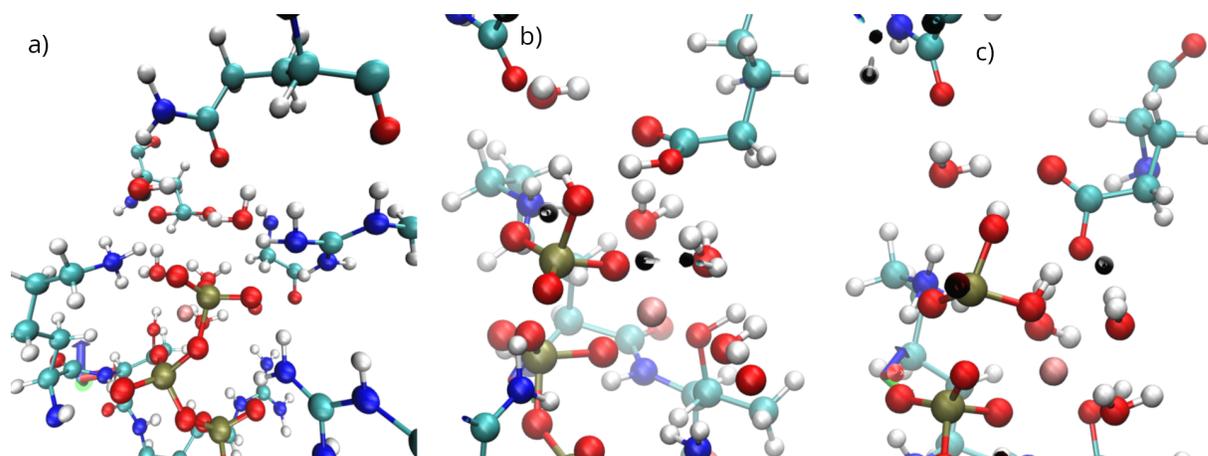


Figura 24. Sistemas obtenidos mediante los cálculos SMD.

Una vez definidos las rutas de reacción, se procedió a realizar el cálculo mediante el método "Adaptive String Method" (ASM), el cual permite obtener el perfil del **Potencial de Fuerza Media** (PMF) a lo largo de la trayectoria de reacción. Esto posibilita cuantificar la barrera energética del proceso de hidrólisis en unidades de kcal/mol.

Para ello, fue necesario definir un conjunto de coordenadas colectivas ("**Collective Variables**", **CVs**) que representarán adecuadamente los eventos químicos involucrados en la reacción. Se seleccionaron seis coordenadas: la **CV1**, correspondiente a la distancia O–H entre el átomo de oxígeno del residuo Glu286 y el hidrógeno de la molécula de agua; la **CV2**, que representa la distancia H–O entre ese mismo hidrógeno y el oxígeno restante de la molécula de agua; la **CV3**, correspondiente a la distancia O–P entre el oxígeno de la molécula de agua y el átomo de fósforo del fosfato terminal; la **CV4**, que es la distancia P–O entre el fósforo del fosfato terminal y el oxígeno puente del ATP; la **CV5**, que representa la distancia O–Mn²⁺ entre un oxígeno del fosfato y el ion Mn²⁺; y finalmente, la **CV6**, correspondiente a la distancia H–O entre el hidrógeno del agua nucleófila y un oxígeno del fosfato.

Estas coordenadas colectivas se ilustran en la Figura 25, en donde se esquematiza el sistema y se identifican con diferentes colores las distancias relevantes para la reacción.

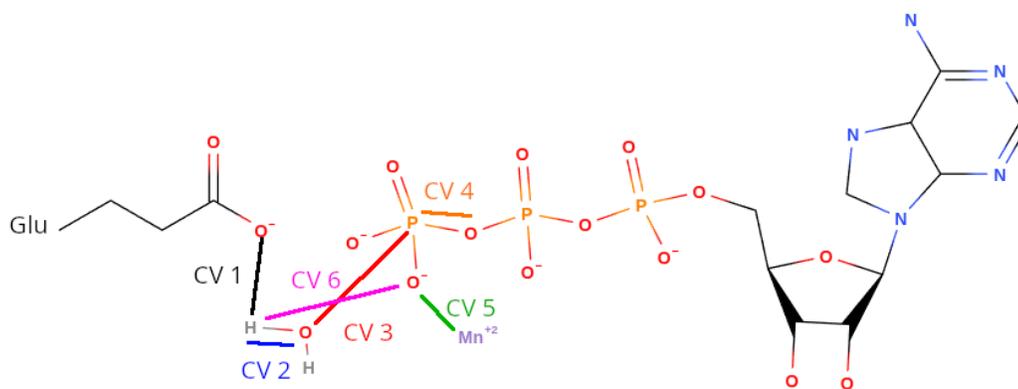


Figura 25. Coordenadas colectivas (CVs) utilizadas para describir el proceso de hidrólisis del ATP durante los cálculos de ASM. Cada CV representa una distancia clave involucrada en la transferencia protónica o en la ruptura/formación de enlaces fosfato.

Para iniciar este cálculo fue necesario redimensionar la región cuántica, seleccionando una nueva delimitación que capturara de forma más precisa los eventos relevantes del proceso de hidrólisis. La región redefinida corresponde a la misma utilizada por García-Martínez et al. (2023), y se ilustra en la Figura 26.

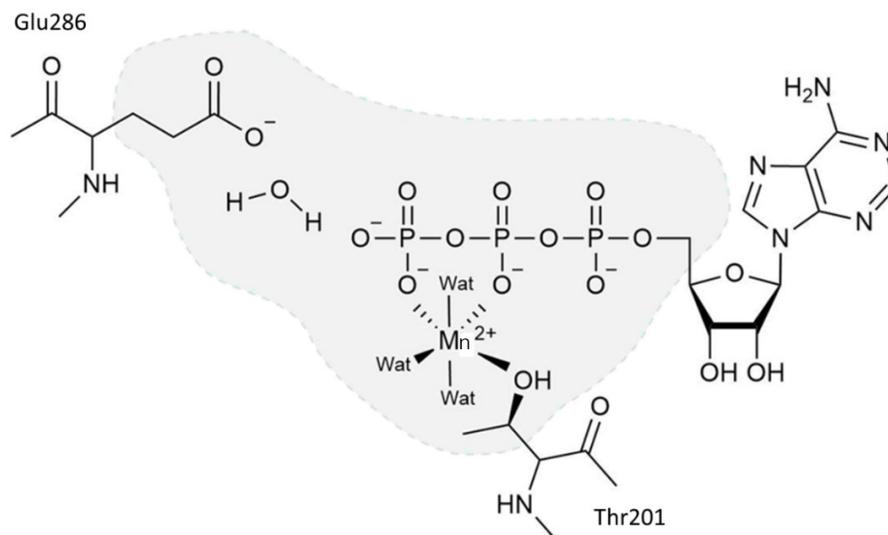


Figura 26. Sección de la nueva región QM; imagen modificada y obtenida de: García-Martínez et al. (2023).

Los cálculos ASM se realizan en dos etapas. La primera corresponde al proceso de optimización, en el cual se busca que los nodos converjan a lo largo de la trayectoria de energía libre mínima. Este proceso debe ser monitoreado constantemente para identificar el momento en que se alcanza la convergencia. En el caso del presente sistema, se observó que la convergencia se logró dentro de los primeros 40,000

pasos; posteriormente, se asignaron 10,000 pasos adicionales con el objetivo de permitir que el sistema se equilibrara adecuadamente. Este comportamiento se puede observar en la Figura 27.

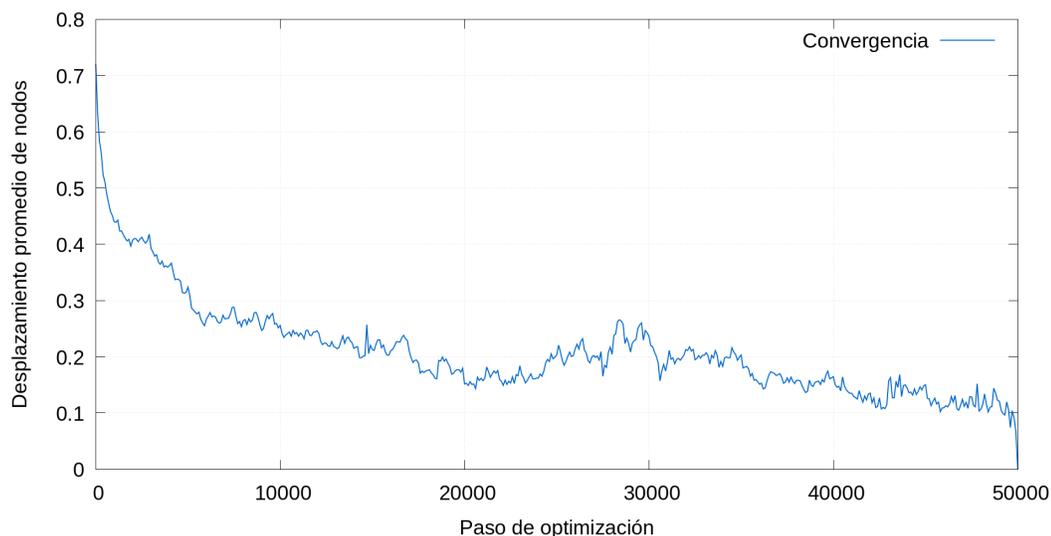


Figura 27. Evolución del proceso de optimización durante el cálculo ASM. Se muestra la convergencia de los nodos a lo largo de los primeros 40,000 pasos, seguida de una etapa de equilibrio de 10,000 pasos adicionales para estabilizar la trayectoria.

Una vez que el sistema ha convergido, se verifica que las incertidumbres reportadas en el archivo "final.PMF" sean menores a 1 kcal/mol, a fin de respaldar la confiabilidad del cálculo. En la Figura 28 se presenta el perfil de energía libre (PMF): la línea púrpura indica el valor medio y las barras verticales representan la incertidumbre estimada en cada punto a lo largo de la coordenada S del camino. En este caso, la barrera energética asociada a la ruptura de la molécula de agua es de 2.60 kcal/mol, diferencia notable respecto al valor de 15.1 kcal/mol reportado por García-Martínez et al. (2023).

Esta discrepancia sugiere que el sistema analizado corresponde a un estado intermedio que no captura completamente el proceso de hidrólisis, dado que se empleó una única trayectoria generada mediante SMD para iniciar el cálculo ASM. Esto limita el muestreo y aumenta la incertidumbre; por ello, sería necesario obtener más trayectorias de SMD (con semillas independientes) para refinar el cálculo.

