

## Acoplamiento molecular entre la proteína viral 1 del virus de la enfermedad infecciosa de la bursa y fitoconstituyentes de *Withania somnifera* (L.) Dunal: Un enfoque computacional

### Molecular docking between the viral protein 1 of the infectious bursal disease virus and phytoconstituents of *Withania somnifera* (L.) Dunal: A computational approach

Elvio Gayozo<sup>1\*</sup>, Laura Rojas<sup>2</sup>, Liz Castro<sup>3</sup>

#### RESUMEN

La enfermedad infecciosa bursal es una patología de origen viral que afecta a aves de corral ocasionando una alta tasa de mortalidad. Las vacunas existentes se enfrentan al problema de la aparición de nuevas cepas, por lo que se realizan búsquedas de moléculas con potencial afinidad de unión a proteínas virales. El extracto de *Withania somnifera* interviene en la replicación del virus de la bursitis infecciosa, pero el posible mecanismo de acción no es bien conocido. El objetivo de este estudio fue identificar a través de métodos *in silico* los fitoconstituyentes de *W. somnifera* con afinidad de unión al sitio activo de la proteína viral 1 (VP1) del virus de la bursitis infecciosa. Se realizaron pruebas de acoplamiento molecular entre la VP1 y 27 fitoconstituyentes descritos en *W. somnifera*. Los datos de energía de unión obtenidos fueron analizados con el test de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn ( $p < 0.05$ ). Los resultados evidenciaron que los compuestos somniferina, witanólido A, witanólido N, witanólido R, witanólido S y witasomniferol C

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología, San Lorenzo, Paraguay

<sup>2</sup> Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Microbiología Industrial, San Lorenzo, Paraguay

<sup>3</sup> Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Veterinarias, Departamento de Genética y Zootecnia, San Lorenzo, Paraguay

\* E-mail: [elviologo@gmail.com](mailto:elviologo@gmail.com)

Recibido: 18 de enero de 2022

Aceptado para publicación: 28 de agosto de 2022

Publicado: 27 de octubre de 2022

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

presentaron energía libre de interacción significativamente favorables ( $p < 0.001$ ) con valores de  $-8.92 \pm 0.15$ ,  $-7.98 \pm 0.20$ ,  $-7.56 \pm 0.28$ ,  $-8.09 \pm 0.01$ ,  $-8.39 \pm 0.01$  y  $-7.99 \pm 0.23$  kcal.mol<sup>-1</sup>, respectivamente. Los residuos identificados en las interacciones entre la VP1 y los fitoconstituyentes fueron Arg175, Arg335, Asp402, Asn403, Lys419, Glu421 y Asn493, los cuales poseen funciones cruciales en el proceso de replicación del genoma viral. El fitoconstituyente con mejor resultado de acoplamiento con la VP1 fue la somniferina, la cual demostró afinidades de interacción favorable por el sitio activo de la proteína; sin embargo, se requiere la validación experimental *in vitro* de estas observaciones.

**Palabras clave:** enfermedad Gumboro, metabolitos secundarios, acoplamiento molecular, Ashwagandha

## ABSTRACT

Infectious bursal disease is a pathology of viral origin that affects poultry, causing a high mortality rate. Existing vaccines face the problem of the appearance of new strains, so searches are made for molecules with potential binding affinity to viral proteins. *Withania somnifera* extract is involved in the replication of infectious bursitis virus, but the possible mechanism of action is not well understood. The aim of this study was to identify, through *in silico* methods, the phytoconstituents of *W. somnifera* with binding affinity to the active site of viral protein 1 (VP1) of infectious bursal disease virus. Molecular docking assays were performed between VP1 and 27 phytoconstituents described in *W. somnifera*. The binding energy data obtained were analysed with the Kruskal-Wallis test and Dunn's test ( $p < 0.05$ ). The results showed that the compounds somniferin, withanolide A, withanolide N, withanolide R, withanolide S and witasomniferol C presented significantly favourable binding free energy ( $p < 0.001$ ) with values of  $-8.92 \pm 0.15$ ,  $-7.98 \pm 0.20$ ,  $-7.56 \pm 0.28$ ,  $-8.09 \pm 0.01$ ,  $-8.39 \pm 0.01$  and  $-7.99 \pm 0.23$  kcal.mol<sup>-1</sup>, respectively. The residues identified in the interactions between VP1 and the phytoconstituents were Arg175, Arg335, Asp402, Asn403, Lys419, Glu421 and Asn493, which possess crucial functions in the viral genome replication process. The phytoconstituent with the best docking result to VP1 was somniferin, which showed favourable binding affinities to the active site of the protein; however, *in vitro* experimental validation of these observations is required.

**Key words:** Gumboro disease, secondary metabolites, molecular docking, Ashwagandha

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad infecciosa bursal, también conocida como enfermedad de Gumboro, es una enfermedad viral, altamente contagiosa e inmunosupresora que afecta a aves jóvenes, siendo responsable de importantes pérdidas económicas en la industria avícola a nivel mundial. Es producida por un virus ARN de doble cadena bisegmentado (segmentos A y B) del género *Avibirnavirus* y familia *Birnaviridae* (Murphy *et al.*, 1999).

El segmento A contiene dos marcos de lectura que se solapan parcialmente. El marco de lectura abierto 1 (ORF1, por sus siglas en inglés *Open Reading Frame*) codifica una poliproteína de 110 kDa que se empalma autocatalíticamente en las proteínas virales VP2 (48 kDa), VP3 (33-35 kDa) y VP4 (24 kDa), en tanto que el marco de lectura abierto 2 (ORF2) codifica a una proteína no estructural de 17 kDa, la VP5 (Toscano Hurtado, 2016). El segmento B tiene 2.8 kDa de longitud y codifica a la proteína VP1, una proteína de 97 kDa con actividad polimerasa

dependiente de ARN y se presenta tanto libre como ligada al genoma (Toskano Hurtado, 2016). Esta última desempeña un papel clave en la encapsulación de las partículas virales e interactúa con VP3 para formar el complejo VP1-VP3 que da integridad estructural a las partículas virales (Mahgoub, 2012; Dey *et al.*, 2019).

