

# Interacción *in silico* de las moléculas Agatisflavona, Amentoflavona y Punicalina con la Importina $\alpha_1$ humana

## *In silico* interaction of Agathisflavone, Amentoflavone and Punicalin molecules with human Importin $\alpha_1$

Elvio Gayozo\*, Laura Rojas\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v23n2.94466

### RESUMEN

Varios virus con genoma de ARN en fases iniciales de la infección realizan la translocación de proteínas al interior del núcleo de la célula hospedera mediante la vía de las importinas  $\alpha_1$ . Este transporte es fundamental para el éxito de la replicación viral y se ha convertido en un blanco para la búsqueda y desarrollo de nuevos antivirales. El objetivo de este estudio fue determinar y caracterizar interacciones entre la Agatisflavona, Amentoflavona, Punicalina con el sitio mayor de unión de las Importinas  $\alpha_1$  humanas mediante el análisis *in silico* del acoplamiento molecular y simulaciones de dinámica molecular. Las pruebas de acoplamiento molecular se realizaron entre estos fitoconstituyentes y la estructura de la importina  $\alpha_1$  humana. Las afinidades de interacción fueron detectadas con la Agatisflavona, Amentoflavona y Punicalina ( $\Delta G_b = -8,8, -9,1$  y  $-8,8$  kcal.mol<sup>-1</sup> respectivamente), con afinidades de interacción específicamente a los dominios ARM2-ARM5 (sitio mayor de unión) de las importinas  $\alpha_1$ . Las simulaciones de dinámica molecular revelaron interacciones significativamente favorables ( $P < 0,001$ ) con los ligandos Agatisflavona y Amentoflavona ( $\Delta G_b = -18,60 \pm 0,35$  y  $-22,55 \pm 2,41$  kcal.mol<sup>-1</sup>) mientras que la Punicalina registró mayores valores de energía de interacción ( $\Delta G_b = -5,33 \pm 1,72$  kcal.mol<sup>-1</sup>). Los hallazgos obtenidos en este estudio computacional sugieren que las moléculas Agatisflavona y Amentoflavona presentan interacciones favorables con el sitio mayor de unión de las Importinas  $\alpha_1$ , en comparación a lo registrado con la Punicalina, sin embargo, se recomienda realizar ensayos *in vitro* a modo de confirmar estas observaciones.

**Palabras claves:** Biflavonoides, Taninos, Carioferinas, Virus, Proteínas virales.

### ABSTRACT

Several RNA-viruses during early stages of infection perform the translocation of proteins into the nucleus of host cell by the importin  $\alpha_1$  pathway. This transport is essential for viral replication success and has become a target to search and development new antivirals. The objective of this study was to determine and characterize interactions between Agathisflavone, Amentoflavone and Punicalin with the major binding site of human importins  $\alpha_1$  by *in silico* analysis of molecular docking and molecular dynamics simulations. Molecular docking tests were performed between these phytoconstituents and the structure of human importin  $\alpha_1$ . Interaction's affinity was detected with the Agathisflavone, Amentoflavone and Punicalin ( $\Delta G_b = -8.8, -9.1$  and  $-8.8$  kcal.mol<sup>-1</sup> respectively), with binding affinity to ARM 2-ARM 5 domains (major binding site) of importins  $\alpha_1$ . Molecular dynamics simulations revealed signif-

\* Licenciado en Biología. Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología, Laboratorio de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental. Dirección postal: 2160. elviologo@gmail.com ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9309-7056>.

\*\* Ingeniera Química. Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Microbiología Industrial. Dirección postal: 2160. mlrojasaguade@gmail.com ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8341-7746>.

icantly favorable interactions ( $P < 0.001$ ) with the ligands Agatisflavone and Amentoflavone ( $\Delta G_b = -18.60 \pm 0.35$  and  $-22.55 \pm 2.41$  kcal.mol<sup>-1</sup>) meanwhile Punicalin showed higher values of interaction free energy ( $\Delta G_b = -5.33 \pm 1.72$  kcal.mol<sup>-1</sup>). The findings obtained suggest that Agathisflavone and Amentoflavone could favorably interact to the major binding site of Importins  $\alpha_1$  compared to that registered with Punicalin, however, it is recommended to perform *in vitro* assays to confirm these observations.

**Key words:** Biflavonoids, Tannins, Karyopherins, Viruses, Viral proteins.

**Recibido:** Marzo 17 de 2021

**Aprobado:** Diciembre 12 de 2021

## INTRODUCCIÓN

La Agatisflavona y Amentoflavona son biflavonoides presentes en la parte aéreas (hojas, corteza y frutos) de varias especies vegetales entre ellas la *Selaginella mollendorffii*, *Selaginella sinensis*, *Agathis robusta*, *Rhus coriaria* y *Rhus succedanea*, la Punicalina (tanino hidrosoluble) se encuentra presente principalmente en el tejido externo del fruto de *Punica granatum* (Abu-Reida *et al.*, 2014; Islam *et al.*, 2019; Lin *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2017). Varios estudios demostraron las actividades antivirales de la Agatisflavona contra los virus DENV2 y DENV3 (virus del Dengue), el virus de la Influenza A y B, VIH-1 (virus de Inmunodeficiencia Humana 1) (de Freitas *et al.*, 2020; de Sousa *et al.*, 2015; Islam *et al.*, 2019; Lin *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1999).

También se ha descrito efectos antivirales de la Amentoflavona contra virus como el HSV (virus Herpes Simplex) (Li *et al.*, 2019), virus del Dengue (Coulerie *et al.*, 2012), SARS-CoV (Ryu *et al.*, 2010), VIH (Lin *et al.*, 1997) y el HCV (virus de la Hepatitis C) (Lee *et al.*, 2018). En cuanto a la Punicalina se registró su capacidad de reducir la replicación del VIH (Nonaka *et al.*, 1990) e inhibir la producción de moléculas de cccADN (ADN circular cerrado covalentemente) del HBV (Virus de la Hepatitis B) (Liu *et al.*, 2016).

Suručić *et al.* (2020), en una investigación *in silico* han descrito que la Punicalina presenta interacciones con la glicoproteína S del SARS-CoV-2 ( $E = -7,406$  kcal.mol<sup>-1</sup>), la proteína ACE2 (enzima convertidora de angiotensina 2) ( $E = -7,353$  kcal.mol<sup>-1</sup>), la furina ( $E = -9,725$  kcal.mol<sup>-1</sup>) y la TMPRSS2 (proteasa transmembrana serina 2) ( $E = -8,168$  kcal.mol<sup>-1</sup>), siendo sugerida por los autores como candidata para estudios *in vitro* por su potencial actividad inhibitoria.