Esto corresponde a la transición de (a) a (b) mostrada en la Figura 24. El cálculo para el paso (b)→(c) no pudo completarse. No obstante, dado que el pK_a teórico de Glu286 es 4.2 (Grimsley et al., 2009) y el sistema está a pH 7.4 (y que PROPKA 3 estima $pK_a = 3.8$), se espera que este residuo se encuentre mayoritariamente desprotonado. Asimismo, la presencia cercana de HPO_4^- (con oxígenos capaces de aceptar un protón) sugiere que el protón liberado se transferiría hacia dicha especie para formar H_2PO_4^- . De este modo, el sitio catalítico quedaría listo para la entrada de otra molécula de ATP y la repetición

del ciclo (García-Martínez et al., 2023).

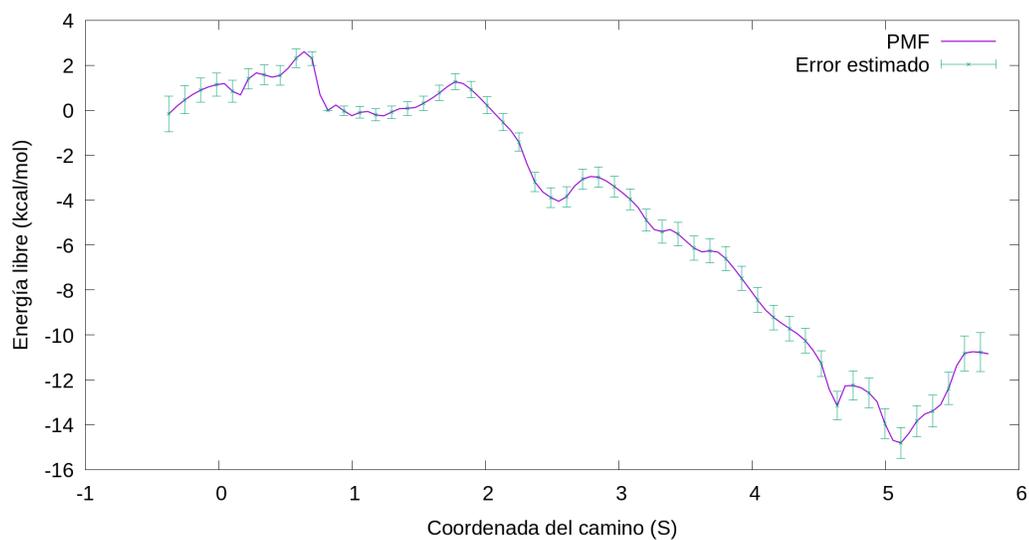


Figura 28. Perfil de energía libre (PMF) obtenido mediante el método ASM. La curva púrpura muestra el valor promedio del PMF, mientras que las líneas verticales representan el error estimado en cada nodo.

Capítulo 5. Conclusiones

Los compuestos CID mostraron un comportamiento coherente con un mecanismo de inhibición competitiva, al unirse de forma estable al sitio de hidrólisis de ATP de la helicasa NS3 del virus del Zika en presencia de un ion Mn^{2+} . Las simulaciones de dinámica molecular confirmaron su capacidad para mantener interacciones clave con residuos catalíticos, preservando una conformación similar a la observada en presencia de ATP. El análisis energético mediante MM-PBSA reveló una buena energía de unión para estos compuestos, siendo CID-2, CID-5, CID-6 y CID-1 los que obtuvieron los valores más favorables siendo de: -23.47 ± 1.20 Kcal/mol, -17.31 ± 1.09 Kcal/mol, -12.31 ± 0.80 Kcal/mol y -1.72 ± 0.64 Kcal/mol, respectivamente. Por otro lado, CID-2, CID-5, CID-7 y CID-9 mostraron el mejor comportamiento estabilizador en el "P-Loop", según los análisis de RMSD y RMSF. En conjunto, estos resultados refuerzan el potencial de los compuestos CID como inhibidores directos, al bloquear la actividad de la helicasa mediante la ocupación del sitio activo, representando así candidatos prometedores para estudios posteriores de optimización y validación experimental.

Por otra parte, los resultados obtenidos para los compuestos AID sugieren que, aunque algunos de ellos podrían inducir cambios estructurales compatibles con un efecto inhibidor alostérico, en la mayoría de los casos no se observó un efecto claro en el sitio activo. Además, varios compuestos no lograron mantenerse en sus dominios de unión previstos, lo cual podría atribuirse al uso de dinámicas aceleradas, que permiten explorar estados conformacionales que normalmente no serían accesibles en escalas de tiempo convencionales. Estos hallazgos refuerzan la idea de que la eficacia de la inhibición alostérica no depende únicamente de una unión estable del ligando, sino también de su capacidad para propagar señales estructurales hacia regiones funcionales críticas de la proteína.

Finalmente, el objetivo original de los cálculos mediante el método "Adaptive String Method" (ASM) era determinar la barrera energética asociada al proceso de hidrólisis del ATP antes y después de un posible cambio alostérico inducido por los compuestos AID. Sin embargo, dado que no se observó un cambio estructural alostérico claro, el estudio se centró únicamente en caracterizar computacionalmente el mecanismo de hidrólisis catalizado por la helicasa en presencia del ion Mn^{2+} mediante simulaciones QM/MM. Este enfoque permitió delinear el perfil de energía libre (PMF) del proceso, con una barrera estimada de 2.60 kcal/mol, en contraste con valores reportados en la literatura. Esta discrepancia sugiere que el sistema analizado podría corresponder a un estado intermedio o reflejar un muestreo insuficiente; dado que el cálculo ASM se inició a partir de una única trayectoria SMD, se recomienda obtener trayectorias adicionales (con semillas independientes) para refinar la estimación.

Como perspectiva de trabajo futuro, proponemos refinar el mecanismo de reacción del proceso de hidrólisis del ATP y la estimación de la barrera de energía libre asociada de múltiples maneras. En primer lugar, se debe repetir la dinámica molecular dirigida (SMD) para garantizar que el punto de partida para la aplicación del método "Adaptive String Method" (ASM) capture correctamente los estados reactivos y los productos. Además, se debe investigar el mecanismo alternativo con dos moléculas de agua (Figura 21) agregando la desprotonación del residuo GluH y comparar las barreras de reacción de los dos mecanismos. Por último, proponemos sustituir el hamiltoniano semiempírico utilizado en los cálculos QM/MM por un hamiltoniano basado en DFT con el fin de aumentar la precisión de la barrera de energía libre de reacción estimada. Se espera que esto dé lugar a una barrera más acorde con los valores típicos de los mecanismos de reacción enzimática y con el valor de 15 kcal/mol que se indica en la bibliografía para la helicasa del virus del Zika con un ion Mg^{2+} en lugar del ion Mn^{2+} en el sitio activo García-Martínez et al. (2023). Un conocimiento exhaustivo del mecanismo de reacción catalítica sentaría las bases para futuros estudios sobre la inhibición alostérica de la actividad catalítica de la helicasa.

Literatura citada

- Abbink, P., Larocca, R. A., De La Barrera, R. A., Bricault, C. A., Moseley, E. T., Boyd, M., Kirilova, M., Li, Z., Ng'ang'a, D., Nanayakkara, O., Nityanandam, R., Mercado, N. B., Borducchi, E. N., Agarwal, A., Brinkman, A. L., Cabral, C., Chandrashekar, A., Giglio, P. B., Jetton, D., Jimenez, J., Lee, B. C., Mojta, S., Molloy, K., Shetty, M., Neubauer, G. H., Stephenson, K. E., Peron, J. P. S., De A Zanotto, P. M., Misamore, J., Finneyfrock, B., Lewis, M. G., Alter, G., Modjarrad, K., Jarman, R. G., Eckels, K. H., Michael, N. L., Thomas, S. J. (2016). Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. *Science*, 353(6304), 1129–1132. <https://doi.org/10.1126/science.aah6157>
- Allen, M. P. (2017). *Computer simulation of liquids* (2a ed.). Oxford university press.
- Anandakrishnan, R., Aguilar, B. (2012). H++ 3.0: automating p k prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. *Nucleic acids research*, 40(W1), W537–W541. <https://doi.org/10.1093/nar/gks375>
- Andrade, M. A., Mottin, M., Sousa, B. K. P., Barbosa, J. A. R. G., dos Santos Azevedo, C., Lasse Silva, C., Gonçalves de Andrade, M., Motta, F. N., Maulay-Bailly, C., Amand, S., de Santana, J. M., Horta Andrade, C., Grellier, P. (2023). Identification of novel zika virus ns3 protease inhibitors with different inhibition modes by integrative experimental and computational approaches. *Biochimie*, 212, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2023.04.004>
- Baroroh, U., Biotek, M., Muscifa, Z. S., Destiarani, W., Rohmatullah, F. G. (2023). Molecular interaction analysis and visualization of protein-ligand docking using biovia discovery studio visualizer. *Indonesian Journal of Computational Biology (IJCB)*, 2(1), 22–30. <https://doi.org/10.24198/ijcb.v2i1.46322>
- Berendsen, H. J., Postma, J. V., Van Gunsteren, W. F., DiNola, A. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of chemical physics*, 81(8), 3684–3690. <https://doi.org/10.1063/1.448118>
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. (2000). The protein data bank. *Nucleic acids research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Bloch, F. (1929). Über die quantenmechanik der elektronen in kristallgittern. *Zeitschrift für physik*, 52(7), 555–600. <https://doi.org/10.1007/BF01339455>
- Blöchl, P. E. (1994). Projector augmented-wave method. *Physical review B*, 50(24), 17953–17979. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.50.17953>
- Bondanza, M., Nottoli, M., Cupellini, L., Lipparini, F. (2020). Polarizable embedding qm/mm: the future gold standard for complex (bio) systems? *Physical Chemistry Chemical Physics*, 22(26), 14433–14448. <https://doi.org/10.1039/D0CP02119A>
- Brooks, B. R., Brucoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S. (1983). Charmm: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of computational chemistry*, 4(2), 187–217. <https://doi.org/10.1002/jcc.540040211>
- Brown, W. C., Akey, D. L., Konwerski, J. R., Tarrasch, J. T., Skiniotis, G., Kuhn, R. J. (2016). Extended surface for membrane association in zika virus ns1 structure. *Nature structural & molecular biology*, 23(9), 865–867. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3268>