La forma de prevención de la enfermedad es mediante la vacunación de las parvadas (vacunas de virus atenuados, inactivados, recombinantes que contienen la proteína VP2) y mediante el empleo de inmunocomplejos antígeno-anticuerpo (Mahgoub, 2012; Toskano Hurtado, 2016; Wu *et al.*, 2020). Pese a la existencia de una gran variedad de vacunas, el control de la enfermedad sigue siendo un reto, debido a estimaciones epidemiológicas inexactas (Sun *et al.*, 2013). Ante esto, la comunidad científica desarrolla nuevas estrategias como la búsqueda de compuestos inhibidores de proteínas para combatir las afecciones de origen viral.

La primera etapa en la búsqueda y desarrollo de nuevas moléculas con potencial uso farmacológico utiliza recursos computacionales enfocados en el análisis de las propiedades fisicoquímicas, toxicológicas, farmacéuticas, ADMET, entre otras, de las moléculas; así como, de las interacciones ligando-proteína en los sitios activos/catalíticos o alostéricos que conlleven hacia una potencial actividad biológica, optimizando de esta manera la inversión de tiempo y costo en el diseño de nuevos fármacos (Anwar *et al.*, 2021). Generalmente la búsqueda se realiza con productos naturales, ya que las plantas son fuentes inagotables de compuestos que presentan actividades antivirales contra una considerable cantidad de virus (Kapoor *et al.*, 2017). Los mecanismos de acción pueden ser varios, como la inhibición de una o varias etapas importantes en el ciclo replicativo, la entrada viral o el proceso de replicación del virus (Kapoor *et al.*, 2017).

La especie *Whitania somnifera* (L) Dunal es ampliamente empleada principalmente por sus propiedades antimicrobianas, utilizada para el tratamiento de afecciones como la tuberculosis y enfermedades de transmisión sexual (ETS) (Gupta y Rana, 2007). También se ha demostrado actividades antivirales contra el virus del herpes simplex tipo I (VHS-1) (Kambizi *et al.*, 2007). Asimismo, Mofed *et al.* (2020) han reportado reducciones de la carga viral del virus de la hepatitis C en el tratamiento con el extracto acuoso de *W. somnifera* en concentraciones de 25 mg.ml<sup>-1</sup>.

Pant *et al.* (2012) trabajaron con el extracto hidroalcohólico de *W. somnifera* demostrando su eficacia al inhibir la replicación del virus de la enfermedad infecciosa bursal (IBDV, por sus siglas en inglés *Infectious Bursal Disease Virus*) en un 99.9% a concentraciones seguras (25 µg.mL<sup>-1</sup>) y no citotóxicas; sin embargo, se desconoce el mecanismo de acción. El objetivo del presente estudio fue identificar los fitoconstituyentes descritos en *W. somnifera* que presenten afinidades de unión con el sitio activo de la proteína viral 1 (VP1) del IBDV y caracterizarlas mediante el análisis computacional de acoplamiento molecular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Caracterización de sitios drogables en la región catalítica de la proteína VP1*

El estudio se realizó siguiendo el esquema metodológico representado en la Figura 1. Para ello, primeramente, se hizo la búsqueda de sitios con perfiles drogables presentes en la región catalítica de la VP1 (PDB: 2R70, 2R72), siendo identificados y caracterizados empleando la herramienta DoGSite-Scorer de ProteinsPlus (Fährrolfes *et al.*, 2017; Schöning-Stierand *et al.*, 2020). La caracterización fue realizada mediante

descriptores como las dimensiones del sitio drogable, determinación de grupos funcionales y la composición de residuos; además, se estimó el puntaje de drogabilidad (Volkamer *et al.*, 2012).



Figura 1. Esquema del diseño metodológico empleado en el estudio

### *Pruebas de acoplamiento molecular entre fitoconstituyentes de *W. somnifera* y la VP1*

La estructura proteica de la VP1 del IBDV fue obtenida de la base de datos Protein Data Bank (PDB: 2R70) (Garriga *et al.*, 2007). La estructura molecular de los fitoconstituyentes descritos en *W. somnifera* se obtuvieron de la base de datos PubChem (Cuadro 1) (Gupta y Rana, 2007).

Primeramente, se procedió a eliminar las moléculas de agua presente en la estructura proteica, luego se aplicó el método de campo de fuerza UFF (*Universal Force Field*) junto con el algoritmo de optimización de gradientes conjugados, y a continuación se proporcionaron de cargas parciales y de átomos de hidrógeno polares presentes a pH fisiológico de 7.4, utilizando el programa Avogadro 1.2 (Hanwell *et al.*, 2012).

Las pruebas exploratorias de acoplamiento molecular se llevaron a cabo utilizando el modelo tipo receptor-ligando, utilizando una caja de acoplamiento con dimensiones de 21.22 x 25.15 x 18.50 Å<sup>3</sup> dirigido al sitio drogable identificado en el sitio catalítico. Para ello se emplearon los programas LeDock (Zhao y Caflisch, 2013) y AutoDock Vina (Trott y Olson, 2010). Como controles del sistema de acoplamiento se emplearon a los ribonucleótidos adenosina trifosfato (ATP), guanosina trifosfato (GTP), citosina trifosfato (CTP) y uridina trifosfato (UTP).

De los resultados obtenidos se seleccionaron aquellos ligandos que presentaron valores de energía libre de unión ( $\Delta G$ ) más favorables (baja energía). Estos fueron sometidos a pruebas de mayor exhaustividad (exhaustividad = 20) haciendo cincuenta repeticiones mediante el programa AutoDock Vina (Trott y Olson, 2010), a modo de minimizar el grado de incerteza y reducir los errores de las simulaciones. La precisión de los procedimientos de acoplamiento molecular se garantizó volviendo a acoplar el ligando co-cristalizado con la proteína (PDB: 2R72) y calculando valor de RMSD (raíz de la desviación cuadrática media). La visualización y el análisis de los complejos resultantes de las pruebas de acoplamiento molecular se realizaron utilizando el programa Discovery Studio Visualizer v. 20 (BIOVIA Dassault Systèmes, 2020) y Visual Molecular Dynamics (Humphrey *et al.*, 1996).

### *Predicción de propiedades ADME de fitoconstituyentes de *W. somnifera**

Las propiedades ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción) de los fitoconstituyentes que presentaron valores más favorables de energía de unión fueron caracterizadas empleando la regla de Lipinski (Butina *et al.*, 2002; Selick *et al.*, 2002), utilizando la herramienta SwissADME (Daina *et al.*, 2017; Daina y Zoete, 2016).