Muchos virus como el VIH-1, DENV, HSV, virus de la Influenza A y B, y otros virus de ARN poseen como parte del ciclo replicativo una fase dependiente de la translocación de proteínas al núcleo de la célula hospedera para cumplir funciones como la inserción del genoma viral y la transcripción del mismo. Por otra parte, también se han descrito proteínas virales capaces despojar y tomar el control de la maquinaria de la síntesis proteica

a modo de asegurar dicho evento a favor de la replicación del virus (Frieman *et al.*, 2007; Nieto *et al.*, 1994; Timani *et al.*, 2005; Wulan *et al.*, 2015).

El tráfico núcleo-citoplasmático de proteínas es mediado principalmente por heterodímeros conformados por importinas  $\alpha$  y  $\beta_1$ . La importina  $\alpha$  la que posee un sitio activo (sitio mayor de unión) que interacciona con secuencias SLN (Secuencia de Localización Nuclear) presentes en las proteínas que deben ser transportadas al interior del núcleo de la célula (Chook & Blobel, 2001; Mosammaparast & Pemberton, 2004). Varios virus, como el de la Influenza A, DENV y SARS-CoV, emplean esta vía de transporte para translocar sus proteínas al interior del núcleo de la célula hospedera y de esta manera cumplir funciones como (Melén *et al.*, 2003; Tay *et al.*, 2013; Timani *et al.*, 2005). Debido a la importancia del proceso para el éxito replicativo de varios virus de importancia médica, la importina  $\alpha$  es empleado para la búsqueda de moléculas tanto de origen natural como de origen sintético, que puedan interaccionar con los sitios activos de dichas proteínas con la finalidad de interferir con la formación de los complejos importina  $\alpha$ -proteína viral y de esta manera inhibir el transporte de la proteína viral al interior del núcleo celular (Caly *et al.*, 2020; Janković, 2020; Yang *et al.*, 2020).

El objetivo principal de este estudio fue determinar y caracterizar mediante análisis computacionales los sitios de interacción de la Agatisflavona, Amentoflavona y Punicalina en las importinas  $\alpha_1$  humanas mediante estudios de acoplamiento moleculares y simulaciones de dinámica molecular a fin de conocer el potencial inhibitorio de estas moléculas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Pruebas de acoplamiento molecular

Las estructuras químicas en formato bidimensional de las Agatisflavona, Amentoflavona y Punicalina fueron obtenidas de la base de datos PubChem (Kim *et al.*, 2016) (Tabla 1). La estructura molecular de la proteína humana Importina  $\alpha_1$  (PDB: 4WV6) fue obtenida de la base de datos Protein Data Bank RCSB (Trowitzsch *et al.*, 2015). Se utilizó como testigo negativo del estudio a la molécula de Aspirina, ya que es conocido que el mis-

mo no posee como blanco de interacción a la importina  $\alpha_1$  (Vane & Botting, 2003).

Para llevar a cabo las pruebas de acoplamiento molecular primeramente fueron proporcionadas a todas las estructuras cargas parciales considerando a todos los átomos presentes en las mismas. Estas pruebas se realizaron entre los ligandos (Agatisflavona, Amentoflavona y Punicalina) y la proteína Importina  $\alpha_1$ , para ello se emplearon cuadrículas de acoplamiento con dimensiones de  $47 \times 77 \times 81 \text{ \AA}^3$  utilizando el programa AutoDock Vina v.1 (Trott & Olson, 2010).

Los modelos de acoplamiento resultantes que presentaron valores de energía libre de interacción menores a  $-8,00 \text{ kcal.mol}^{-1}$  fueron seleccionados como complejos de interacciones favorables. La visualización y análisis de estos modelos se realizaron empleando el programa Discovery Studio Visualizer v. 20 (Dassault Systèmes, Vélizy-Villacoublay, Francia).

### Simulaciones de dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular se realizaron por triplicados a modo de reducir los artefactos generados mientras se logra la estabilidad de los sistemas simulados esto es fundamental para verificar la estabilidad y el rendimiento energético de los ligandos en unión a la importina  $\alpha_1$  (Alazmi & Motwalli, 2021), para ello se emplearon los programas NAnoscale Molecular Dynamics NAMD 2.14 (Phillips *et al.*, 2005) y Visual Molecular Dynamics VMD 1.9.3 (Humphrey *et al.*, 1996). Se utilizó el campo de fuerza CHARMM36 (Vanommeslaeghe *et al.*, 2010) tanto para ligandos (Agatisflavona, Amentoflavona y Punicalina) como para la importina  $\alpha_1$ . Los datos topológicos de los ligandos fueron realizados empleando CHARMM-GUI (Brooks *et al.*, 2009; Jo *et al.*, 2008; Seonghoon Kim *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2016).

Los complejos fueron solvatados con moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  TIP3P en una cuadrícula cúbica con una distancia de entre 2-100 nm entre los complejos y borde del cubo de solvatación (Jorgensen *et al.*, 1983). Se añadieron iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) y cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) al sistema para neutralizar cargas (Liang *et al.*, 2020).

Las simulaciones se realizaron por un tiempo de 200 ps con intervalos de tiempo (time-steps) de 2 fs. Estas fueron isotérmicas e isobáricas a temperatura de 310 K, la presión de 1,02 bar y periodo de oscilación de 150 fs, con generaciones aleatorias de velocidades acorde a la distribución de Maxwell (Mohamed, 2011). Como constante dieléctrica del solvente se empleó el valor de 1.

### Análisis estadístico

Se verificó la estabilidad de las interacciones en el tiempo simulado estimando los valores de RMSD (*raíz de la desviación cuadrática media*) de cada complejo. También se determinaron los valores de RMSF (*raíz de la fluctuación cuadrática media*) y  $\Delta\text{RMSF}$  (*variación de la raíz de la fluctuación cuadrática media*) de cada uno de los residuos de la Importina  $\alpha_1$  en los complejos formados en el transcurso de tiempo simulado, para ello se empleó el programa Visual Molecular Dynamics VMD 1.9.3 (Humphrey *et al.*, 1996).