- Burley, S. K., Bhatt, R., Bhikadiya, C., Bi, C., Biester, A., Biswas, P., Bittrich, S., Blaumann, S., Brown, R., Chao, H. (2025). Updated resources for exploring experimentally-determined pdb structures and computed structure models at the rcsb protein data bank. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D564–D574. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1091>
- Bussi, G., Donadio, D. (2007). Canonical sampling through velocity rescaling. *The Journal of chemical physics*, 126(1), 014101–014109. <https://doi.org/10.1063/1.2408420>
- Byler, K. G., Ogungbe, I. V. (2016). In-silico screening for anti-zika virus phytochemicals. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 69, 78–91. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2016.08.011>
- Cao, X., Li, Y., Jin, X., Li, Y., Guo, F. (2016). Molecular mechanism of divalent-metal-induced activation of NS3 helicase and insights into Zika virus inhibitor design. *Nucleic Acids Research*, 44, 10505–10514. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw941>
- Case, D. A., Aktulga, H. M., Belfon, K., Cerutti, D. S., Cisneros, G. A., Cruzeiro, V. W. D., Forouzes, N., Giese, T. J., Götz, A. W., Gohlke, H., Izadi, S., Kasavajhala, K., Kaymak, M. C., King, E., Kurtzman, T., Lee, T.-S., Li, P., Liu, J., Luchko, T., Luo, R., Manathunga, M., Machado, M. R., Nguyen, H. M., O'Hearn, K. A., Onufriev, A. V., Pan, F., Pantano, S., Qi, R., Rahnamoun, A., Rishch, A., Schott-Verdugo, S., Shajan, A., Swails, J., Wang, J., Wei, H., Wu, X., Wu, Y., Zhang, S., Zhao, S., Zhu, Q., Cheatham, T. E. I., Roe, D. R., Roitberg, A., Simmerling, C., York, D. M., Nagan, M. C. (2023). AmberTools. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 63(20), 6183–6191. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.3c01153>
- City of Englewood (2025). Frequently asked questions (faq). Consultado el día 12 de Mayo de 2025, <https://www.cityofenglewood.org/FAQ.aspx?QID=134>.
- Clark, D. E. (2011). What has polar surface area ever done for drug discovery? *Future medicinal chemistry*, 3(4), 469–484. <https://doi.org/10.4155/fmc.11.1>
- Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, K. M., Ferguson, D. M., Spellmeyer, D. C., Fox, T., Caldwell, J. W. (1995). A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 117(19), 5179–5197. <https://doi.org/10.1021/ja00124a002>
- Da Silva, S., Oliveira Silva Martins, D. (2018). A review of the ongoing research on zika virus treatment. *Viruses*, 10(5), 255–273. <https://doi.org/10.3390/v10050255>
- Darden, T., York, D., Pedersen, L. (1993). Particle mesh ewald: An $n \log(n)$ method for ewald sums in large systems. *Journal of chemical physics*, 98, 10089–10089. <https://doi.org/10.1063/1.464397>
- Dewar, M. J. (1977). Ground states of molecules. 38. the mndo method. approximations and parameters. *Journal of the American Chemical Society*, 99(15), 4899–4907. <https://doi.org/10.1021/ja00457a004>
- Diacu, F. (1996). The solution of the n -body problem. *Mathematical Intelligencer*, 18(3), 66–70. <https://doi.org/10.1007/BF03024313>
- Dirac, P. A. M. (1927). The physical interpretation of the quantum dynamics. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 113(765), 621–641. <https://doi.org/10.1098/rspa.1927.0012>
- Estoppey, D., Lee, C. M., Janoschke, M., Lee, B. H., Wan, K. F., Dong, H., Mathys, P., Filipuzzi, I., Schuhmann, T., Riedl, R. (2017). The natural product cavinafungin selectively interferes with zika and dengue virus replication by inhibition of the host signal peptidase. *Cell reports*, 19(3), 451–460. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.071>

- Field, M. J., Bash, P. A. (1990). A combined quantum mechanical and molecular mechanical potential for molecular dynamics simulations. *Journal of computational chemistry*, 11(6), 700–733. <https://doi.org/10.1002/jcc.540110605>
- Freitas, D. A., Souza-Santos, R., Carvalho, L. M. A., Barros, W. B., Neves, L. M., Brasil, P. (2020). Congenital zika syndrome: A systematic review. *PLOS ONE*, 15(12), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242367>
- Gao, J., Amara, P., Alhambra, C. (1998). A generalized hybrid orbital (gho) method for the treatment of boundary atoms in combined qm/mm calculations. *The Journal of Physical Chemistry A*, 102(24), 4714–4721. <https://doi.org/10.1021/jp9809890>
- García-Martínez, A., Zinovjev, K., Ruiz-Pernía, J. J. (2023). Conformational changes and atp hydrolysis in zika helicase: the molecular basis of a biomolecular motor unveiled by multiscale simulations. *Journal of the American Chemical Society*, 145(45), 24809–24819. <https://doi.org/10.1021/jacs.3c09015>
- Godoy, A. S., Lima, G. M., Oliveira, K. I., Torres, N. U., Maluf, F. V., Guido, R. V. (2017). Crystal structure of zika virus ns5 rna-dependent rna polymerase. *Nature communications*, 8(1), 14764–14770. <https://doi.org/10.1038/ncomms14764>
- Gordon, J. C., Myers, J. B., Folta, T., Shoja, V., Heath, L. S. (2005). H++: a server for estimating p k as and adding missing hydrogens to macromolecules. *Nucleic acids research*, 33(suppl_2), W368–W371. <https://doi.org/10.1093/nar/gki464>
- Gotz, A. W., Williamson, M. J., Xu, D., Poole, D., Le Grand, S. (2012). Routine microsecond molecular dynamics simulations with amber on gpus. 1. generalized born. *Journal of chemical theory and computation*, 8(5), 1542–1555. <https://doi.org/10.1021/ct200909j>
- Grimme, S., Antony, J., Ehrlich, S. (2010). A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (dft-d) for the 94 elements h-pu. *The Journal of chemical physics*, 132(15), 154104–154124. <https://doi.org/10.1063/1.3382344>
- Grimsley, G. R., Scholtz, J. M. (2009). A summary of the measured pk values of the ionizable groups in folded proteins. *Protein Science*, 18(1), 247–251. <https://doi.org/10.1002/pro.19>
- Groenhof, G. (2013). Biomolecular simulations: Methods and protocols. Humana Press, https://doi.org/10.1007/978-1-62703-017-5_3
- Hamann, D., Schlüter, M. (1979). Norm-conserving pseudopotentials. *Physical review letters*, 43(20), 1494–1497. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.43.1494>
- Hehre, W. J., Stewart, R. F. (1969). Self-consistent molecular-orbital methods. i. use of gaussian expansions of slater-type atomic orbitals. *The Journal of Chemical Physics*, 51(6), 2657–2664. <https://doi.org/10.1063/1.1672392>
- Hohenberg, P. (1964). Inhomogeneous electron gas. *Physical review*, 136(3B), B864–B871. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.136.B864>
- Hopkins, C. W., Le Grand, S., Walker, R. C. (2015). Long-time-step molecular dynamics through hydrogen mass repartitioning. *Journal of chemical theory and computation*, 11(4), 1864–1874. <https://doi.org/10.1021/ct5010406>
- Jarzynski, C. (1997). Equilibrium free-energy differences from nonequilibrium measurements: A master-equation approach. *Physical Review E*, 56(5), 5018–5035. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.56.5018>

- Jorgensen, W. L., Maxwell, D. S. (1996). Development and testing of the opls all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *Journal of the american chemical society*, *118*(45), 11225–11236. <https://doi.org/10.1021/ja9621760>
- Kamberaj, H. (2020). *Molecular dynamics simulations in statistical physics: theory and applications*. Springer, <https://doi.org/10.1007/978-3-030-35702-3>.
- Kastner, J., Carr, J. M., Keal, T. W., Thiel, W., Wander, A. (2009). DL-find: an open-source geometry optimizer for atomistic simulations. *The journal of physical chemistry A*, *113*(43), 11856–11865. <https://doi.org/10.1021/jp9028968>
- Kirkwood, J. G. (1935). Statistical mechanics of fluid mixtures. *The Journal of chemical physics*, *3*(5), 300–313. <https://doi.org/10.1063/1.1749657>
- Kohn, W. (1965). Self-consistent equations including exchange and correlation effects. *Physical review*, *140*(4A), A1133–A1138. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.140.A1133>
- Kresse, G. (1996). Efficient iterative schemes for ab initio total-energy calculations using a plane-wave basis set. *Physical review B*, *54*(16), 11169–11186. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.54.11169>
- Leach, A. R. (2001). *Molecular modelling: principles and applications* (2a ed.). Pearson education.
- Lei, J., Hansen, G., Nitsche, C., Klein, C. D., Zhang, L. (2016). Crystal structure of zika virus ns2b-ns3 protease in complex with a boronate inhibitor. *Science*, *353*(6298), 503–505. <https://doi.org/10.1126/science.aag2419>
- Lezana Fernández, M. , Colín Soto, M. N., Nakamura López, M. , Román Pedroza, J. F., López Santiago, Y. F., Hernández Rivas, L., López Martínez, I., Flores Cisneros, L. A. (2025). Casos confirmados autóctonos de enfermedad por virus del zika por entidad federativa. [Informe epidemiológico semanal No. 28], Secretaría de Salud, México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/1008662/ZIKA_CASOSyEMBZDAS_2025_SE28.pdf.
- Li, Z., Song, L. F., Li, P. (2020). Systematic parametrization of divalent metal ions for the opc3, opc, tip3p-fb, and tip4p-fb water models. *Journal of chemical theory and computation*, *16*(7), 4429–4442. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.0c00194>
- Li, Z., Song, L. F., Li, P. (2021). Parametrization of trivalent and tetravalent metal ions for the opc3, opc, tip3p-fb, and tip4p-fb water models. *Journal of chemical theory and computation*, *17*(4), 2342–2354. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.0c01320>
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, *23*(1-3), 3–25. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1)
- Löwdin, P. O. (1955). Quantum theory of many-particle systems. ii. study of the ordinary hartree-fock approximation. *Physical Review*, *97*(6), 1490–1508. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.97.1490>
- MacKerell, A. D. J., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L. J., Evanseck, J. D., Field, M. J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F. T. K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D. T., Prodhom, B., Reiher, W. E., Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J. C., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiórkiewicz-Kuczera, J., Yin, D. (1998). All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *The journal of physical chemistry B*, *102*(18), 3586–3616. <https://doi.org/10.1021/jp973084f>