### *Análisis estadísticos*

Los datos obtenidos en las pruebas de acoplamiento molecular fueron analizados mediante el test de Kruskal-Wallis y la prueba *post-hoc* de Dunn (5% de nivel de significancia), utilizando el programa Past 4.08 (Hammer *et al.*, 2001).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de las estructuras de la VP1 evidenció la presencia de un sitio con un alto puntaje de drogabilidad igual a 0.83 ubicado

Cuadro 1. Resultados obtenidos en las pruebas de acoplamiento molecular

Molécula	Grupo químico	PubChem CID	LeDock	AutoDock Vina
			$\Delta G$ de unión (kcal.mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ de unión (kcal.mol <sup>-1</sup> )
ATP†	Nucleótido	5957	-11,02	-7,2
GTP†	Nucleótido	135398633	-11,52	-6,7
CTP†	Nucleótido	6176	-11,66	-7,3
UTP†	Nucleótido	6133	-10,91	-7,4
(-)-Anaférina	Alcaloide	443143	-4,72	-5,0
Anahigrina	Alcaloide	12306778	-4,74	-5,3
Colina	N. E	305	-2,12	-3,0
Cuscohigrina	Alcaloide	1201543	-4,19	-4,8
Higrina	Alcaloide	440933	-3,28	-3,8
Peletierina	Alcaloide	92987	-4,07	-3,8
Somniferina	Alcaloide	14106343	-6,39	-9,2
Tropina	D. A	8424	-2,91	-3,9
Witaferina A	C. E	265237	-5,44	-7,5
Witanólido A	C. E	11294368	-5,41	-8,4
Witanólido B	C. E	14236711	-7,07	-7,9
Witanólido D	C. E	161671	-5,27	-8,1
Witanólido E	C. E	301751	-5,71	-8,2
Witanólido G	C. E	21679023	-4,91	-8,4
Witanólido J	C. E	21679022	-4,92	-8,2
Witanólido L	C. E	179575	-4,53	-8,1
Witanólido M	C. E	25090669	-4,66	-8,2
Witanólido N	C. E	23266147	-5,48	-8,1
Witanólido O	C. E	23266146	-5,06	-8,0
Witanólido P	C. E	21679034	-5,28	-7,7
Witanólido Q	C. E	101281365	-5,79	-7,9
Witanólido R	C. E	101281364	-5,31	-8,1
Witanólido S	C. E	11049407	-5,42	-8,4
Witanona	C. E	21679027	-5,08	-8,0
Witasomniferol B	C. E	101710595	-5,24	-7,6
Witasomniferol B	C. E	101710596	-5,15	-8,1
Witasomniferol C	C. E	101710597	-5,58	-8,3

† Controles, N. E: Nutriente esencial, D. A: Derivado alcaloide, C. E: Compuestos esteroidicos

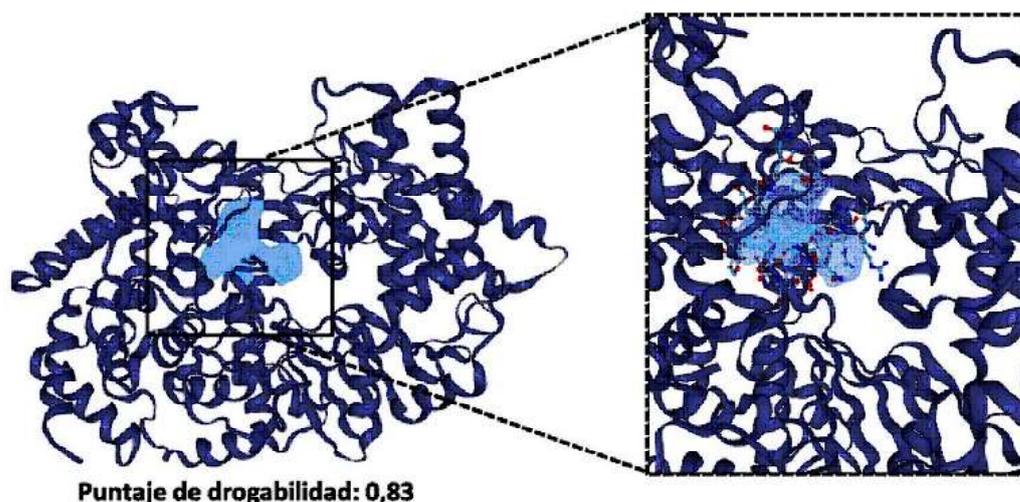


Figura 2. Sitio drogable (región resaltada) situado en la región catalítica de la VP1 (PDB: 2R72)

en la región catalítica de la proteína, según fue descrito por Garriga *et al.* (2007), quienes reportaron que los residuos activos del sitio catalítico de la VP1 son Arg175, Lys333, Arg335, Asp402, Asn403, Asp416, Lys419, Glu421, Asn493 y Lys529. Este sitio presenta un volumen de 579,49 Å<sup>3</sup>, una superficie de 69.31 Å<sup>2</sup> y una profundidad de 21.53 Å (Figura 2). Según Volkamer *et al.* (2012) los índices de drogabilidad pueden tomar valores desde 0 a 1, donde aquellos puntajes cercanos a 1 indican su potencial uso como blanco para la búsqueda de inhibidores, siendo considerado puntajes mayores a 0.50 como valores óptimos (Volkamer *et al.*, 2012).

El sitio drogable se encuentra conformado por residuos apolares en un 28%, residuos polares en un 47%, residuos básicos en un 19% y residuos ácidos en un 6%. Los residuos son Tyr59, Arg175, Leu176, Met179, Lys180, Ser256, Ser257, Lys267, Leu318, Lys321, Arg335, Asn336, Ile337, Trp338, Ser339, Ala340, His345, Glu421, Ala422, Val465, Val466, ASP467, Ser468, Ser469, Cys470, Lys478, Thr479, Tyr480, Gly481, Gln482, Gly483, Ser484, Gly485, Asn486, Ala488 y Thr489, de entre los cuales Arg175,

Arg335 y Glu421 son residuos que se encuentran cumpliendo funciones importantes en el sitio catalítico de la VP1 (Garriga *et al.*, 2007).

El sitio se encuentra conformado por 22 grupos funcionales capaces de actuar como donadores en puentes de hidrógeno, 54 grupos funcionales aceptores en puentes de hidrógeno y 13 grupos funcionales capaces de participar en la formación de interacciones hidrofóbicas, con una proporción de hidrofobicidad de 0.15.