Los valores de energía libre de Gibbs de unión ( $\Delta G_b$ ) de cada complejo fueron determinados mediante el método de LIE (Energía de Interacción Lineal) empleando los parámetros  $\alpha=0,18$ ,  $\beta=0,5$ ,  $\gamma=0$  (Åqvist *et al.*, 1994; Hansson *et al.*, 1998) utilizando el programa CaFE (Liu & Hou, 2016).

Los valores de  $\Delta G_b$  fueron analizados mediante el test de ANDEVA y el test *post-hoc* de Tukey (95% nivel de significancia), para ello se empleó el programa Past v. 4.03 (Hammer *et al.*, 2001). Las representaciones gráfi-

**Tabla 1:** Energía libre de unión de los complejos resultantes de los acoplamientos.

Moléculas	PubChem CID	Complejo Ligando-Proteína	Dominio proteico de interacción <sup>†</sup>	$\Delta G_b$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )
Aspirina*	2244	Aspirina-Imp. $\alpha_1$	ARM 8-ARM 9	-5,2
Agatisflavona	5281599	Agatisflavona-Imp. $\alpha_1$	ARM 2-ARM 5	-8,8
Amentoflavona	5281600	Amentoflavona-Imp. $\alpha_1$	ARM 2-ARM 5	-9,1
Punicalina	5388496	Punicalina-Imp. $\alpha_1$	ARM 2-ARM 5	-8,8

\*Testigo; Imp. $\alpha_1$ : importina  $\alpha_1$ . <sup>†</sup>Dominio de la importina  $\alpha_1$ .

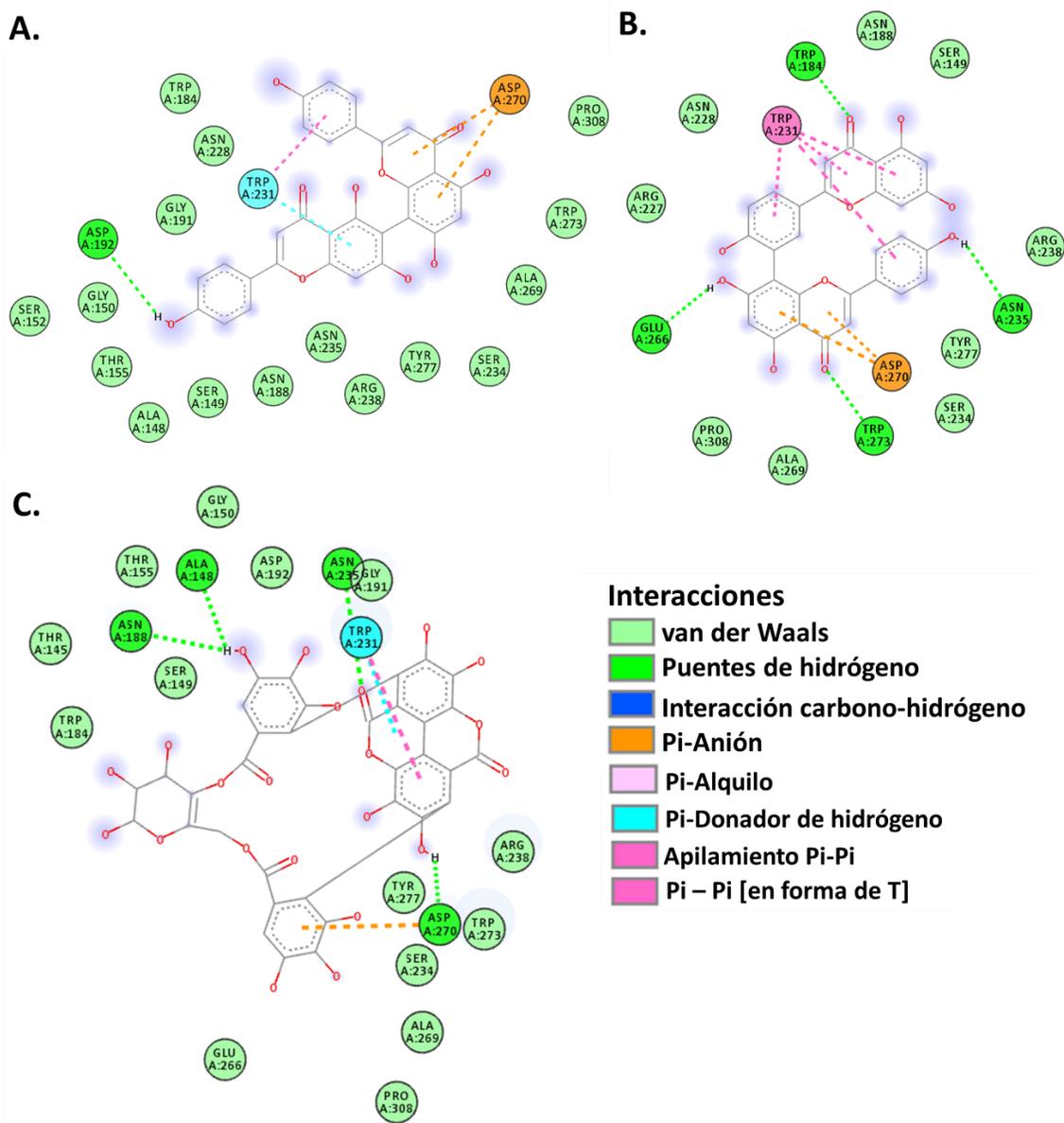
cas se realizaron con el programa MS Excel 2016 (Microsoft Windows, EEUU).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las pruebas de acoplamiento molecular revelaron valores de energía libre de unión ( $\Delta G_b$ ) favorables para las interacciones registradas con los ligandos analizados. La interacción con la Agatisflavona demostró una  $\Delta G_b = -8,8$  kcal.mol<sup>-1</sup>, la Amentoflavona  $\Delta G_b = -9,1$  kcal.mol<sup>-1</sup> y la Punicalina  $\Delta G_b = -8,8$  kcal.mol<sup>-1</sup>. La Aspirina registró una  $\Delta G_b$  igual a  $-5,2$  kcal.mol<sup>-1</sup> en unión con la importina  $\alpha_1$ ,

sin embargo, las interacciones fueron con residuos de los dominios ARM8-ARM9, dominios no implicados en el reconocimiento e interacción con las secuencias SLN de las proteínas (Chook & Blobel, 2001; Pumroy & Cingolani, 2015) (Tabla 1).