- Manathunga, M., Aktulga, H. M., Gotz, A. W. (2023). Quantum mechanics/molecular mechanics simulations on nvidia and amd graphics processing units. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 63(3), 711–717. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.2c01505>
- Manathunga, M., Miao, Y., Mu, D., Gotz, A. W. (2020). Parallel implementation of density functional theory methods in the quantum interaction computational kernel program. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 16(7), 4315–4326. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.0c00290>
- Mao, Q. (2022). An update on placental drug transport and its relevance to fetal drug exposure. *Medical Review*, 2(5), 501–511. <https://doi.org/10.1515/mr-2022-0025>
- Martin, R. M. (2020). *Electronic structure: basic theory and practical methods* (2a ed.). Cambridge university press.
- Miao, Y., Feher, V. A. (2015). Gaussian accelerated molecular dynamics: unconstrained enhanced sampling and free energy calculation. *Journal of chemical theory and computation*, 11(8), 3584–3595. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00436>
- Miao, Y. (2015). Acceleration of high angular momentum electron repulsion integrals and integral derivatives on graphics processing units. *Journal of chemical theory and computation*, 11(4), 1449–1462. <https://doi.org/10.1021/ct500984t>
- Miller III, B. R., McGee Jr, T. D., Swails, J. M., Homeyer, N., Gohlke, H. (2012). Mmpbsa.py: an efficient program for end-state free energy calculations. *Journal of chemical theory and computation*, 8(9), 3314–3321. <https://doi.org/10.1021/ct300418h>
- Monkhorst, H. J. (1976). Special points for brillouin-zone integrations. *Physical review B*, 13(12), 5188–5192. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.13.5188>
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K. (1998). Automated docking using a lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of computational chemistry*, 19(14), 1639–1662. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14%3C1639::AID-JCC10%3E3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14%3C1639::AID-JCC10%3E3.0.CO;2-B)
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. (2009). Autodock4 and autodocktools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Mottin, M., Braga, R. C., Da Silva, R. A., Da Silva, J. H. M., Perryman, A. L., Ekins, S. (2017). Molecular dynamics simulations of Zika virus NS3 helicase: Insights into RNA binding site activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 492(4), 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.070>
- Munawar, A., Beelen, S., Munawar, A., Lescrinier, E. (2018). Discovery of Novel Druggable Sites on Zika Virus NS3 Helicase Using X-ray Crystallography-Based Fragment Screening. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3664–3674. <https://doi.org/10.3390/ijms19113664>
- Musso, D., Roche, C., Robin, E., Nhan, T., Teissier, A. (2015). Potential Sexual Transmission of Zika Virus. *Emerging infectious diseases*, 21(2), 359–361. <https://doi.org/10.3201/eid2102.141363>
- Myers, J., Grothaus, G., Narayanan, S. (2006). A simple clustering algorithm can be accurate enough for use in calculations of pks in macromolecules. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 63(4), 928–938. <https://doi.org/10.1002/prot.20922>

- Olsen, J. M. H., Steinmann, C., Ruud, K. (2015). Polarizable density embedding: A new qm/qm/mm-based computational strategy. *The Journal of Physical Chemistry A*, 119(21), 5344–5355. <https://doi.org/10.1021/jp510138k>
- Organización Mundial de la Salud (2016). Who statement on the first meeting of the international health regulations (2005) (ihr 2005) emergency committee on zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations. Consultado el día 6 de Mayo de 2025, [https://www.who.int/es/news/item/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-\(ihr-2005\)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations](https://www.who.int/es/news/item/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-(ihr-2005)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations).
- Organización Mundial de la Salud (2022). Zika virus. Consultado el día 14 de Mayo de 2025, <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>.
- Organización Mundial de la Salud (2024). Zika epidemiology update – may 2024. Consultado el día 21 de Julio de 2025, de <https://www.who.int/publications/m/item/zika-epidemiology-update-may-2024>.
- Organización Panamericana de la Salud (2022). Zika: la epidemia desconocida y la rápida respuesta de la ops. Consultado el día 4 de Mayo de 2025, <https://www.paho.org/es/historias/zika-epidemia-desconocida-rapida-respuesta-ops>.
- Park, S., Khalili-Araghi, F., Tajkhorshid, E. (2003). Free energy calculation from steered molecular dynamics simulations using jarzynski's equality. *The Journal of chemical physics*, 119(6), 3559–3566. <https://doi.org/10.1063/1.1590311>
- Parra, B., Lizarazo, J., Jiménez-Arango, J. A., Zea-Vera, A. F., González-Manrique, G., Vargas, J., Angarita, J. A., Zuñiga, G., Lopez-Gonzalez, R., Beltran, C. L., Rizcala, K. H., Morales, M. T., Pacheco, O., Ospina, M. L., Kumar, A., Cornblath, D. R., Muñoz, L. S., Osorio, L., Barreras, P. (2016). Guillain-Barré Syndrome Associated with Zika Virus Infection in Colombia. *New England Journal of Medicine*, 375(16), 1513–1523. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1605564>
- Pathria, R. K. (2011). *Statistical Mechanics* (3a ed.). Elsevier Ltd.
- Perdew, J. P., Burke, K. (1996). Generalized gradient approximation made simple. *Physical review letters*, 77(18), 3865–3868. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.77.3865>
- Perdew, J. P. (1992). Accurate and simple analytic representation of the electron-gas correlation energy. *Physical review B*, 45(23), 13244–13249. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.45.13244>
- Petterson, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. (2004). Ucsf chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Philipp, D. M. (1999). Mixed ab initio qm/mm modeling using frozen orbitals and tests with alanine dipeptide and tetrapeptide. *Journal of computational chemistry*, 20(14), 1468–1494. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19991115\)20:14%3C1468::AID-JCC2%3E3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19991115)20:14%3C1468::AID-JCC2%3E3.0.CO;2-0)
- Ponder, J. W. (2003). Force fields for protein simulations. *Advances in protein chemistry*, 66, 27–85. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(03\)66002-X](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(03)66002-X)
- Price, D. J. (2004). A modified tip3p water potential for simulation with ewald summation. *The Journal of chemical physics*, 121(20), 10096–10103. <https://doi.org/10.1063/1.1808117>

- Proksch, E. (2018). pH in nature, humans and skin. *The Journal of dermatology*, 45(9), 1044–1052. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.14489>
- Ramharack, P., Oguntade, S. (2017). Delving into zika virus structural dynamics—a closer look at ns3 helicase loop flexibility and its role in drug discovery. *RSC advances*, 7(36), 22133–22144. <https://doi.org/10.1039/C7RA01376K>
- Rapaport, D. (1999). Molecular dynamics simulation. *Computing in Science Engineering*, 1(1), 70–71. <https://doi.org/10.1109/5992.743625>
- Rasmussen, S. A., Jamieson, D. J., Honein, M. A. (2016). Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality. *New England Journal of Medicine*, 374(20), 1981–1987. <https://doi.org/10.1056/nejmsr1604338>
- Raubenolt, B. A., Wong, K. (2021). Molecular dynamics simulations of allosteric motions and competitive inhibition of the Zika virus helicase. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 108, 108001–108013. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2021.108001>
- Riccardi, D., Schaefer, P., Yang, Yu, H., Ghosh, N., Prat-Resina, X., König, P., Li, G., Xu, D., Guo, H. (2006). Development of effective quantum mechanical/molecular mechanical (qm/mm) methods for complex biological processes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(13), 6458–6469. <https://doi.org/10.1021/jp056361o>
- Roe, D. R. (2013). Ptraaj and cptraaj: software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *Journal of chemical theory and computation*, 9(7), 3084–3095. <https://doi.org/10.1021/ct400341p>
- Salomon-Ferrer, R., Case, D. A. (2013a). An overview of the amber biomolecular simulation package. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 3(2), 198–210. <https://doi.org/10.1002/wcms.1121>
- Salomon-Ferrer, R., Gotz, A. W., Poole, D., Le Grand, S. (2013b). Routine microsecond molecular dynamics simulations with amber on gpus. 2. explicit solvent particle mesh ewald. *Journal of chemical theory and computation*, 9(9), 3878–3888. <https://doi.org/10.1021/ct400314y>
- Schneider, T. (1978). Molecular-dynamics study of a three-dimensional one-component model for distortive phase transitions. *Physical Review B*, 17(3), 1302–1322. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.17.1302>
- Secretaría de Salud (2016). Infección por virus zika. Consultado el día 4 de Mayo de 2025, de <https://www.gob.mx/salud/prensa/infeccion-por-virus-zika>.
- Sengupta, A., Li, Z., Song, L. F., Li, P. (2021). Parameterization of monovalent ions for the opc3, opc, tip3p-fb, and tip4p-fb water models. *Journal of chemical information and modeling*, 61(2), 869–880. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c01390>
- Senn, H. M. (2009). Qm/mm methods for biomolecular systems. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(7), 1198–1229. <https://doi.org/10.1002/anie.200802019>
- Shajan, A., Manathunga, M., Gotz, A. W. (2023). Geometry optimization: a comparison of different open-source geometry optimizers. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 19(21), 7533–7541. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.3c00188>

- Shan, C., Muruato, A. E., Nunes, B. T. D., Luo, H., Xie, X., Medeiros, D. B. A., Wakamiya, M., Tesh, R. B., Barrett, A. D., Wang, T., Weaver, S. C., Vasconcelos, P. F. C., Rossi, S. L. (2017). A live-attenuated Zika virus vaccine candidate induces sterilizing immunity in mouse models. *Nature Medicine*, 23(6), 763–767. <https://doi.org/10.1038/nm.4322>
- Shirts, M. R. (2008). Statistically optimal analysis of samples from multiple equilibrium states. *The Journal of chemical physics*, 129(12), 124105–124116. <https://doi.org/10.1063/1.2978177>
- Sommerfeld, T. (2011). Lorentz trial function for the hydrogen atom: a simple, elegant exercise. *Journal of Chemical Education*, 88(11), 1521–1524. <https://doi.org/10.1021/ed200040e>
- Song, K., Liu, X., Huang, W., Lu, S., Shen, Q., Zhang, L. (2017). Improved method for the identification and validation of allosteric sites. *Journal of chemical information and modeling*, 57(9), 2358–2363. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.7b00014>
- Stewart, J. J. (1989). Optimization of parameters for semiempirical methods i. method. *Journal of computational chemistry*, 10(2), 209–220. <https://doi.org/10.1002/jcc.540100208>
- Swope, W. C., Andersen, H. C., Berens, P. H. (1982). A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules: Application to small water clusters. *The Journal of chemical physics*, 76(1), 637–649. <https://doi.org/10.1063/1.442716>
- Szabo, A. (1996). *Modern quantum chemistry: introduction to advanced electronic structure theory*. Courier Corporation.
- Tian, C., Kasavajhala, K., Belfon, K. A., Raguette, L., Huang, H., Miguez, A. N., Bickel, J., Wang, Y., Pincay, J., Wu, Q. (2019). ff19sb: amino-acid-specific protein backbone parameters trained against quantum mechanics energy surfaces in solution. *Journal of chemical theory and computation*, 16(1), 528–552. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00591>
- Tian, H., Ji, X., Yang, X., Zhang, Z., Lu, Z., Yang, K., Chen, C., Zhao, Q., Chi, H., Mu, Z. (2016). Structural basis of zika virus helicase in recognizing its substrates. *Protein & cell*, 7(8), 562–570. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0293-2>
- Tian, H., Xiao, S., Jiang, X. (2023). Passer: fast and accurate prediction of protein allosteric sites. *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W427–W431. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad303>
- Tuckerman, M. E. (2023). *Statistical mechanics: theory and molecular simulation* (2a ed.). Oxford university press.
- Van Den Elsen, K., Chew, B. L. A., Ho, J. S. (2023). Flavivirus nonstructural proteins and replication complexes as antiviral drug targets. *Current Opinion in Virology*, 59, 101305–101314. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2023.101305>
- Vanderbilt, D. (1990). Soft self-consistent pseudopotentials in a generalized eigenvalue formalism. *Physical review B*, 41(11), 7892–7895. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.41.7892>
- Verlet, L. (1967). Computer "experiments" on classical fluids. i. thermodynamical properties of lennard-jones molecules. *Physical review*, 159(1), 98–103. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.159.98>
- Wang, D. P., Wang, M. Y., Li, Y. M., Shu, W., Cui, W., Jiang, F. Y., Zhou, X., Wang, W. M. (2022a). Crystal structure of the ilheus virus helicase: implications for enzyme function and drug design. *Cell Bioscience*, 12(1), 2045–3701. <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00777-8>

