

INDICE.

INDICE DE FIGURAS.....	3
INDICE DE GRÁFICOS.....	5
INDICE DE TABLAS.....	6
INDICE DE ECUACIONES.....	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Anemia infecciosa del salmón.....	10
1.2 Nucleoproteína (NP).....	12
1.3 Flavonoides.....	13
1.4 Antecedentes previos.....	15
2. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	18
2.1 Hipótesis.....	18
2.2 Objetivo general.....	18
2.3 Objetivos específicos.....	19
3. MATERIALES Y METODOS.....	20
3.1 Metodología <i>in silico</i>	20
3.1.1 Análisis de farmacóforo.....	20
3.1.2 QSAR (Relación cuantitativa estructura actividad).....	20
3.1.3 Construcción de ligandos y cálculos de cargas parciales.....	22
3.1.4 Preparación de la Proteína y Ligando.....	23
3.1.5 Acoplamiento proteína-ligando.....	24
3.1.6 Simulación molecular dirigida (SMD).....	25
3.2 Metodología <i>ex vivo</i>	29
3.2.1 Cepas.....	29
3.2.1.1 Células ASK.....	29
3.2.1.2 Virus Recombinante.....	29
3.2.2 Propagación de células y virus.....	29
3.2.2.1 Subcultivo de Células ASK.....	29
3.2.2.2 Propagación viral en células ASK.....	30

3.2.3 Titulación viral (TCID ₅₀).	30
3.2.4 Evaluación de citotoxicidad.	32
3.2.5. Determinación de actividad antiviral.	34
4. RESULTADOS.....	37
4.1 Resultados <i>in silico</i>	37
4.1.1 Farmacóforo	37
4.1.2 QSAR.	39
4.1.3 Acoplamiento proteína ligando.	44
4.1.4 Dinámica molecular.	48
4.1.5 Dinámica molecular dirigida.	51
4.1.5.1 SMD Ribavirina en ISAV-NP.	51
4.1.5.2 SMD IR-3 en ISAV-NP.	53
4.1.5.3 SMD IR-201 en ISAV-NP.	54
4.1.5.4 SMD IR-303 en ISAV-NP.	56
4.2 Resultados <i>ex vivo</i>	58
4.2.1 Determinación de título viral.	58
4.2.2 Evaluación de citotoxicidad.	60
4.2.3 Evaluación actividad antiviral.	62
5. DISCUSIÓN.....	677
5.1 Análisis de resultados farmacóforo y QSAR.	688
5.2 Análisis de resultados dinámica molecular.	700
5.3 Correlación de resultados <i>in silico</i> con los resultados experimentales <i>ex vivo</i>	711
6. CONCLUSIÓN.....	744
7. REFERENCIAS.	755
8.ANEXOS.....	79
8.1 Script utilizado para crear los archivos de configuración para SMD.....	79
8.2 Archivo de Configuración NAMD: Minimización.....	79
8.3 Archivo de Configuración NAMD: SMD.	811
8.2 Secuencia aminoacídica de NP.....	844
8.4 Tutoriales.....	855

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1.1.Árbol de distancias genéticas entre las proteínas de la familia <i>Orthomyxoviridae</i>	11
Figura 1.2.Representación esquemática del genoma lineal segmentado RNA simple hebra (-) del virus ISA.....	12
Figura 1.3.Estructuras tridimensionales de NP-ISAV.....	13
Figura 1.4.Estructura general de flavonoides.....	14
Figura 1.5.Resultados de la exposición de células infectadas con virus influenza A a Biocanina A y Baicaleina.....	16
Figura 3.1.Estructura de ligandos isoflavonas e isoflavanas.....	23
Figura 3.2 Estructura de molécula control Ribavirina.....	23
Figura 3.3 Representación esquemática de la distribución de las diluciones y cepas virales para ensayo de solución viral.....	31
Figura 3.4.Representación del procedimiento de medición de fluorescencia de las muestras.....	32
Figura 3.5. Representación esquemática de la distribución de los tratamientos evaluados mediante ensayo MTT.....	33
Figura 3.6 Esquema del procedimiento empleado para medición de absorbancia, para método colorimétrico de MTT (viabilidad celular).....	34
Figura 3.7 Representación esquemática de la distribución de los tratamientos aplicados a células infectadas con isav.....	35
Figura 4.1.Farmacóforos identificados para los 11 ligandos generados.....	36
Figura 4.2 Códigos de colores entregado por MOE.....	37
Figura 4.3 Propiedades farmacofóricas consenso de la superposición de los ligandos.....	37
Figura 4.4 Reporte de la ecuación lineal del modelo predictivo, entregado por MOE para QSAR.....	42
Figura 4.5 Resultados Docking. A) Superposición de los ligandos HIR-7,	