En la Figura 1 se puede observar los complejos formados en las pruebas de acoplamiento molecular en representaciones bidimensionales, donde se pueden identificar los residuos activos involucrados directamente en la formación de los complejos y los residuos que se encuentran presentes en los bolsillos de interacción.



**Figura 1:** Representación bidimensional de las interacciones y residuos activos implicados en la formación de los complejos con las Importinas  $\alpha_1$ . **A.** Agatisflavona. **B.** Amentoflavona. **C.** Punicalina.

Los residuos activos involucrados en la formación del complejo Agatisflavona-Importina  $\alpha_1$  fueron W231, D192 y D270. En el complejo se pudo registrar la formación de puentes de hidrógeno convencionales entre la Agatisflavona y el residuo D192, interacciones no convencionales de enlaces de hidrógeno entre el residuo W231 y el núcleo aromático de la molécula Agatisflavona, interacciones hidrofóbicas mediadas por orbitales Pi ( $\pi$ ) de la cadena lateral del residuo W231 y la Agatisflavona. También se pudo registrar la formación de interacciones electrostáticas con el residuo D270 (Figura 1.A).

Los residuos activos involucrados en la formación del complejo Amentoflavona-Importina  $\alpha_1$  fueron W231, W184, N235, D270, W273 y E266. Las interacciones registradas en el complejo fue la formación de puentes de hidrógenos entre la Amentoflavona y los residuos W184, N235, W273 y E266, interacciones electrostáticas con el residuo D270 e interacciones hidrofóbicas mediadas por orbitales Pi ( $\pi$ ) de los grupos aromáticos de la Amentoflavona y del residuo W231 (Figura 1.B).

Los residuos activos presentes en el complejo Punicalina-Importina  $\alpha_1$  fueron N188, A148, N235, W231 y D270. Las fuerzas intermoleculares registradas en el complejo fueron la formación de puentes de hidrógeno con los residuos N188, A148 y N235, interacciones no convencionales de puentes de hidrógeno mediada por orbitales Pi ( $\pi$ ) de la Punicalina y el hidrógeno del residuo W231. También se registraron interacciones electrostáticas con el residuo D270, e interacciones hidrofóbicas con el residuo W231 (Figura 1.C).

Las regiones de acoplamiento registradas fueron específicamente entre los dominios armadillo ARM 2-ARM 5, correspondiente al sitio mayor de reconocimiento e interacción con las secuencias SLN presentes en todas las proteínas que deben ser transportadas al interior del núcleo celular (Chook & Blobel, 2001; Mosammaparast & Pemberton, 2004; Pumroy & Cingolani, 2015). Es importante resaltar que los residuos triptófano (W) y asparagina (N), registradas como residuos activos en los complejos, son aminoácidos con funciones claves en el sitio mayor de unión de la importina  $\alpha_1$ , ya que participa activamente en el reconocimiento de las secuencias SLN de las proteínas que serán transportadas al núcleo (Chook & Blobel, 2001).

En la Figura 2 se demuestran los resultados obtenidos en las simulaciones de dinámica molecular de los complejos que fueron obtenidos en las pruebas de acoplamiento molecular y la importina  $\alpha_1$  en su conformación de apoproteína.

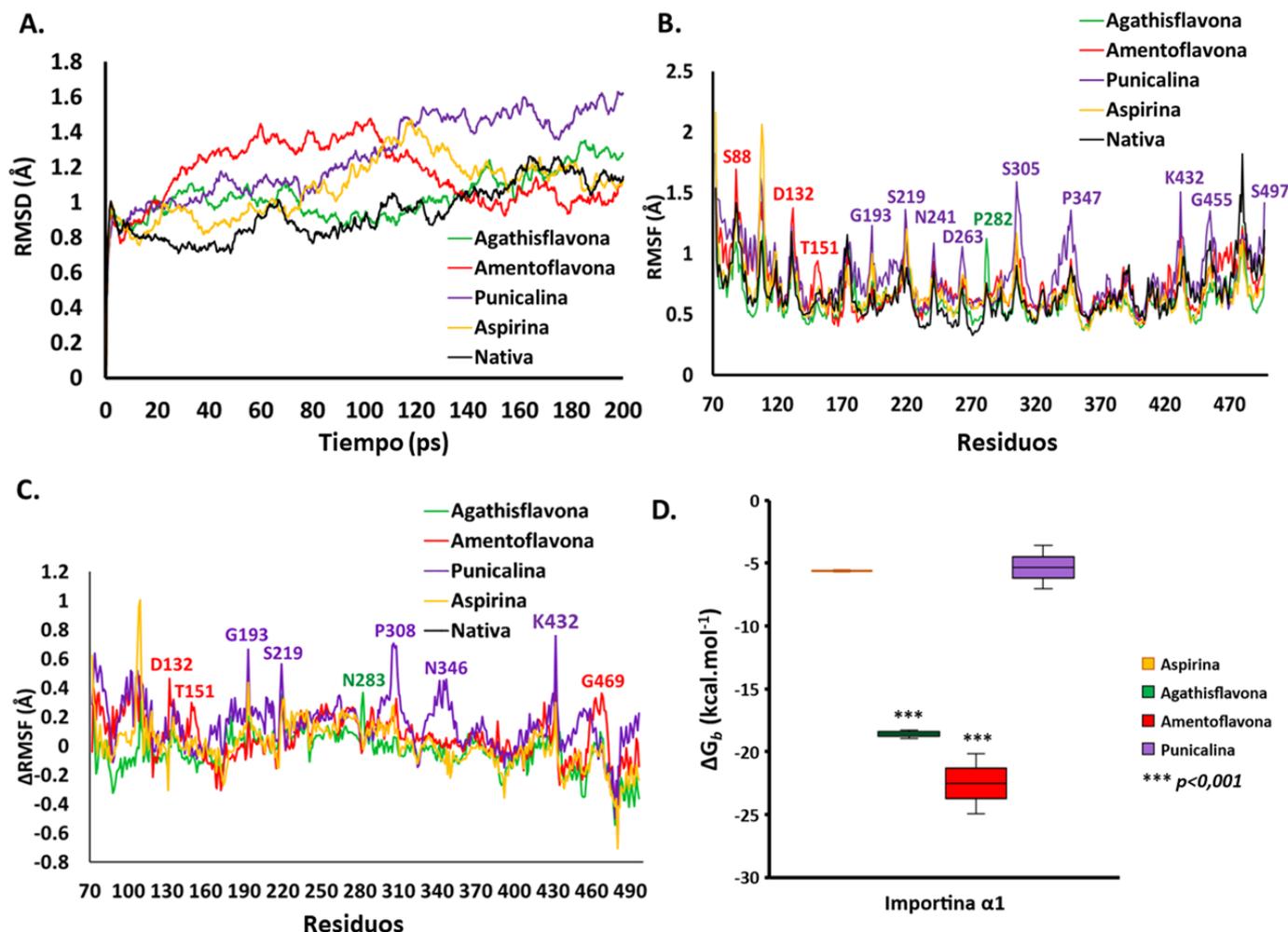
Los valores de RMSD describen específicamente la estabilidad de los complejos formados en el tiempo en el que dura la simulación realizada (Liang *et al.*, 2020). El análisis de los valores de RMSD reveló en el caso de la apoproteína (proteína nativa, sin ligandos) un valor promedio de 0,947 Å. El complejo Agatisflavona-Importina  $\alpha_1$  demostró una estabilidad en los primeros 160 ps, los 40 ps posteriores evidenció un ligero aumento en los valores de RMSD, con un valor promedio fue de 1,038 Å.