Los resultados de las pruebas exploratorias de acoplamiento molecular demostraron que los fitoconstituyentes con valores más favorables de energía libre de interacción fueron la somniferina, los witanólidos A, N, R, S, y el witasomniferol C. Estos compuestos fueron seleccionados para llevar a cabo pruebas de mayor exhaustividad (Cuadro 1), pruebas que revelaron que estos fitoconstituyentes presentan valores significativamente favorables ( $p < 0.001$ ) de energía libre de interacción con la región catalítica de la VP1 en comparación con a los resultados obtenidos con los controles (Figura 3).

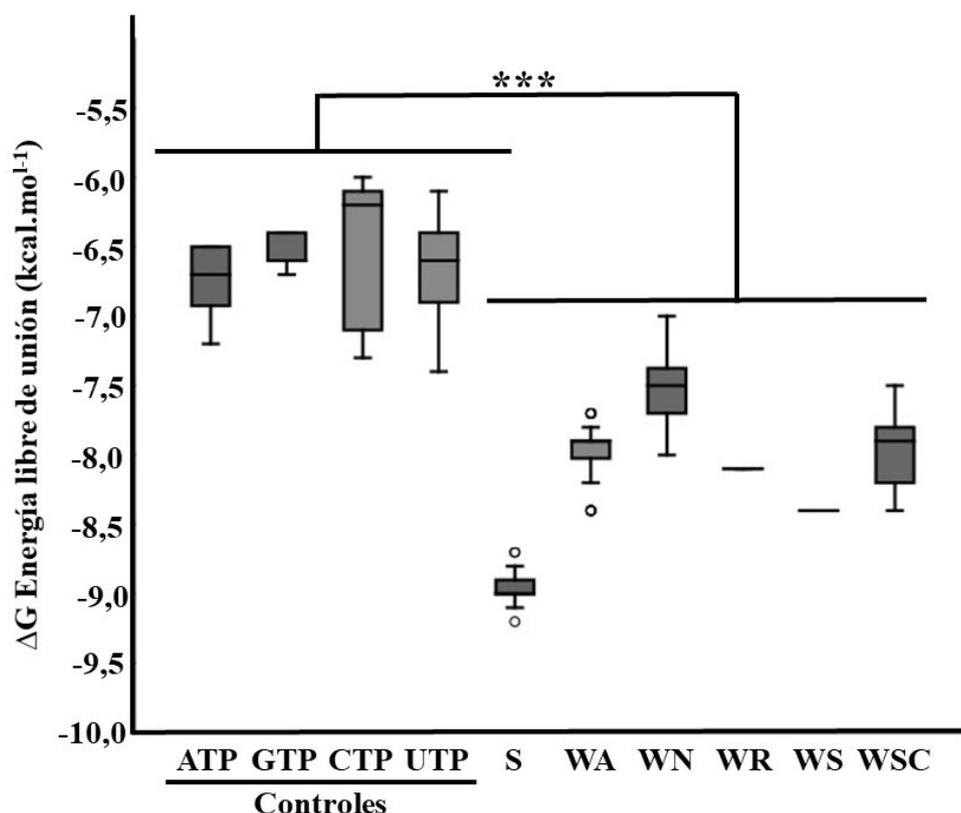


Figura 3. Energía libre de interacción ( $\Delta G$ ) registrada en las pruebas con mayor exhaustividad. S: Somniferina, WA: witanólido A, WN: witanólido N, WR: witanólido R, WS: witanólido S, WSC: witasomniferol C (\*\*\*) $p < 0.001$

La somniferina presentó una energía libre de unión igual a  $-8.92 \pm 0.15 \text{ kcal.mol}^{-1}$  y resultó ser el ligando con la energía más baja detectada en comparación a los otros fitoconstituyentes. Los residuos activos identificados fueron Arg175, Met179, Arg335, Asp402, Lys419, Glu421 y Arg592, donde Arg175, Arg335, Asp402, Lys419 y Glu421 son residuos con roles importantes en el sitio catalítico de la VP1 (Garriga *et al.*, 2007).

Se pudo registrar interacciones del tipo puentes de hidrógeno entre la somniferina y el residuo Arg335, interacciones del tipo carbono-hidrógeno no convencionales con el Asp402, interacciones electroestáticas con los residuos Arg175 y Arg532 (orbitales  $\pi$ -catión) y con el residuo Glu421 (orbitales  $\pi$ -anión),

interacciones entre cadenas de alquilo con la Met179 e interacciones entre orbitales  $\pi$  y las cadenas de alquilo con los residuos Lys419 y Arg335 (Figura 4.A).

El witanólido A reveló una energía libre de unión de  $-7.98 \pm 0.20 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , donde los residuos activos registrados fueron Arg175, Asn403 y Asn493, con los cuales solo se identificaron la formación de puentes de hidrógeno convencionales, donde Arg175 y Asn493 son aminoácidos con funciones importantes en el sitio catalítico (Garriga *et al.*, 2007) (Figura 4.B). A su vez, el witanólido N evidenció una energía libre de unión de  $-7.56 \pm 0.28 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . Los residuos que se encontraban participando activamente en la formación del complejo con la VP1 son Arg175, Asp402 y