HIR-11, IR-3, IR-201, IR-202, IR-205, IR-206, IR-303, IR-313 B) Superposición de compuestos IR-4 e IR-204.....	44
Figura 4.6 Representación de los ligandos. A) HIR-7, B) HIR-11, C) IR-3, D) IR-201, E) IR-202, F) IR-205, G) IR-206, H) IR-303 e I) IR-313.....	45
Figura 4.7 A) Representación esquemática del sitio de unión de la Ribavirina en la nucleoproteína de ISAV B) En naranja se muestra la Ribavirina y en naranja se destacan los sitios de unión de los ligandos candidatos como inhibidores en este estudio.....	46
Figura 4.8 Representación de la interacción con ácido glutámico 493, compartido entre Ribavirina (Naranja) y la superposición de ligandos candidatos.....	47
Figura 4.9 Trayectoria RMSD en función del tiempo sobre la nucleoproteína de ISAV de los ligandos candidatos.....	49
Figura 4.10. Interacciones involucradas en la trayectoria de SMD entre Ribavirina e ISAV-NP. A) 0ps, B) 308.870ps, C) 968970ps y D) 1626720ps.	52
Figura 4.11. Interacciones involucradas en la trayectoria de SMD entre IR- 3 e ISAV-NP. A) 0ps, B) 322880ps, C) 397870ps y D) 534250ps.....	54
Figura 4.12. Interacciones involucradas en la trayectoria de SMD entre IR- 201 e ISAV-NP. A) 0ps, B) 666450ps, C) 726420ps y D) 1284380ps.....	55
Figura 4.13. Interacciones involucradas en la trayectoria de SMD entre IR- 303 e ISAV-NP. A) 0ps, B) 379410ps, C) 461270ps , D) 1373220ps y E)1766140ps.....	57
Figura 4.14. Efecto citopático de ISAV (HE-GFP) sobre células ASK y sobre cultivos infectados y tratados con Ribavirina, IR-3, IR-201 e IR3- 03.....	63

INDICE DE GRÁFICOS.

Gráfico 4.1 Gráfico IC50.....	43
Gráfico 4.2. Perfil de fuerza promedio v/s tiempo de SMD de Ribavirina en la nucleoproteína de ISAV.....	51
Gráfico 4.3. Perfil de fuerza promedio v/s tiempo de SMD de IR-3 en la nucleoproteína de ISAV.....	53
Gráfico 4.4. Perfil de fuerza promedio v/s tiempo de SMD de IR-201 en la nucleoproteína de ISAV.....	54
Gráfico 4.5. Perfil de fuerza promedio v/s tiempo de SMD de IR-303 en la nucleoproteína de ISAV.....	55
Gráfico 4.6. Valores de fluorescencia medida a 485 nm para las diluciones virales de 41, 42 y HE-GFP.....	58
Gráfico 4.7 Comportamiento de la fluorescencia a distintas diluciones virales, al restar el valor base que equivale a fluorescencia medida en células sin infectar.....	59
Gráfico 4.8 Gráfico de resultados obtenidos a partir de análisis MTT.....	61
Gráfico 4.9. Representación de los valores de para evaluación de actividad antiviral.....	65

INDICE DE TABLAS.

Tabla 3.1 Cuadro explicativo de cada descriptor evaluado mediante metodología QuaSAR.....	21
Tabla 4.1 Valores obtenidos por QSAR para descriptores de estructura de set de compuestos evaluados.....	39
Tabla 4.2 Valores de descriptores QSAR para Baicaleina y Biocaina A.....	40
Tabla 4.3 Tabla con los valores medios de fluorescencias, obtenidos a partir de las replicas del ensayo de titulo viral.....	58
Tabla 4.4 Tabla resumen con los valores medios de mediciones de absorvancias realizadas para los ensayos de viabilidad celular.....	60
Tabla 5.1 Datos de IC ₅₀ e índice de selectividad obtenidos de ensayos de actividad biológica de flavonoides contra una cepa de H5N1.....	68

INDICE DE ECUACIONES.

Ecuación 1.1. Ecuación Hansch.....	16
Ecuación 3.1. Ecuación de Autodock para el cálculo de energía libre asociado a la interacción proteína/ligando.....	25
Ecuación 3.2 Ecuación de campo de fuerza.....	26
Ecuación 3.3. Ecuación de la distribución de Maxwell-Boltzmann.....	27
Ecuación 4.1. <i>Expresión de la desviación cuadrática media (RMSD)</i>	48