El complejo Amentoflavona-Importina  $\alpha_1$  registró un promedio de RMSD de 1,157 Å, se observó una inestabilidad inicial los primeros 100 ps y posteriormente los valores de RMSD demostraron una reducción. Esto nos indica que el complejo podría haber alcanzado cierta estabilidad por los reordenamientos estructurales generados en la simulaciones (Liang *et al.*, 2020) (Figura 2.A).

El complejo formado entre la molécula de Punicalina y la Importina  $\alpha_1$  presentó una constante inestabilidad, valores de RMSD que iban en aumento durante el tiempo simulado, con un promedio de 1,264 Å. Este valor de RMSD registrado nos sugiere que la interacción simulada presenta cierta inestabilidad en el tiempo simulado y que los reordenamientos estructurales no fueron suficientes para alcanzar la estabilidad. De igual manera, la simulación con la Aspirina reveló que el complejo presenta inestabilidad los primeros 120 ps, posterior a este tiempo los valores de RMSD se reduce hasta ser semejante a los obtenidos en la apoproteína, el valor promedio registrado fue de 1,085 Å (Figura 2.A).

Los valores de RMSF en los complejos proteína-ligando describen la flexibilidad de la proteína con respecto a su posición promedio durante el tiempo simulado, así también los valores de  $\Delta$ RMSF, nos ofrece la misma información con la sustracción de los valores RMSF de la importina  $\alpha_1$  en su estado nativo (Liang *et al.*, 2020; Shahraki *et al.*, 2018).

Los valores de RMSF del complejo Agatisflavona-Importina  $\alpha_1$  revelaron una mayor fluctuación en el residuo P282, la misma información fue obtenida en los valores calculados de  $\Delta$ RMSF, es importante destacar que este residuo se encuentra localizado específicamente en el sitio de acoplamiento de la Agatisflavona. El complejo conformado por la Amentoflavona y la importina  $\alpha_1$  presentó una mayor fluctuación en los residuos S88, D132 y T151, de igual modo la  $\Delta$ RMSF evidenció como residuos con mayores valores de RMSF al D132, T151 y G469 (Figura 2.B,C).



**Figura 2:** A. Raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) de los complejos. B. Raíz de la fluctuación cuadrática media (RMSF) de los complejos formados. C. Variación de la raíz de la fluctuación cuadrática media ( $\Delta$ RMSF) de los complejos. D. Energía libre de Gibbs de unión ( $\Delta G_b$ ) de complejos en las simulaciones.

El complejo Punicalina-Importina  $\alpha_1$  presentó un mayor número de residuos con altos valores de RMSF, estos fueron la G193, S219, N241, D263, S305, P347, K432, G455 y S497. Sin embargo, los valores de  $\Delta$ RMSF evidenciaron mayores fluctuaciones específicamente en los residuos G193, S219, E206, P347 y K432, lo cual nos indica una mayor flexibilidad de estos residuos (Shahraki *et al.*, 2018).

Los complejos Agathisflavona-Importina  $\alpha_1$  y Amentoflavona-Importina  $\alpha_1$  revelaron valores de energía libre de Gibbs de unión ( $\Delta G_b$ ) de  $-18,60 \pm 0,35$  kcal.mol<sup>-1</sup> y  $-22,55 \pm 2,41$  kcal.mol<sup>-1</sup> respectivamente, estos valores reflejan que la unión entre estos ligandos y el sitio mayor de reconocimiento de las importina  $\alpha_1$  fueron favorables durante el tiempo simulado (Brandsdal *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2020).

Estos valores energéticos fueron significativamente favorables ( $P < 0,001$ ) en comparación con los obtenidos en las simulaciones de los complejos Punicalina-Importina  $\alpha_1$  y Aspirina-Importina  $\alpha_1$  los cuales fueron de  $-5,33 \pm 1,72$  kcal.mol<sup>-1</sup> y  $-5,62 \pm 0,09$  kcal.mol<sup>-1</sup> respectivamente, es importante destacar que entre estas últimas no se registraron diferencias estadísticas (Figura 2.D).

En el complejo Agathisflavona-Importina  $\alpha_1$  se revelaron contribuciones energéticas promedios de  $-65,08 \pm 4,66$  kcal.mol<sup>-1</sup> y de  $-82,90 \pm 9,43$  kcal.mol<sup>-1</sup> por energías provenientes de interacciones de van der Waals y de interacciones electrostáticas respectivamente (Tabla 2).

A su vez, en el complejo Amentoflavona-Importina  $\alpha_1$  se registraron aportes promedios de energía de van der

**Tabla 2:** Contribuciones energéticas registradas en los complejos.

Complejo	Energía de van der Waals*	Energía Electrostática*
Agatisflavona-Imp. $\alpha_1$	$-65,08 \pm 4,66$	$-82,90 \pm 9,43$
Amentoflavona-Imp. $\alpha_1$	$-57,36 \pm 4,76$	$-96,66 \pm 10,42$
Punicalina-Imp. $\alpha_1$	$-55,57 \pm 5,94$	$-145,49 \pm 22,31$

\* Media  $\pm$  desviación estándar (kcal.mol<sup>-1</sup>); Imp.  $\alpha_1$ : Importina  $\alpha_1$ .