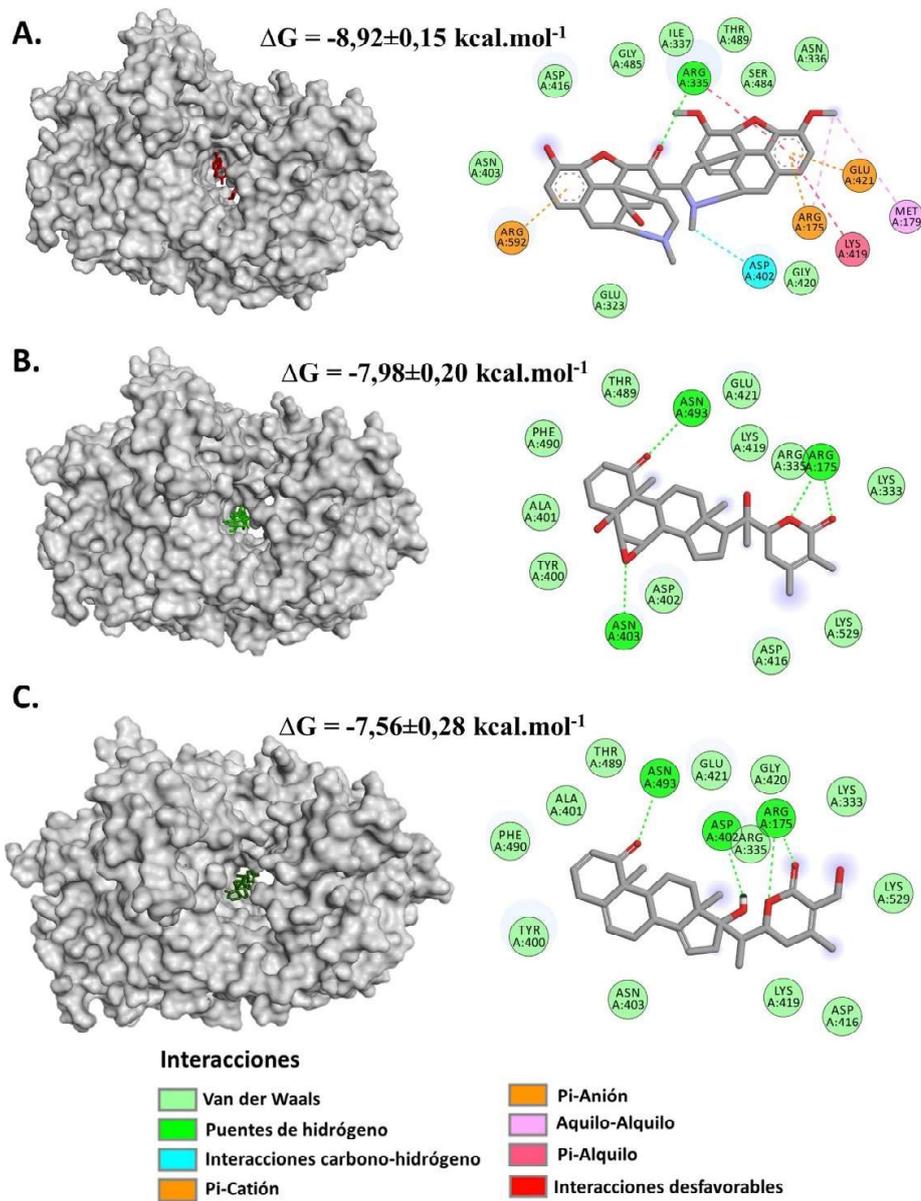


Figura 4. Representaci3n gr3fica tridimensional y bidimensional del acoplamiento molecular entre fitoconstituyentes de *W. somnifera* y la regi3n catal3tica de VP1. A. Somniferol. B. Witan3lido A. C. Witan3lido N

Asn493, con los cuales el ligando se encontraba interaccionando mediante puentes de hidrógeno; no obstante, Arg175, Asp402 y Asn493 son asimismo residuos importantes del sitio catalítico (Garriga *et al.*, 2007) (Figura 4.C).

El witan3lido R demostr3 una energ3a libre de  $-8.09 \pm 0.014 \text{ kcal.mol}^{-1}$  en uni3n a la regi3n catal3tica de la VP1. Los residuos activos registrados fueron Arg175, Asn403 y Asn493, con los cuales se formaron puentes de hidrógeno con el ligando (Figura 5.A).

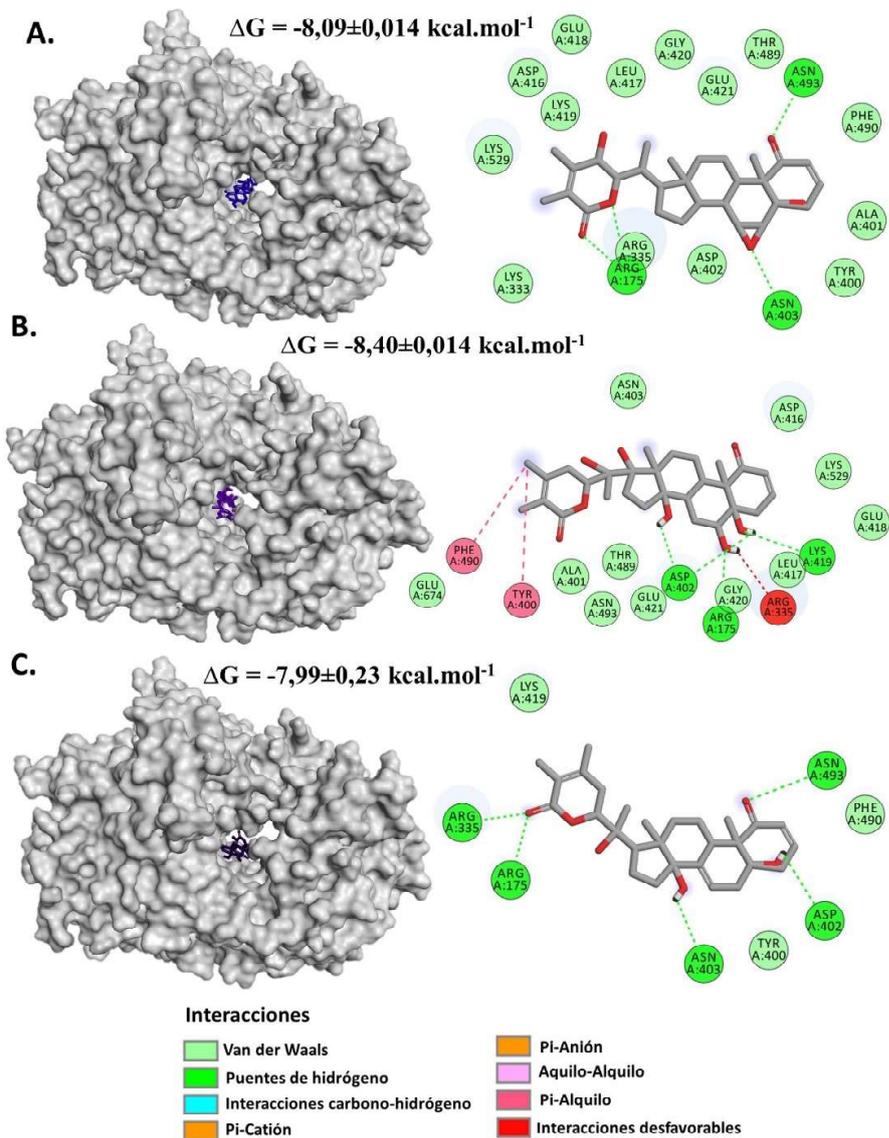


Figura 5. Representación gráfica tridimensional y bidimensional del acoplamiento molecular entre fitoconstituyentes de *W. somnifera* y la región catalítica de VP1. A. Witanólido R. B. Witanólido S. C. Witasomniferol C

Estos residuos cumplen roles importantes en el sitio catalítico de la VP1 (Garriga *et al.*, 2007).