- Wang, J., Arantes, P. R., Bhattarai, A., Hsu, R. V., Pawnikar, S., Huang, Y. M. M., Palermo, G. (2021). Gaussian accelerated molecular dynamics: Principles and applications. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 11(5), e1521–e1552. <https://doi.org/10.1002/wcms.1521>
- Wang, J., Wang, W., Kollman, P. A. (2006). Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *Journal of molecular graphics and modelling*, 25(2), 247–260. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2005.12.005>
- Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A. (2004). Development and testing of a general amber force field. *Journal of computational chemistry*, 25(9), 1157–1174. <https://doi.org/10.1002/jcc.20035>
- Wang, Y., Ling, L., Zhang, Z. (2022b). Current Advances in Zika Vaccine Development. *Vaccines*, 10(11), 1816–1828. <https://doi.org/10.3390/vaccines10111816>
- Warshel, A. (1976). Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *Journal of molecular biology*, 103(2), 227–249. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(76\)90311-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(76)90311-9)
- Xu, B., Lee, E. M., Medina, A., Sun, X., Wang, D., Tang, H. (2020). Inhibition of zika virus infection by fused tricyclic derivatives of 1, 2, 4, 5-tetrahydroimidazo [1, 5-a] quinolin-3 (3ah)-one. *Bioorganic chemistry*, 104, 104205–104209. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104205>
- Xu, S., Ci, Y., Wang, L., Yang, Y., Zhang, L., Xu, C., Qin, C. (2019). Zika virus NS3 is a canonical RNA helicase stimulated by NS5 RNA polymerase. *Nucleic Acids Research*, 47(16), 8693–8707. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz650>
- Yang, X., Chen, C., Tian, H., Chi, H., Mu, Z., Zhang, T., Yang, K., Zhao, Q., Liu, X., Wang, Z. (2018). Mechanism of atp hydrolysis by the zika virus helicase. *The FASEB Journal*, 32(10), 5250–5257. <https://doi.org/10.1096/fj.201701140R>
- Ylilauri, M. (2013). Mmgbsa as a tool to understand the binding affinities of filamin–peptide interactions. *Journal of chemical information and modeling*, 53(10), 2626–2633. <https://doi.org/10.1021/ci4002475>
- Zinovjev, K. (2017). Adaptive finite temperature string method in collective variables. *The Journal of Physical Chemistry A*, 121(51), 9764–9772. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.7b10842>
- Zwanzig, R. W. (1954). High-temperature equation of state by a perturbation method. i. nonpolar gases. *The Journal of Chemical Physics*, 22(8), 1420–1426. <https://doi.org/10.1063/1.1740409>

Anexos

A Acoplamiento molecular

Los acoplamientos se realizan a través de una función de puntaje, en la cual se utiliza un campo de fuerza semiempírico que evalúa la unión en dos pasos. El ligando y la proteína inician en un estado en el cual no se encuentran unidos. El primer paso estima la energía intramolecular para la transición de los estados no enlazados hacia el sistema del ligando y proteína enlazados. El segundo paso evalúa la energía intermolecular del complejo (Ligando-Proteína) en su conformación unida. El campo de fuerza incluye seis evaluaciones por pares (V) y una estimación de la entropía conformacional que se pierde en la unión (ΔS_{conf}):

$$\Delta G = (V_{enlace}^{L-L} - V_{no-enlace}^{L-L}) + (V_{enlace}^{P-P} - V_{no-enlace}^{P-P}) + (V_{enlace}^{P-L} - V_{no-enlace}^{P-L}) + \Delta S_{conf} \quad (58)$$

donde L se refiere al ligando y P a la proteína en un cálculo de acoplamiento ligando-proteína.

Cada uno de los términos energéticos por pares incluye evaluaciones de dispersión/repulsión, enlace de hidrógeno, electrostática y desolvatación:

$$V = W_{vdw} \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{hbond} \sum_{i,j} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{e(r_{ij}) r_{ij}} + W_{solv} \sum_{i,j} (S_i V_j + S_j V_i) \exp \left(-\frac{r_{ij}^2}{2\sigma^2} \right) \quad (59)$$

Las constantes W se han optimizado para calibrar la energía libre empírica basándose en un conjunto de constantes de enlace determinadas experimentalmente. El primer término es un potencial 6/12 típico para las interacciones de dispersión/repulsión; sus parámetros se basan en el campo de fuerza Amber. El segundo término es un potencial direccional de enlace de hidrógeno basado en un potencial 10/12. Los parámetros C y D se asignan para dar una profundidad máxima de 5 kcal/mol a 1.9 Å para enlaces de hidrógeno con oxígeno y nitrógeno, y una profundidad de 1 kcal/mol a 2.5 Å para enlaces de hidrógeno con azufre. La función $E(t)$ proporciona la direccionalidad basada en el ángulo t de la geometría ideal de los enlaces de hidrógeno. El tercer término es un potencial de Coulomb para las interacciones electrostáticas. El último término es un potencial de desolvatación basado en el volumen de los átomos (V) que rodean a un átomo dado y lo protegen del disolvente, ponderado por un parámetro de solvatación (S) y un término exponencial con un factor de peso de distancia $\sigma = 3.5$ Å (Morris et al., 2009).

AutoDock utiliza un método basado en una cuadrícula que permite evaluar rápidamente la energía

de enlace de las conformaciones de prueba. En este método, la proteína objetivo se incrusta en una cuadrícula tridimensional. A continuación, se coloca secuencialmente un átomo de prueba en cada punto de la cuadrícula, se calcula la energía de interacción entre la prueba y el objetivo, y el valor se almacena en la cuadrícula.

El método principal para la búsqueda conformacional es un algoritmo genético lamarckiano (Morris et al., 1998). Se crea una población de conformaciones de prueba y, en generaciones sucesivas, estos individuos mutan, intercambian parámetros conformacionales y compiten de forma análoga a la evolución biológica, seleccionando finalmente a los individuos con menor energía de enlace. El aspecto lamarckiano es una característica añadida que permite a las conformaciones individuales buscar en su espacio conformacional local, encontrar mínimos locales y transmitir esta información a generaciones posteriores.

B Dinámica molecular acelerada gaussiana

Gaussian Accelerated Molecular Dynamics (GaMD) es un método de muestreo mejorado que permite explorar de forma eficiente la superficie de energía libre de sistemas biomoleculares complejos, superando las limitaciones de las simulaciones de dinámica molecular convencional (cMD). GaMD introduce un potencial de refuerzo armónico que suaviza la superficie de energía potencial del sistema, reduciendo así las barreras de energía que restringen las transiciones conformacionales de baja frecuencia.

El principio fundamental de GaMD es añadir un potencial de refuerzo (*boost potential*) cuando la energía potencial del sistema es menor que un umbral definido, generando un sesgo que sigue una distribución gaussiana. Este diseño garantiza que el sesgo añadido permita una exploración más rápida de los estados de baja energía sin alterar el orden relativo de los estados conformacionales, lo que preserva la física del sistema.

Una ventaja clave de GaMD frente a métodos tradicionales basados en variables colectivas (CVs) es que no requiere definir previamente coordenadas de reacción o CVs. Esta característica elimina la dependencia de información a priori del sistema, lo que resulta especialmente útil para estudiar procesos biológicos complejos donde las coordenadas relevantes no siempre son obvias.

Para recuperar paisajes de energía libre precisos del muestreo sesgado, GaMD utiliza una expansión de cumulantes de segundo orden (*"aproximación gaussiana"*) que permite reponderar las trayectorias simuladas. Este procedimiento de reponderación corrige el efecto del potencial de refuerzo, reconstruyendo la distribución canónica original de energías libres con alta precisión y reduciendo el ruido estadístico característico de otras variantes de aMD.

Además, se han desarrollado extensiones de GaMD para aplicaciones específicas, como el *Replica Exchange GaMD* (rex-GaMD) y el *Ligand Gaussian Accelerated Molecular Dynamics* (LiGaMD). Estas variantes combinan GaMD con esquemas de intercambio de réplicas o refuerzos selectivos para ligandos, mejorando aún más el muestreo de eventos raros como la unión y disociación de ligandos o péptidos altamente flexibles, con una precisión notable en la determinación de termodinámica y cinética de unión.

C Dinámica molecular dirigida

La técnica de *Steered Molecular Dynamics* (SMD) es un método de dinámica molecular dirigida que permite explorar procesos de transición a lo largo de coordenadas de reacción o caminos de disociación mediante la aplicación de una fuerza externa controlada. En esta aproximación, se aplica una restricción armónica que arrastra uno o varios átomos seleccionados a lo largo de una trayectoria predefinida con una velocidad constante, mientras que el resto del sistema evoluciona de forma natural bajo la influencia del campo de fuerza.

El principio de SMD se basa en acoplar un potencial de resorte al átomo o grupo de interés, de modo que la posición objetivo del resorte se desplace gradualmente con el tiempo. Esta estrategia permite inducir eventos raros o de alta barrera energética, como la ruptura de enlaces, la disociación de ligandos o la apertura de canales, que en simulaciones no dirigidas serían poco probables debido a las escalas de tiempo limitadas.

El trabajo realizado sobre el sistema durante la trayectoria SMD puede fluctuar entre diferentes réplicas debido a la naturaleza estocástica de la dinámica molecular. Para relacionar este trabajo no reversible con la energía libre de transición, se emplea la relación de Jarzynski. Esta relación establece que la energía libre de cambio entre dos estados puede estimarse a partir de un promedio exponencial del trabajo realizado en múltiples trayectorias independientes, siguiendo la expresión:

$$\Delta G = -k_B T \ln \left\langle e^{-W/k_B T} \right\rangle \quad (60)$$

donde ΔG es la diferencia de energía libre entre los estados inicial y final, W es el trabajo mecánico aplicado a lo largo de cada trayectoria de SMD, k_B es la constante de Boltzmann y T la temperatura. El promedio $\langle \dots \rangle$ se realiza sobre un conjunto de réplicas independientes para garantizar la convergencia estadística.