Waal de  $-57,36 \pm 4,76$  kcal.mol<sup>-1</sup> y de energía electrostática de  $-96,66 \pm 10,42$  kcal.mol<sup>-1</sup>.

Sin embargo, el complejo Punicalina-Importina  $\alpha_1$  evidenció contribuciones de energía de van der Waals en promedio de  $-55,57 \pm 5,94$  kcal.mol<sup>-1</sup> y de energía electrostática de  $-145,49 \pm 22,31$  kcal.mol<sup>-1</sup>.

Numerosos estudios han descrito que los biflavonoides Agatisflavona y Amentoflavona, y el tanino hidrosoluble Punicalina, presentan actividades antivirales, principalmente por la capacidad que poseen estas moléculas de unirse a proteínas inhibiendo sus funciones debido a que interactúan con los residuos presentes en los sitios activos (Bais & Abrol, 2015; Islam *et al.*, 2019; Lin *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2017). De Freitas *et al.* (2020), describen que la molécula Agatisflavona posee la capacidad de inhibir a la proteína Neuraminidasa del virus de la Influenza, inclusive registraron que es capaz de inhibir variantes mutantes de la Neuraminidasa. También de Sousa *et al.* (2015), en sus estudios detallan que la Agatisflavona presenta actividades inhibitorias de la proteasa NS2B-NS3 del virus del Dengue de los serotipos 2 y 3 (DENV 2 y DENV 3), esto por la probable unión a sitios alostéricos.

Ryu *et al.* (2010), describen que la Amentoflavona presenta actividad inhibitoria de la proteína 3CL<sup>Pro</sup> del virus SARS-CoV. También Coulerie *et al.* (2012), y Coulerie *et al.* (2013), describen que la Amentoflavona fue capaz de presentar actividades inhibitorias de la enzima RNA polimerasa dependiente de RNA (NS5 RdRp) del virus del Dengue serotipo 2, afectando así a la replicación viral. Wilsky *et al.* (2012), describen que la Amentoflavona presenta una inhibición de la enzima sintetasa de ácidos grasos (FAS) durante el proceso infectivo del virus

Coxsackievirus B3 (CVB3), lo que desencadena en una reducción del ciclo replicativo viral.

Lin *et al.* (1997), en un estudio realizado con varias estructuras de moléculas entre las que se encontraban la Amentoflavona y la Agatisflavona, evidenciaron que ambas presentaban actividades antivirales apreciables contra el VIH-1, mediante acciones moderadas contra la enzima transcriptasa reversa con una IC<sub>50</sub> igual a 119  $\mu$ M. Li *et al.* (2019), empleando la Amentoflavona registraron actividades antivirales contra el HSV-1 (Herpes Simplex virus 1) así como contra cepas resistentes al aciclovir del HSV, demostraron que este biflavonoide afecta a la reorganización de la actina, los autores sugieren también que el posible mecanismo de acción de la Amentoflavona es la interrupción temprana de eventos cruciales durante la infección viral, como el proceso de translocación nuclear de proteínas virales.

Los antecedentes mencionados demuestran que estas moléculas son capaces de interactuar con proteínas virales, así como también con proteínas de la misma célula hospedera (Li *et al.*, 2019). En este estudio, se logró demostrar que la Agatisflavona y la Amentoflavona presentan interacciones *in silico* favorables con la importina  $\alpha_1$ , lo cual se refleja no solo en los valores de energía libre de Gibbs calculada sino también en la estabilidad determinada computacionalmente en los complejos mediante las simulaciones de dinámica molecular.

Los ligandos han registrado interacciones *in silico* con el sitio mayor de unión de las importinas  $\alpha$  (dominios ARM 2-ARM 5), región de suma importancia ya que es la responsable del reconocimiento de las secuencias SLN presentes en las proteínas que deben ser transportadas al núcleo para cumplir sus funciones (Chook & Blobel,

2001; Mosammaparast & Pemberton, 2004; Pumroy & Cingolani, 2015).

## CONCLUSIONES

Los resultados hallados en este estudio computacional demuestran que los biflavonoides Agatisflavona y Amentoflavona interactúan *in silico* de forma significativamente favorable con el sitio mayor de reconocimiento de las importinas  $\alpha_1$  formando complejos relativamente estables entre sí, esto en comparación a lo registrado con el tanino Punicalina. Se recomienda llevar a cabo pruebas *in vitro* como el ensayo de desplazamiento térmico celular a modo de confirmar las interacciones detectadas en este estudio *in silico*, también se sugiere seguir estudiando a fondo a estos biflavonoides (Agatisflavona y Amentoflavona) como potenciales inhibidores del tráfico núcleo-citoplasmático de proteínas virales.

## CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu-Reida, I. M., Jamous, R. M., & Ali-Shtayeh, M. S. (2014). Phytochemistry, Pharmacological Properties and Industrial Applications of *Rhus coriaria* L. (Sumac). *Jordan Journal of Biological Sciences*, 147 (1573), 1-12. <https://doi.org/10.12816/0008245>.
- Alazmi, M., & Motwalli, O. (2021). *In silico* virtual screening, characterization, docking and molecular dynamics studies of crucial SARS-CoV-2 proteins. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(17), 6761-6771. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1803965>.
- Åqvist, J., Medina, C., & Samuelsson, J.-E. (1994). A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. *Protein Engineering, Design and Selection*, 7(3), 385-391. <https://doi.org/10.1093/protein/7.3.385>.
- Bais, S., & Abrol, N. (2015). Review on Chemistry and Pharmacological Potential of Amentoflavone. *Current Research in Neuroscience*, 6(1), 16-22. <https://doi.org/10.3923/crn.2016.16.22>.
- Brandsdal, B. O., Österberg, F., Almlöf, M., Feierberg, I., Luzhkov, V. B., & Åqvist, J. (2003). Free Energy Calculations and Ligand Binding. En *Advances in Protein Chemistry* (Vol. 66, pp. 123-158). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(03\)66004-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(03)66004-3).
- Brooks, B. R., Brooks, C. L., Mackerell, A. D., Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caffisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., Im, W., Kuczera, K., Lazaridis, T., Ma, J., Ovchinnikov, V., Paci, E., Pastor, R., Post, C., Pu, J., Schaefer, M., Tidor, B., Venable, R., Woodcock, L., Wu, X., Yang, W., Yor, D., Karplus, M. (2009). CHARMM: The biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry*, 30(10), 1545-1614. <https://doi.org/10.1002/jcc.21287>.
- Caly, L., Druce, J. D., Catton, M. G., Jans, D. A., & Wagsstaff, K. M. (2020). The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 *in vitro*. *Antiviral Research*, 178, 104787. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104787>.
- Chook, Y., & Blobel, G. (2001). Karyopherins and nuclear import. *Current Opinion in Structural Biology*, 11 (6), 703-715. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(01\)00264-0](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(01)00264-0).
- Coulerie, P., Eydoux, C., Hnawia, E., Stuhl, L., Maciuk, A., Lebouvier, N., Canard, B., Figadère, B., Guillemot, J.C., & Nour, M. (2012). Biflavonoids of *Dacrydium balansae* with potent inhibitory activity on dengue 2 NS5 polymerase. *Planta Medica*, 78(7), 672-677. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1298355>.
- Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Visualizer, version 20.1, San Diego: Dassault Systèmes, 2019. (s. f.).
- de Freitas, C. S., Rocha, M. E. N., Sacramento, C. Q., Martorelli, A., Ferreira, A. C., Rocha, N., de Oliveira, A. C., de Oliveira Gomes, A. M., dos Santos, P. S., da Silva, E. O., da Costa, J. P., de Lima Moreira, D., Bozza, P. T., Silva, J. L., Barroso, S. P. C., & Souza, T. M. L. (2020). Agathisflavone, a Biflavonoid from *Anacardium occidentale* L., Inhibits Influenza Virus Neuraminidase. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 20(2), 111-120. <https://doi.org/10.2174/1568026620666191219150738>.
- de Sousa, L. R. F., Wu, H., Nebo, L., Fernandes, J. B., da Silva, M. F. das G. F., Kiefer, W., Kanitz, M., Bodem, J., Diederich, W. E., Schirmeister, T., & Vieira, P. C. (2015). Flavonoids as noncompetitive inhibitors of Dengue virus NS2B-NS3 protease: Inhibition kinetics and docking studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(3), 466-470. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.12.015>.
- Frieman, M., Yount, B., Heise, M., Kopecky-Bromberg, S. A., Palese, P., & Baric, R. S. (2007). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus ORF6 Antagonizes STAT1 Function by Sequestering Nuclear Import Factors on the Rough Endoplasmic Reticulum/Golgi Membrane. *Journal of Virology*, 81(18), 9812-9824. <https://doi.org/10.1128/JVI.01012-07>.
- Hammer, O., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for

- Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 1-9.
- Hansson, T., Marelus, J., & Åqvist, J. (1998). Ligand binding affinity prediction by linear interaction energy methods. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 12(1), 27-35. <https://doi.org/10.1023/A:1007930623000>.
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 1(14), 33-38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- Islam, M. T., Zihad, S. M. N. K., Rahman, M. S., Sifat, N., Khan, M. R., Uddin, S. J., & Rouf, R. (2019). Agathisflavone: Botanical sources, therapeutic promises, and molecular docking study. *IUBMB Life*, 71(9), 1192-1200. <https://doi.org/10.1002/iub.2053>.
- Janković, S. (2020). Current status and future perspective of coronavirus disease 2019: A review. *Scripta Medica*, 51(2), 101-109. <https://doi.org/10.5937/scriptamed51-27183>.
- Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G., & Im, W. (2008). CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*, 29(11), 1859-1865. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>.
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., & Klein, M. L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, 79(2), 926-935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>.
- Kim, S., Lee, J., Jo, S., Brooks, C. L., Lee, H. S., & Im, W. (2017). CHARMM-GUI ligand reader and modeler for CHARMM force field generation of small molecules. *Journal of Computational Chemistry*, 38(21), 1879-1886. <https://doi.org/10.1002/jcc.24829>.
- Kim, S., Thiessen, P. A., Bolton, E. E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., Han, L., He, J., He, S., Shoemaker, B. A., Wang, J., Yu, B., Zhang, J., & Bryant, S. H. (2016). PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1202-D1213. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv951>.
- Lee, J., Cheng, X., Swails, J. M., Yeom, M. S., Eastman, P. K., Lemkul, J. A., Wei, S., Buckner, J., Jeong, J. C., Qi, Y., Jo, S., Pande, V. S., Case, D. A., Brooks, C. L., MacKerell, A. D., Klauda, J. B., & Im, W. (2016). CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 12(1), 405-413. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>.
- Lee, W.P., Lan, K.L., Liao, S.X., Huang, Y.H., Hou, M.C., & Lan, K.H. (2018). Inhibitory Effects of Amentoflavone and Orobol on Daclatasvir-Induced Resistance-Associated Variants of Hepatitis C Virus. *The American Journal of Chinese Medicine*, 46(04), 835-852. <https://doi.org/10.1142/S0192415X18500441>.
- Li, F., Song, X., Su, G., Wang, Y., Wang, Z., Jia, J., Qing, S., Huang, L., Wang, Y., Zheng, K., & Wang, Y. (2019). Amentoflavone Inhibits HSV-1 and ACV-Resistant Strain Infection by Suppressing Viral Early Infection. *Viruses*, 11(5), 466. <https://doi.org/10.3390/v11050466>.
- Li, J. Y., Liao, C. H., Wang, Q., Tan, Y. J., Luo, R., Qiu, Y., & Ge, X. Y. (2020). The ORF6, ORF8 and nucleocapsid proteins of SARS-CoV-2 inhibit type I interferon signaling pathway. *Virus Research*, 286, 198074. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198074>.
- Liang, J., Pitsillou, E., Karagiannis, C., Darmawan, K. K., Ng, K., Hung, A., & Karagiannis, T. C. (2020). Interaction of the prototypical  $\alpha$ -ketoamide inhibitor with the SARS-CoV-2 main protease active site in silico: Molecular dynamic simulations highlight the stability of the ligand-protein complex. *Computational Biology and Chemistry*, 87, 107292. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2020.107292>.
- Lin, Y. M., Anderson, H., Flavin, M. T., Pai, Y. H. S., Mata-Greenwood, E., Pengsuparp, T., Pezzuto, J. M., Schinazi, R. F., Hughes, S. H., & Chen, F. C. (1997). In Vitro Anti-HIV Activity of Biflavonoids Isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. *Journal of Natural Products*, 60(9), 884-888. <https://doi.org/10.1021/np9700275>.
- Lin, Y. M., Flavin, M. T., Schure, R., Chen, F. C., Sidwell, R., Barnard, D. I., Huffmann, J. H., & Kern, E. R. (1999). Antiviral Activities of Biflavonoids. *Planta Medica*, 65(2), 120-125. <https://doi.org/10.1055/s-1999-13971>.
- Liu, C., Cai, D., Zhang, L., Tang, W., Yan, R., Guo, H., & Chen, X. (2016). Identification of hydrolyzable tannins (punicalagin, punicalin and geraniin) as novel inhibitors of hepatitis B virus covalently closed circular DNA. *Antiviral Research*, 134, 97-107. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.08.026>.
- Liu, H., & Hou, T. (2016). CaFE: A tool for binding affinity prediction using end-point free energy methods. *Bioinformatics*, 32(14), 2216-2218. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw215>.
- Melén, K., Fagerlund, R., Franke, J., Köhler, M., Kinnunen, L., & Julkunen, I. (2003). Importin  $\alpha$  Nuclear Localization Signal Binding Sites for STAT1, STAT2, and Influenza A Virus Nucleoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 28193-28200. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303571200>.
- Mohamed, N. M. A. (2011). Efficient Algorithm for Generating Maxwell Random Variables. *Journal of Statistical Physics*, 145(6), 1653-1660. <https://doi.org/10.1007/s10955-011-0364-y>.