El witanólido S presentó una energía libre de unión de  $-8.40 \pm 0.014 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . Los residuos activos fueron la Arg175, Asp402, Lys419, Tyr400 y Phe490. Se detectó la formación de puentes de hidrógeno entre el ligando y los residuos activos Arg175, Asp402

y Lys419. También se registró la formación de interacciones entre los orbitales  $\pi$  de las cadenas laterales de los residuos Tyr400 y la Phe490 y las cadenas de alquilo del ligando. Sin embargo, se identificó la presencia de interacciones desfavorables entre el ligando y el residuo Arg335 lo cual es generado debido a repulsiones existentes entre átomos del residuo y del ligando, lo cual podría reducir la estabilidad del complejo (Dhorajiwala *et al.*,

Cuadro 2. Propiedades ADME según la regla de Lipinski de los fitoconstituyentes con valores energéticos favorables

Parámetros	S	WA	WN	WR	WS	WSC
PM (Da)	608.68	470.60	452.58	470.60	504.61	470.60
Aceptores P-H	9	6	5	6	8	6
Donadores P-H	2	2	2	2	5	3
LogP	4.12	3.39	3.44	3.75	3.31	3.49
Absorción GI	Alto	Alto	Alto	Alto	Bajo	Alto
Inhibidor CYP1A2	No	No	No	No	No	No
Inhibidor CYP2C19	No	No	No	No	No	No
Inhibidor CYP2C9	No	No	Si	No	No	No
Inhibidor CYP2D6	No	No	No	No	No	No
Inhibidor CYP3A4	No	No	Si	No	No	No
Infracciones	1	0	0	0	1	0

PM: peso molecular, Da: Dalton, P-H: puente de hidrógeno, LogP: coeficiente de partición octanol-agua, GI: gastrointestinal, CYP: citocromo P450. S: Somniferina, WA: witanólido A, WN: witanólido N, WR: witanólido R, WS: witanólido S, WSC: witasomniferol C.

2019) (Figura 5.B). Entre estos, los residuos Arg175, Asp402 y Lys419 son aminoácidos con funciones importantes en el sitio catalítico de la enzima (Garriga *et al.*, 2007).

Finalmente, el compuesto witasomniferol C demostró una energía de interacción de  $-7.99 \pm 0.23$  kcal.mol<sup>-1</sup>. Los residuos activos identificados fueron Arg175, Arg335, Asp402, Asn403 y Asn493, con los cuales el ligando se encontraba formando puentes de hidrógeno convencionales (Figura 5.C). Todos los residuos registrados como activos con el witasomniferol C son aminoácidos que cumplen papeles importantes en el sitio activo de la VP1 (Garriga *et al.*, 2007). La evaluación de la precisión de los ensayos mediante el redocking del ligando cocrystalizado reveló un valor de RMSD igual a 2.1 Å, siendo este valor considerado como óptimo y aceptable para la validación del procedimiento de acoplamiento molecular (Mateev *et al.*, 2022).

La regla de Lipinski, también conocida como regla de los cinco, establece que las moléculas con aptitudes farmacológicas para su administración oral deben poseer un peso molecular no mayor a los 500 Da, al igual que un coeficiente de participación octanol-agua (LogP) no mayor a 5. Este ofrece información sobre la lipofiliidad de las moléculas. Asimismo, es requisito de la regla que las moléculas analizadas no posean un número mayor a 10 grupos aceptores de puentes de hidrógeno y un número no mayor a 5 grupos que actúen como donadores en los puentes de hidrógeno (Lipinski, 1995).

Los fitoconstituyentes analizados revelaron la presencia de solamente una infracción a la regla de Lipinski en los ligandos somniferina y el witanólido S, los cuales poseen un peso molecular mayor a lo recomendado por la regla (>500 Da); sin embargo, los productos naturales generalmente rompen la regla de los 5 debido que los mismos son ca-

paces de mantener el equilibrio entre el peso molecular de los compuestos, la cantidad de enlaces rotables, la capacidad de actuar como donadores en puentes de hidrógeno y la hidrofobicidad de la molécula. lo cual hace que los productos naturales presenten ventajas sobre drogas sintéticas (Ganesan, 2008) (Cuadro 2).

Es importante destacar que las predicciones sugieren que todos los fitoconstituyentes analizados presentan un alto perfil de absorción gastrointestinal excepto el witanólido S que demostró una baja absorción. Así también, las predicciones realizadas revelaron solo a la molécula del witanólido N como posible inhibidor de la proteína citocromo P450 (CYP), específicamente a las isoformas CYP2C9 y CYP3A4; sin embargo, el resto de los fitoconstituyentes analizados no demostraron ser inhibidores del CYP en ninguna de sus isoformas (Cuadro 2).

El análisis predictivo ADME sugiere que todos los fitoconstituyentes analizados presentan aptitudes para el desarrollo farmacológico, presentando resultados favorables para biodisponibilidad en sangre y para la difusión a través de las membranas (Bhal, 2019).

Muchos estudios se han enfocado en la búsqueda de constituyentes vegetales con actividades antivirales que puedan ayudar a combatir el avance del IBDV, tal es el caso de los resultados reportados por Sun *et al.* (2013), quienes empleando compuestos empleados en la medicina natural china evidenciaron que las moléculas glicirricato de dipotasio y clorhidrato de ligustrazina presentan actividades antivirales contra el virus con  $EC_{50}$  iguales a  $663.2 \pm 268.4$  and  $92.52 \pm 21.13$   $mg \cdot ml^{-1}$  e índices de selectividad mayores de 4.52 y 21.62, respectivamente, demostrando acciones de inhibición del 70-80%.