La relación de Jarzynski es especialmente valiosa porque permite recuperar un valor de energía libre de un proceso irreversiblemente inducido, siempre que se disponga de un número suficiente de trayectorias para muestrear la distribución de trabajos con precisión. En la práctica, la elección de la velocidad de arrastre y la constante del resorte es un compromiso entre minimizar la disipación de energía y mantener un tiempo de simulación razonable (Park et al., 2003; Jarzynski, 1997).

Para este método se aplicaron restricciones de distancia a ciertos átomos, incluidas moléculas de agua del entorno, a fin de estabilizar el ión divalente Mn^{2+} y su coordinación. Además, se considero las variables de raccion (i) la transferencia del hidrógeno desde la molécula de agua hacia Glu286 y (ii) la aproximación del oxígeno de dicha agua al grupo fosfato. Se empleó una constante de fuerza de 150 kcal/mol.

D Método de cuerdas adaptativo

El método *Adaptive String Method* (ASM) es una versión mejorada del método string original, desarrollada para localizar caminos de mínima energía libre (MFEP, por sus siglas en inglés) en espacios definidos por variables colectivas (CVs). Este enfoque resulta especialmente útil para describir procesos complejos en fase condensada, como reacciones químicas o transiciones conformacionales, donde es inviable muestrear exhaustivamente la superficie de energía libre multidimensional debido a la llamada “maldición de la dimensionalidad”.

El principio central de los métodos basados en caminos es que el proceso más probable de transición entre estados reactivos y productos se restringe a una “tubo de reacción” angosto en el espacio de variables colectivas. De este modo, toda la información esencial del proceso puede proyectarse sobre una trayectoria representativa, reduciendo la dimensionalidad efectiva del problema y permitiendo construir un perfil de energía libre de reacción (PMF) unidimensional.

El ASM combina la optimización dinámica de la trayectoria (la string) con la recolección eficiente de datos para calcular el perfil de energía libre. Para ello, la trayectoria se representa como un conjunto de nodos o puntos que se distribuyen entre el estado reactivo y el producto, cada uno de los cuales se mantiene cerca de su posición objetivo mediante un potencial de restricción armónico. A diferencia del método string clásico, ASM introduce una matriz de sesgo adaptativa que permite orientar el volumen de muestreo (elipsoide de sesgo) a lo largo de la dirección tangente a la trayectoria, mejorando la convergencia y asegurando un muestreo uniforme a lo largo del camino.

Una de las principales innovaciones del ASM es la optimización “on-the-fly” de parámetros clave como las posiciones de los nodos y las constantes de fuerza de restricción paralelas y ortogonales a la trayectoria. Este ajuste dinámico garantiza que cada nodo muestree de forma equilibrada su región local. Para maximizar la eficiencia del muestreo, ASM utiliza la técnica de *Hamiltonian Replica Exchange* (H-REMD). En este esquema, múltiples réplicas del sistema se simulan en paralelo, cada una con parámetros de sesgo ligeramente distintos (por ejemplo, posiciones de nodo y constantes de fuerza), y se permiten intercambios periódicos de configuraciones entre réplicas. Estos intercambios promueven una exploración más completa del espacio de configuraciones, evitan atrapamientos en mínimos locales y aceleran la convergencia hacia el MFEP.

Una vez que la trayectoria se ha optimizado, esta se emplea como coordenada de reacción para cálculos de perfil de energía libre mediante técnicas como *Umbrella Sampling* o *Hamiltonian Replica Exchange*

Umbrella Sampling, desacoplando la optimización del camino de la estimación precisa del PMF y mejorando la robustez del método frente a coordenadas de reacción subóptimas. Los parámetros optimizados durante la simulación se usan directamente como ventanas de muestreo, reduciendo significativamente la intervención manual.

Otra característica destacable del ASM es la posibilidad de restringir explícitamente el muestreo en direcciones ortogonales al camino de reacción mediante la constante de fuerza ortogonal, K_{\perp} . Dependiendo de su valor, el método puede interpolar entre el camino de mínima energía libre (MFEP) y la curva principal promedio del proceso, lo cual es útil para sistemas con superficies de energía libre rugosas o tubos de reacción de anchura variable.

E Desviación cuadrática media, Fluctuación cuadrática media

El *Root Mean Square Deviation* (RMSD) se calcula para cuantificar el desplazamiento promedio de los átomos seleccionados con respecto a una estructura de referencia. Para cada fotograma de la trayectoria, la proteína se alinea típicamente sobre su columna vertebral (*backbone*) para eliminar traslaciones y rotaciones globales, y posteriormente se calcula la desviación de los átomos pesados (no hidrógeno) del ligando o la proteína según corresponda. De esta forma, valores bajos y estables de RMSD indican que la conformación permanece cercana a la estructura de referencia, mientras que aumentos o fluctuaciones bruscas pueden reflejar cambios conformacionales significativos.

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \hat{x}_i)^2}{N}} \quad (61)$$

La ecuación 61 define el cálculo de la desviación cuadrática media (*Root Mean Square Deviation*, RMSD). En ella, x_i representa la posición del átomo i en un fotograma de la trayectoria simulada, mientras que \hat{x}_i es la posición de referencia de ese mismo átomo, normalmente obtenida de la estructura inicial o de una estructura promedio alineada. El sumatorio recorre todos los N átomos considerados en el cálculo (por ejemplo, todos los átomos del *backbone* o solo los átomos pesados del ligando).

El término $(x_i - \hat{x}_i)^2$ expresa la desviación al cuadrado de cada átomo respecto a su posición de referencia. Al sumar sobre todos los átomos y dividir por el número total N , se obtiene el promedio de estas desviaciones cuadráticas. Finalmente, la raíz cuadrada convierte este valor en una medida en unidades de distancia (Å), que refleja el desplazamiento promedio de los átomos analizados.

Por otro lado, el *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF) evalúa la fluctuación promedio de cada átomo o residuo alrededor de su posición media a lo largo de toda la trayectoria. Esta métrica permite identificar regiones flexibles o dinámicamente inestables de la molécula, tales como bucles, extremos N- y C-terminales, o sitios de unión que pueden presentar movilidad funcional.

El cálculo se realiza promediando las desviaciones cuadráticas de cada átomo individual respecto a su posición promedio tras la alineación estructural, como se muestra en la ecuación 62 (Salomon-Ferrer et al., 2013a):

$$RMSF_i = \sqrt{\langle (x_i - \langle x_i \rangle)^2 \rangle} \quad (62)$$

En esta expresión, x_i representa la posición instantánea del átomo i en cada fotograma de la trayectoria, mientras que $\langle x_i \rangle$ es la posición promedio de ese mismo átomo calculada a lo largo de toda la simulación. El término $(x_i - \langle x_i \rangle)^2$ refleja la desviación cuadrática de cada posición respecto a su media. El símbolo $\langle \dots \rangle$ denota el promedio sobre todos los fotogramas de la trayectoria. De esta forma, el RMSF proporciona una medida en unidades de distancia (Å) de la flexibilidad local de cada átomo o residuo.

F Mecánica molecular área superficial de Poisson-Boltzmann

Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area (MMPBSA.py) es un programa incluido en AmberTools diseñado para realizar cálculos de energías libres de unión mediante el método MM-PBSA (Molecular Mechanics Poisson–Boltzmann Surface Area) o MM-GBSA (Generalized Born Surface Area). Estos métodos son de tipo *end-state*, lo que significa que calculan la energía libre como diferencia entre los estados enlazado y no enlazado, sin necesidad de simular explícitamente estados intermedios.

El script automatiza la obtención de las energías libres de unión ($\Delta G_{binding}$) promediando sobre un conjunto de conformaciones extraídas de una trayectoria de dinámica molecular. Cada fotograma es tratado como una estructura representativa y para cada una se calculan energías individuales que luego se promedian. En términos generales, el cálculo se basa en el siguiente esquema termodinámico:

$$\Delta G_{binding} = G_{complejo} - (G_{receptor} + G_{ligando}) \quad (63)$$

Cada término G se estima como:

$$G = E_{gas} + G_{solv} - TS \quad (64)$$

En esta relación, E_{gas} corresponde a la energía mecánica molecular calculada a partir del campo de fuerza, incluyendo términos de enlaces, ángulos, dihedros y contribuciones no enlazadas. La energía de solvatación G_{solv} se determina mediante modelos de solvatación implícitos, como Poisson–Boltzmann, Generalized Born o RISM, que permiten estimar la interacción del sistema con el solvente sin representar moléculas de agua de forma explícita. La contribución entrópica (TS) puede aproximarse utilizando análisis de modos normales o una aproximación quasi-armónica, dependiendo de los recursos computacionales disponibles y la precisión deseada.

El flujo de trabajo de MMPBSA.py suele comenzar con la preparación de archivos de topología consistentes para el complejo, el receptor y el ligando, tarea que puede facilitarse con el uso de ante-MMPBSA.py. Posteriormente, se extraen los fotogramas de la trayectoria de dinámica molecular y se realizan los cálculos de energía para cada uno de ellos mediante herramientas como sander o pbsa, aplicando el modelo de solvatación implícito elegido. Finalmente, los resultados se promedian para reportar la energía libre de unión junto con sus desviaciones estándar, ofreciendo así una estimación robusta basada en múltiples estados representativos.

Para construir los conjuntos de estructuras necesarios, se pueden emplear dos protocolos: el protocolo de trayectoria única (*Single Trajectory Protocol*, STP), que utiliza una única simulación del complejo enlazado para derivar las conformaciones del complejo, receptor y ligando, asegurando la cancelación exacta de términos internos; o bien el protocolo de trayectorias múltiples (*Multiple Trajectory Protocol*, MTP), que utiliza simulaciones independientes para cada estado, lo que resulta útil si se esperan diferencias estructurales significativas entre los estados enlazado y no enlazado.

Adicionalmente, MMPBSA.py permite realizar descomposición de energía por residuo o por pares de residuos, identificar interacciones clave mediante escaneo de alanina y estimar la contribución entrópica a través de modos normales o aproximaciones quasi-armónicas. El programa también ofrece soporte para ejecución paralela a través de MMPBSA.py.MPI, distribuyendo los fotogramas entre varios procesadores para acelerar los cálculos, especialmente cuando se analizan sistemas de gran tamaño o trayectorias extensas (Miller III et al., 2012).