- Mosammaparast, N., & Pemberton, L. F. (2004). Karyopherins: From nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends in Cell Biology*, 14(10), 547-556. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.09.004>.
- Nieto, A., de la Luna, S., Bárcena, J., Portela, A., & Ortín, J. (1994). Complex structure of the nuclear translocation signal of influenza virus polymerase PA subunit. *Journal of General Virology*, 75(1), 29-36. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-1-29>.
- Nonaka, G., Nishioka, I., Nishizawa, M., Yamagishi, T., Kashiwada, Y., Dutschman, G. E., Bodner, A. J., Kilkuskie, R. E., Cheng, Y.-C., & Lee, K.-H. (1990). Anti-Aids Agents, 2: Inhibitory Effect of Tannins on HIV Reverse Transcriptase and HIV Replication in H9 Lymphocyte Cells. *Journal of Natural Products*, 53(3), 587-595. <https://doi.org/10.1021/np50069a008>.
- Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kalé, L., & Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1781-1802. <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>.
- Pumroy, R., & Cingolani, G. (2015). Diversification of importin- $\alpha$  isoforms in cellular trafficking and disease states. *The Biochemical journal*. <https://doi.org/10.1042/BJ20141186>.
- Ryu, Y. B., Jeong, H. J., Kim, J. H., Kim, Y. M., Park, J. Y., Kim, D., Nguyen, T. T. H., Park, S. J., Chang, J. S., Park, K. H., Rho, M.-C., & Lee, W. S. (2010). Biflavonoids from *Torreya nucifera* displaying SARS-CoV 3CLpro inhibition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(22), 7940-7947. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.09.035>
- Shahraki, O., Zargari, F., Edraki, N., Khoshneviszadeh, M., Firuzi, O., & Miri, R. (2018). Molecular dynamics simulation and molecular docking studies of 1,4-Dihydropyridines as P-glycoprotein's allosteric inhibitors. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 36(1), 112-125. <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1268976>.
- Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2018). Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel: A review. *Food Chemistry*, 261, 75-86. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.039>
- Suručić, R., Tubić, B., Stojilković, M. P., Djuric, D. M., Travar, M., Grabež, M., Šavikin, K., & Škrbić, R. (2020). Computational study of pomegranate peel extract polyphenols as potential inhibitors of SARS-CoV-2 virus internalization. *Molecular and Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03981-7>.
- Tay, M. Y. F., Fraser, J. E., Chan, W. K. K., Moreland, N. J., Rathore, A. P., Wang, C., Vasudevan, S. G., & Jans, D. A. (2013). Nuclear localization of dengue virus (DENV) 1-4 non-structural protein 5; protection against all 4 DENV serotypes by the inhibitor Ivermectin. *Antiviral Research*, 99(3), 301-306. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.06.002>.
- Timani, K. A., Liao, Q., Ye, L., Zeng, Y., Liu, J., Zheng, Y., Ye, L., Yang, X., Lingbao, K., Gao, J., & Zhu, Y. (2005). Nuclear/nucleolar localization properties of C-terminal nucleocapsid protein of SARS coronavirus. *Virus Research*, 114(1), 23-34. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.05.007>.
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455-461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- Trowitzsch, S., Viola, C., Scheer, E., Conic, S., Chavant, V., Fournier, M., Papai, G., Ebong, I.-O., Schaffitzel, C., Zou, J., Haffke, M., Rappsilber, J., Robinson, C. V., Schultz, P., Tora, L., & Berger, I. (2015). Cytoplasmic TAF2-TAF8-TAF10 complex provides evidence for nuclear holo-TFIID assembly from preformed sub-modules. *Nature Communications*, 6(1), 6011. <https://doi.org/10.1038/ncomms7011>.
- Vane, J. R., & Botting, R. M. (2003). The mechanism of action of aspirin. *Thrombosis Research*, 110(5), 255-258. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(03\)00379-7](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(03)00379-7).
- Vanommeslaeghe, K., Hatcher, E., Acharya, C., Kundu, S., Zhong, S., Shim, J., Darian, E., Guvench, O., Lopes, P., Vorobyov, I., & Mackerell, A. D. (2010). CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *Journal of Computational Chemistry*, 31(4), 671-690. <https://doi.org/10.1002/jcc.21367>.
- Wulan, W. N., Heydet, D., Walker, E. J., Gahan, M. E., & Ghildyal, R. (2015). Nucleocytoplasmic transport of nucleocapsid proteins of enveloped RNA viruses. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00553>.
- Yang, S. N. Y., Atkinson, S. C., Wang, C., Lee, A., Bogoyevitch, M. A., Borg, N. A., & Jans, D. A. (2020). The broad spectrum antiviral ivermectin targets the host nuclear transport importin  $\alpha/\beta$ 1 heterodimer. *Antiviral Research*, 177, 104760. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104760>.
- Yu, S., Yan, H., Zhang, L., Shan, M., Chen, P., Ding, A., & Li, S. F. Y. (2017). A Review on the Phytochemistry, Pharmacology, and Pharmacokinetics of Amentoflavone, a Naturally-Occurring Biflavonoid. *Molecules*, 22(2), 299. <https://doi.org/10.3390/molecules22020299>.