Ahmad *et al.* (2014) reportaron potenciales actividades antivirales del extracto etanólico de raíces de *Glycyrrhiza glabra*,

frutos secos de *Phyllanthus emblicus*, hojas de *Moringa oleifera* y *Eugenia jambolana* contra el IBDV en concentraciones de 12.5, 25, 50 y 100  $\mu g \cdot ml^{-1}$ , respectivamente. Así también, Anyanwu *et al.* (2017) demostraron que los alcaloides aislados de la pulpa del fruto de *Cucumis metuliferus* presentan actividades antivirales contra el IBDV a concentraciones de 6.125 y 100  $mg \cdot ml^{-1}$ , las cuales fueron seguras para el modelo biológico empleado para el estudio (células fibroblásticas embrionarias de pollo). Por otro lado, Pant *et al.* (2012) hallaron actividades antivirales importantes del extracto hidroalcohólico de las raíces de *W. somnifera* contra el IBDV, el cual evidenció un 99.9% de inhibición de la replicación viral a una concentración no tóxica de 25  $\mu g \cdot ml^{-1}$ , aunque no describieron el posible mecanismo de acción.

La proteína viral 1 (VP1) es una proteína importante para el IBDV; sin embargo, el mecanismo de activación depende de la interacción con la proteína viral 3 (VP3), por lo que es considerado como una APDA no canónica (von Einem *et al.*, 2004; Garriga *et al.*, 2007). Entre los residuos activos identificados en los complejos formados con los fitoconstituyentes analizados en este estudio, muchos de ellos son importantes para el correcto funcionamiento de la VP1; entre estos, la Arg175, Arg335, Asp402 y Asn403, los cuales cumplen una función importante en la estabilización de los nucleótidos que van ingresando a la región catalítica de la enzima (Garriga *et al.*, 2007).

Los residuos Asp402 y Glu421 se encargan específicamente de recibir a los nucleótidos ingresantes. Así también la Lys419 es uno de los residuos implicados en la activación previa de la VP1 por interacción con la VP3 (Garriga *et al.*, 2007).

Se han reportado numerosas propiedades biológicas de los witanólidos y sus derivados como la capacidad que poseen de inhibir enzimas importantes de microorganismos, al igual que los metabolitos esenciales para el

metabolismo del microorganismo (Budhiraja *et al.*, 2000). En parte estas propiedades se deben también a la capacidad que presentan este grupo de moléculas de interactuar con las membranas celulares facilitando el ingreso a las células, principalmente aquellos compuestos derivados de estructuras esteroidales, facilitando de esta manera sus acciones como antimicrobianos e inhibidores proteicos (Kopecká *et al.*, 2013).

## CONCLUSIONES

- El análisis computacional reveló que los fitoconstituyentes de *W. somnifera* que presentaron afinidades de interacción significativamente favorables ( $p < 0.001$ ) por el sitio catalítico de la VP1 del IBDV fueron la somniferina, witanólido A, witanólido N, witanólido R, witanólido S, witasomniferol C, los cuales demostraron valores de energía libre de interacción de entre  $-7.56 \pm 0.28$  a  $-8.92 \pm 0.15$  kcal.mol<sup>-1</sup>.
- Los residuos activos (Arg175, Arg335, Asp402, Asn403 y Glu421) comprometidos en la formación de los complejos con los fitoconstituyentes, poseen funciones importantes en la VP1 durante el proceso de síntesis del nuevo genoma viral.
- Los fitoconstituyentes que demostraron interacciones favorables con la región catalítica de la VP1 presentaron predicciones favorables de ADME ajustándose con la regla de los cinco de Lipinski, lo cual favorece la selección de estos compuestos para su potencial investigación farmacológica.
- Los hallazgos sugieren que estos compuestos presentes en *W. somnifera* poseen características de ser candidatos como potenciales inhibidores de la actividad de la VP1 del IBDV y, de esta manera, interferir con el ciclo replicativo del virus; sin embargo, están sujetas a ensayos *in vitro* para confirmar estas observaciones.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Programa Nacional de Incentivo a Investigadores (PRONII) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de Paraguay por el apoyo en la realización del estudio.

## LITERATURA CITADA

1. **Ahmad W, Ejaz S, Anwar K, Ashraf M. 2014.** Exploration of the *in vitro* cytotoxic and antiviral activities of different medicinal plants against infectious bursal disease (IBD) virus. *Open Life Sci* 9: 531-542. doi: 10.2478/s11535-013-0276-8
2. **Anwar T, Kumar P, Khan AU. 2021.** Modern tools and techniques in computer aided drug design. In: Coumar MS (ed). *Molecular docking for computer-aided drug design*. Academic Press. p 1-30.
3. **Anyanwu A, Jimam N, Simeon O, Wannang N. 2017.** Antiviral activities of *Cucumis metuliferus* fruits alkaloids on infectious bursal disease virus (IBDV). *J Phytopharmacol* 6: 98-101. doi: 10.31254/phyto.2017.6206
4. **Bhal S. 2019.** LogP-Making sense of the value. Toronto, Canada: Advanced chemistry development INC (ACD/LABS). [Internet]. Available in: [https://www.acdlabs.com/wp-content/uploads/2022/02/making\\_sense.pdf](https://www.acdlabs.com/wp-content/uploads/2022/02/making_sense.pdf)
5. **BIOVIA. 2020.** Biovia discovery studio. Comprehensive modeling and simulations for life sciences. Dassault Systèmes. *Discovery Studio Visualizer v. 20*, San Diego, USA: Dassault Systèmes. [Internet]. Available in: <https://discover.3ds.com/sites/default/files/2020-03/biovia-discovery-studio-overview.pdf>
6. **Budhiraja RD, Krishan P, Sudhir S. 2000.** Biological activity of withanolides. *J Scie Ind Res* 59: 904-911.
7. **Butina D, Segall MD, Frankcombe K. 2002.** Predicting ADME properties in silico: methods and models. *Drug Discov Today* 7: S83-S88. doi: 10.1016/S1359-6446(02)02288-2