G Mapas de interacción

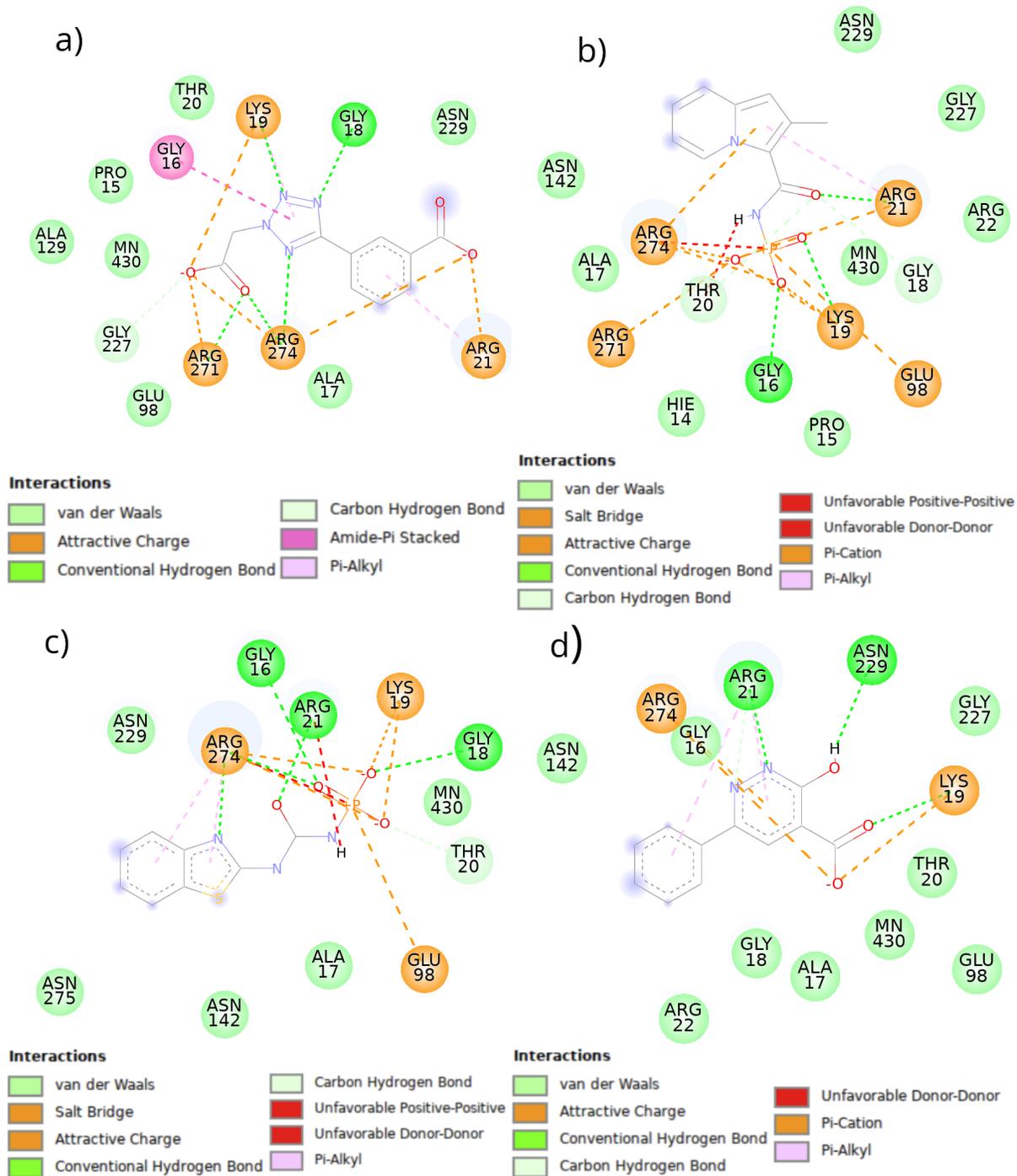


Figura 29. Diagramas de interacción 2D de la proteína 5GJC y los compuestos a) CID-1, b) CID-2, c) CID-3, d) CID-4.

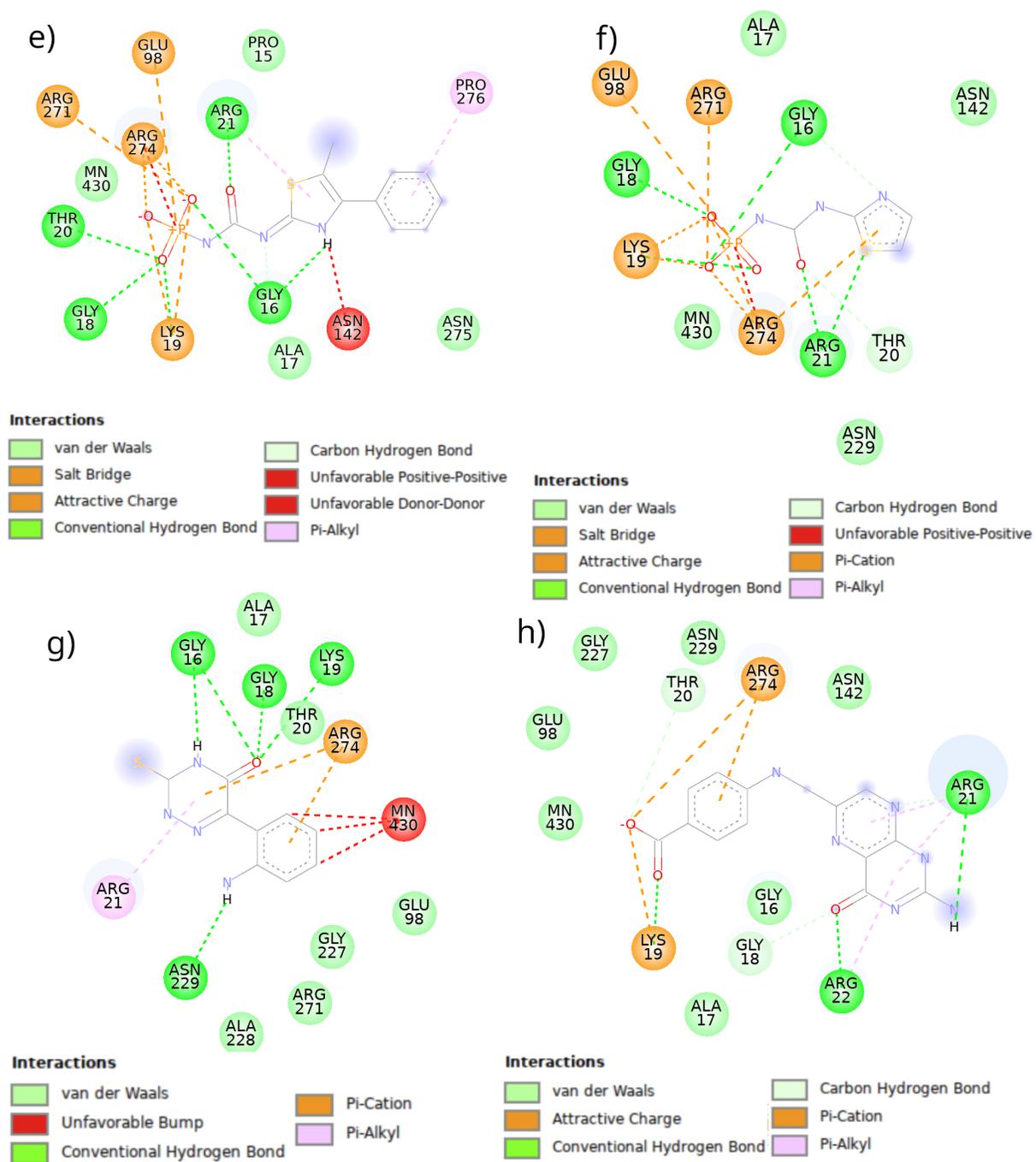


Figura 30. Diagramas de interacción 2D de la proteína 5GJC y los compuestos e) CID-5, f) CID-6, g) CID-7, h) CID-8.

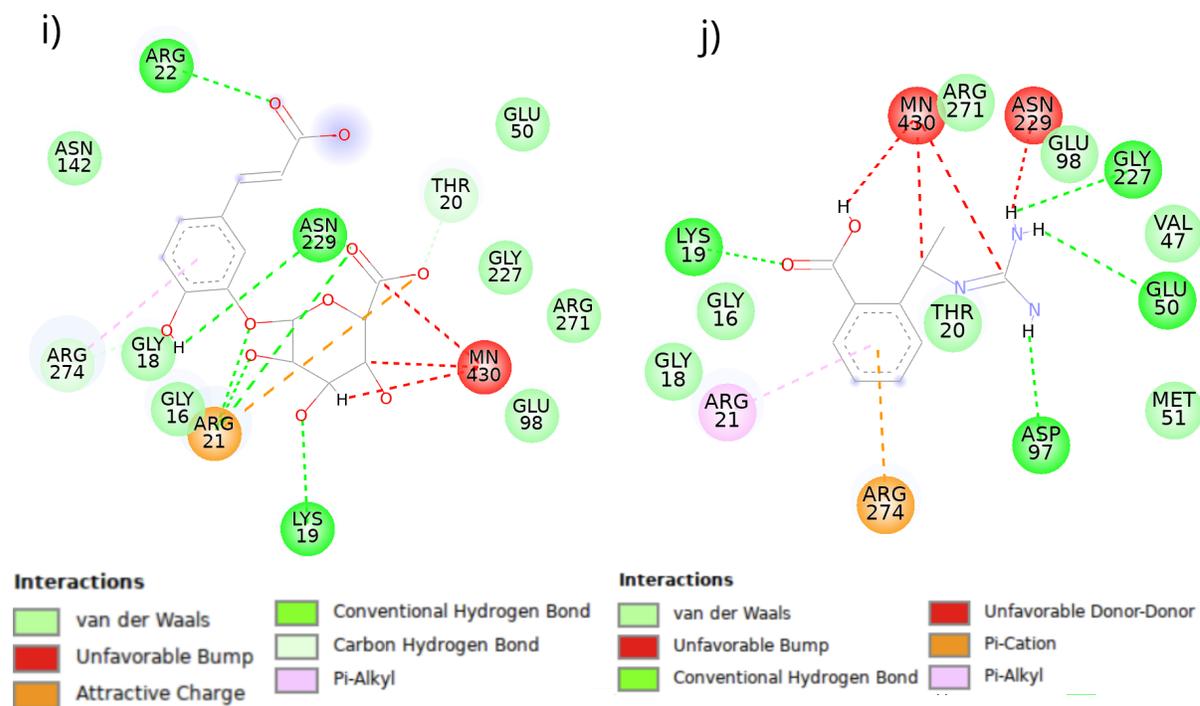


Figura 31. Diagramas de interacción 2D de la proteína 5GJC y los compuestos i) CID-9, j) CID-10.

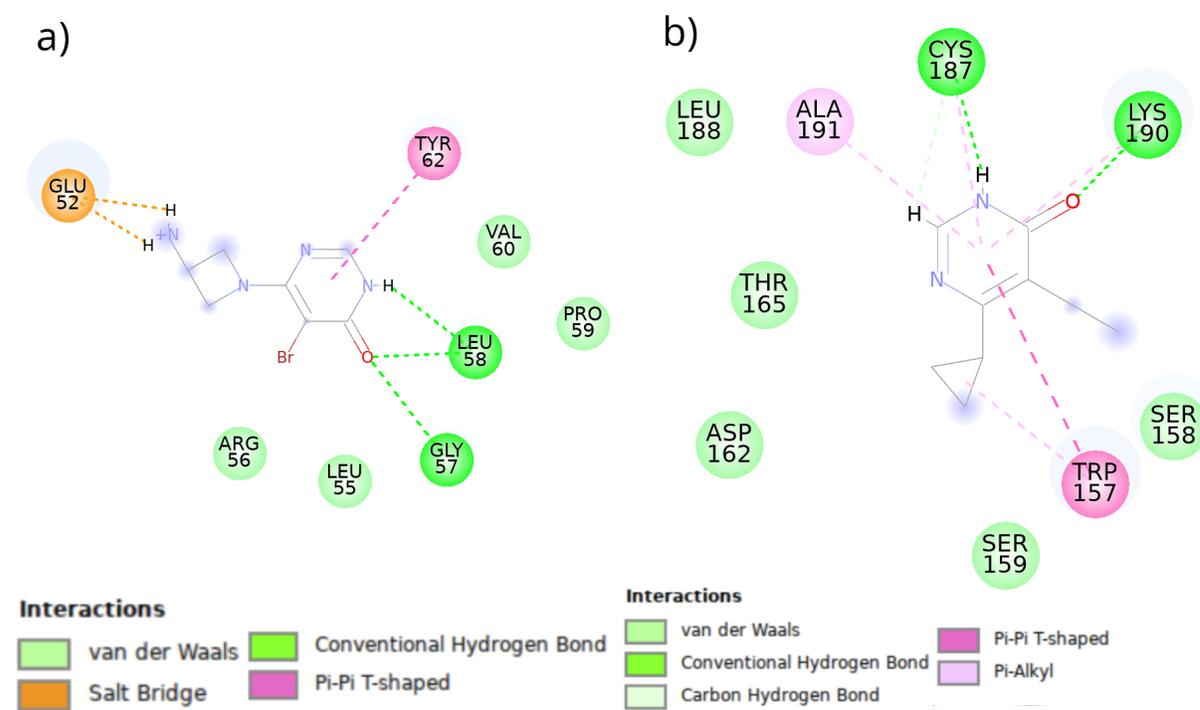


Figura 32. Diagramas de interacción 2D de la proteína 5GJC y los compuestos a) AID-1 (D-I), b) AID-2 (D-II).

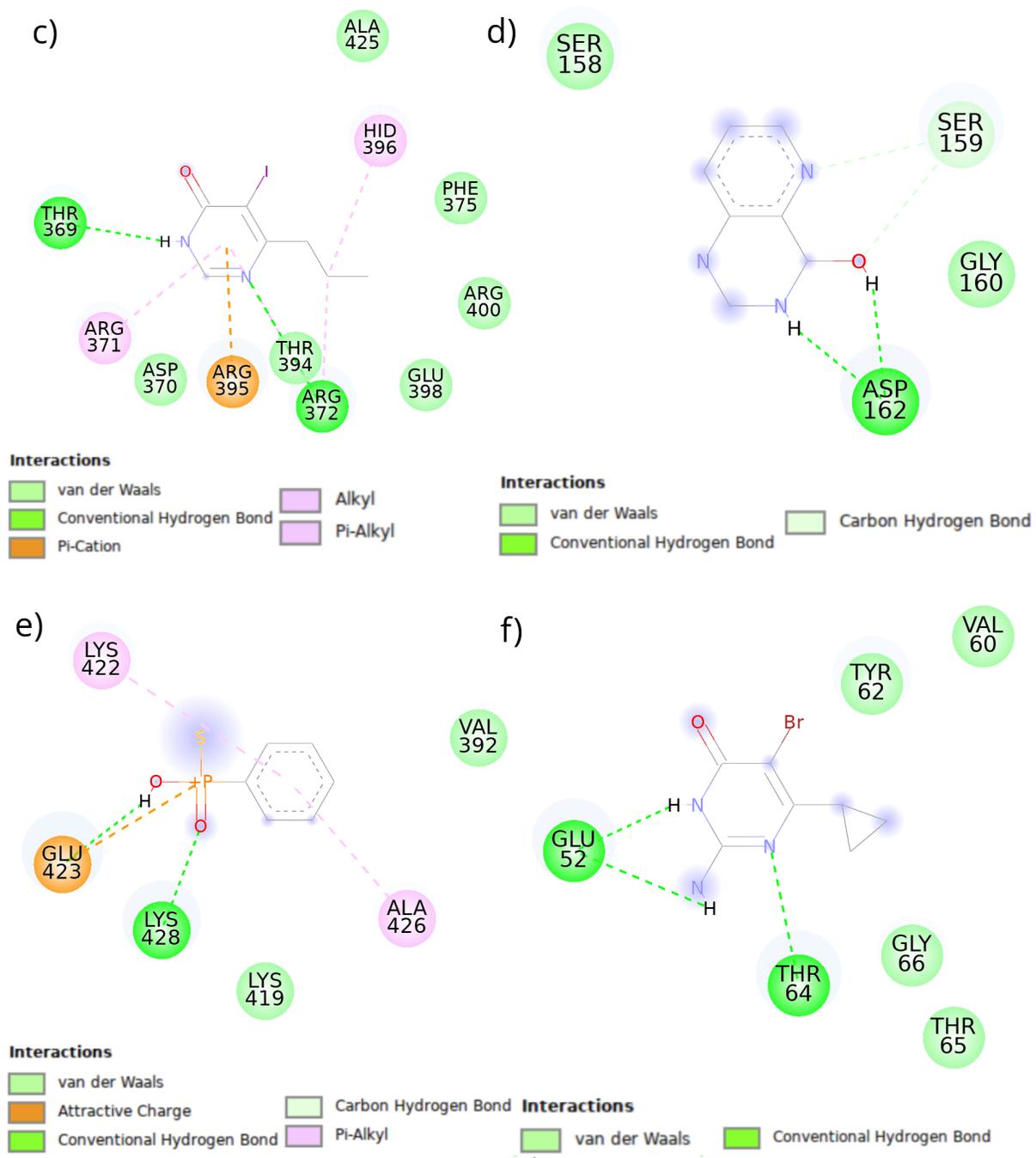


Figura 33. Diagramas de interacción 2D de la proteína 5GJC y los compuestos c) AID-3 (D-PA), d) AID-4 (D-II), e) AID-5 (D-PA), f) AID-6 (D-I).

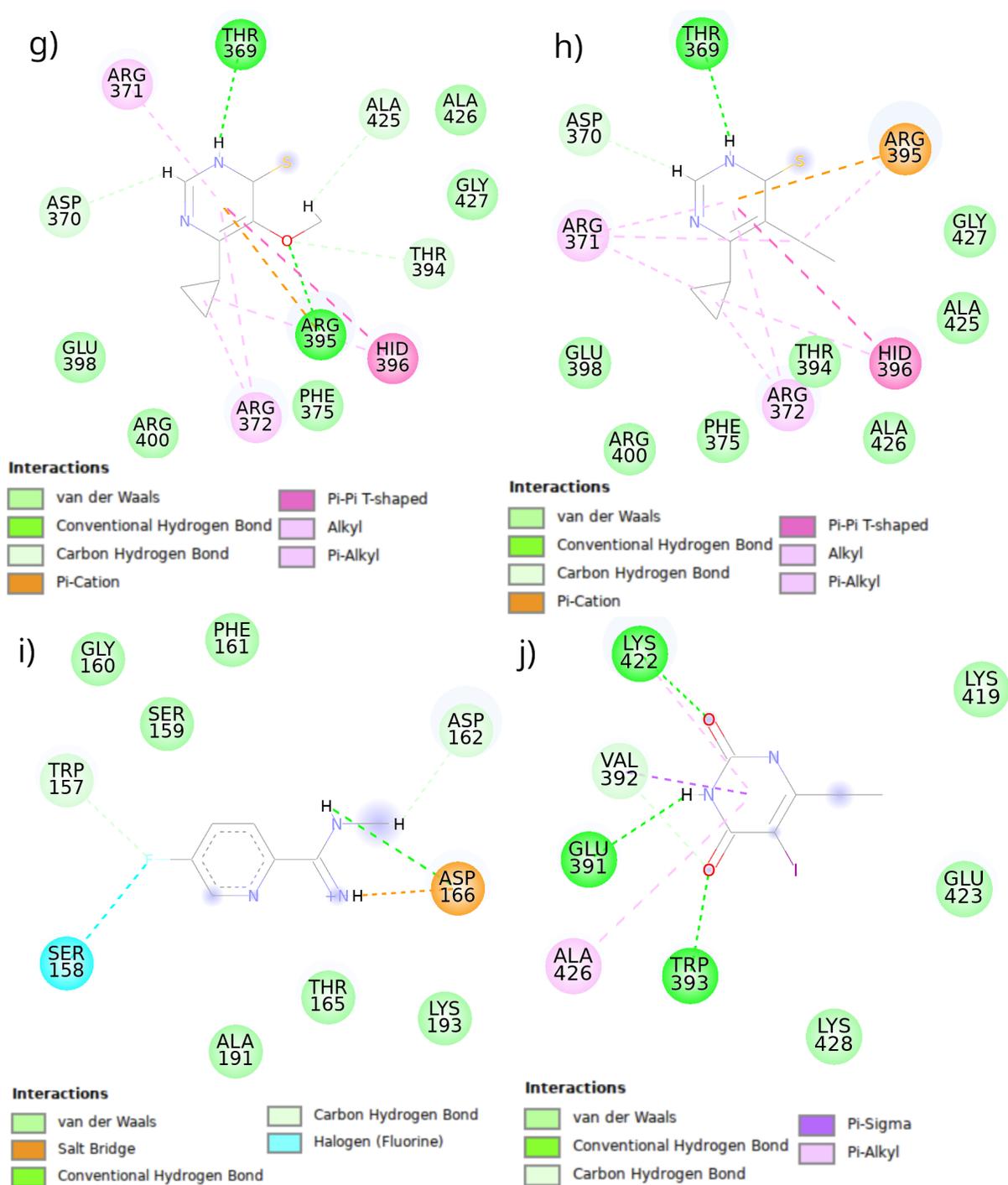


Figura 34. Diagramas de interacción 2D de la proteína 5GJC y los compuestos g) AID-7 (D-PA), h) AID-8 (D-PA), i) AID-9 (D-II), j) AID-10 (D-PA).