8. **Daina A, Michielin O, Zoete V. 2014.** iLOGP: a simple, robust, and efficient description of n-octanol/water partition coefficient for drug design using the GB/SA approach. *J Chem Inf Model* 54: 3284-3301. doi: 10.1021/ci500467k
9. **Daina A, Michielin O, Zoete V. 2017.** SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep* 7: 42717. doi: 10.1038/srep42717
10. **Daina A, Zoete V. 2016.** A BOILED egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. *Chem Med Chem* 11: 1117-1121. doi: 10.1002/cmdc.201600182
11. **Dey S, Pathak DC, Ramamurthy N, Maity HK, Chellappa MM. 2019.** Infectious bursal disease virus in chickens: prevalence, impact, and management strategies. *Vet Med* 10: 85-97. doi: 10.2147/VMRR.S185159
12. **Dhorajiwala TM, Halder ST, Samant L. 2019.** Comparative in silico molecular docking analysis of l-threonine-3-dehydrogenase, a protein target against African trypanosomiasis using selected phytochemicals. *J Appl Biotech Reports* 6: 101-108. doi: 10.29252/JABR.-06.03.04
13. **von Einem UI, Gorbalenya AE, Schirrmeier H, Behrens S-E, Letzel T, Mundt E. 2004.** VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol* 85: 2221-2229. doi: 10.1099/vir.0.19772-0
14. **Fährrolfes R, Bietz S, Flachsenberg F, Meyder A, Nittinger E, Otto T, Volkamer A, et al. 2017.** ProteinsPlus: a web portal for structure analysis of macromolecules. *Nucleic Acids Res* 45: W337-W343. doi: 10.1093/nar/gkx333
15. **Ganesan A. 2008.** The impact of natural products upon modern drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* 12: 306-317. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.03.016
16. **Garriga D, Navarro A, Querol-Audí J, Abaitua F, Rodríguez JF, Verdaguer N. 2007.** Activation mechanism of a noncanonical RNA-dependent RNA polymerase. *P Natl Acad Sci USA* 104: 20540-20545. doi: 10.1073/pnas.07044-47104
17. **Gupta GL, Rana AC. 2007.** PHCOG MAG: Plant review *Withania somnifera* (Ashwagandha): a review. *Pharmacogn Rev* 1: 129-136.
18. **Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. 2001.** PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electronica* 4: 9.
19. **Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR. 2012.** Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminformatics* 4: 17. doi: 10.1186/1758-2946-4-17
20. **Humphrey W, Dalke A, Schulten K. 1996.** VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graphics* 14: 33-38. doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5
21. **Kambizi L, Goosen BM, Taylor MB, Afolayan AJ. 2007.** Anti-viral effects of aqueous extracts of *Aloe ferox* and *Withania somnifera* on herpes simplex virus type 1 in cell culture: research in action. *S Afr J Sci* 103: 359-360. doi: 10.10520/EJC96724
22. **Kapoor R, Sharma B, Kanwar S. 2017.** Antiviral phytochemicals: an overview. *Biochem Physiol* 06: 1-7. doi: 10.4172/2168-9652.1000220
23. **Kopeć W, Telenius J, Khandelia H. 2013.** Molecular dynamics simulations of the interactions of medicinal plant extracts and drugs with lipid bilayer membranes. *FEBS J* 280: 2785-2805. doi: 10.1111/febs.12286
24. **Lipinski CA. 1995.** Computational alerts for potential absorption problems: profiles of clinically tested drugs. Tools for Oral Absorption. Part Two. Predicting Human Absorption. In: BIOTEC POD symposium. AAPS, Miami.

25. **Mahgoub HA. 2012.** An overview of infectious bursal disease. *Arch Virol* 157: 2047-2057. doi: 10.1007/s00705-012-1377-9
26. **Mateev E, Valkova I, Angelov B, Georgieva M, Zlatkov A. 2022.** Validation through re-docking, cross-docking and ligand enrichment in various well-resolved Mao-B receptors. *Int J Pharm Sci Res* 13: 1000-1007. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.13(3).1000-08
27. **Mofed D, Ahmed W, Zekri AR, Said O, Rahouma M, Faraag AHI. 2020.** The antiviral efficacy of *Withania somnifera* (Ashwagandha) against hepatitis C virus activity: *in vitro* and *in silico* study. *Adv Microbiol* 10: 463-477. doi: 10.4236/aim.2020.109035
28. **Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ. 1999.** *Veterinary virology*. 3<sup>rd</sup> ed. London: Academic Press. 629 p.
29. **Pant M, Ambwani T, Umapathi V. 2012.** Antiviral activity of Ashwagandha extract on infectious bursal disease virus replication. *Indian J Sci Technol* 5: 2750-2751. doi: 10.17485/ijst/2012/v5i5.20
30. **Schöning-Stierand K, Diedrich K, Fährrolfes R, Flachsenberg F, Meyder A, Nittinger E, Steinegger R, et al. 2020.** ProteinsPlus: interactive analysis of protein-ligand binding interfaces. *Nucleic Acids Res* 48: W48-W53. doi: 10.1093/nar/gkaa235
31. **Selick HE, Beresford AP, Tarbit MH. 2002.** The emerging importance of predictive ADME simulation in drug discovery. *Drug Discov Today* 7: 109-116. doi: 10.1016/S1359-6446(01)02100-6
32. **Sun Y, Song M, Niu L, Bai X, Sun N, Zhao X, Jiang J, He J, Li H. 2013.** Antiviral effects of the constituents derived from Chinese herb medicines on infectious bursal disease virus. *Pharm Biol* 51: 1137-1143. doi: 10.3109/13880-209.2013.781197
33. **Toskano Hurtado JS. 2016.** Caracterización genómica y epidemiología molecular del virus de la bursitis infecciosa en España. Tesis Doctoral. España: Universitat Autònoma de Barcelona. 164 p.
34. **Trott O, Olson AJ. 2010.** AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 31: 455-461. doi: 10.1002/jcc.21334
35. **Volkamer A, Kuhn D, Grombacher T, Rippmann F, Rarey M. 2012.** Combining global and local measures for structure-based druggability predictions. *J Chem Inf Model* 52: 360-372. doi: 10.1021/ci200454v
36. **Wu T, Wang Y, Li H, Fan L, Jiang N, Gao L, Li K, Gao Y, et al. 2020.** Naturally occurring homologous recombination between novel variant infectious bursal disease virus and intermediate vaccine strain. *Vet Microbiol* 245: 108700. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.-108700
37. **Zhao H, Caflisch A. 2013.** Discovery of ZAP70 inhibitors by high-throughput docking into a conformation of its kinase domain generated by molecular dynamics. *Bioorg Med Chem Lett* 23: 5721-5726. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.-08.009