



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE HÁBITAT, INFRAESTRUCTURA Y CREATIVIDAD**

**TÍTULO DE MÁSTER EN BIOLOGÍA COMPUTACIONAL**

**Análisis de genes asociados a la resistencia antiviral en el virus Mpox.**

Trabajo de Titulación

**Autor:** Ing. Jhoan Sebastián Rivera Orellana

**Directora:** Phd. Doris Vela Peralta

QUITO – ECUADOR

2025

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, por ser el pilar que ha sostenido cada uno de mis pasos. De manera muy especial a mi padre, por creer siempre en mí, incluso en los momentos en los que yo dudaba, y por enseñarme con su ejemplo el valor de la perseverancia y la honestidad.

A mi compañera de vida, Pierina Carvajal, por su apoyo incondicional, su paciencia y por recordarme constantemente la importancia de seguir adelante con firmeza y esperanza.

A mi tutora de tesis, PhD. Doris Vela Peralta, por su increíble acompañamiento, su guía académica y su dedicación, que fueron fundamentales para la culminación de este trabajo.

Y a mi mentor, PhD. Andrés López, por su valiosa orientación, apoyo y compañía en este camino, cuya generosidad y enseñanzas han dejado una huella imborrable en mi formación.

A todos ustedes, mi gratitud eterna.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>Resumen.....</b>	<b>6</b>
Palabras clave: Resistencia antiviral, Tecovirimat, Cidofovir difosfato, Mutaciones en genes virales, Mpox.....	7
<b>Justificación.....</b>	<b>7</b>
<b>Planteamiento del problema.....</b>	<b>8</b>
Contextualización del tema u objeto.....	10
<b>Objetivos.....</b>	<b>11</b>
Objetivo General.....	11
Objetivos Específicos.....	11
<b>Marco teórico y conceptual.....</b>	<b>11</b>
<b>Antecedentes.....</b>	<b>11</b>
<b>Marco Teórico.....</b>	<b>12</b>
<b>Metodología y Técnicas.....</b>	<b>13</b>
Identificación de variantes.....	14
Obtención de datos.....	15
Alineamiento múltiple y generación de secuencias consenso.....	16
Anotación estructural.....	17
Modelamiento 3D de proteínas.....	17
Refinamiento estructural.....	18
Validación estructural.....	18
Protonación y Minimización de Energías.....	18
Docking Molecular.....	19
<b>Resultados Identificación de Variantes y Obtención de Datos.....</b>	<b>20</b>
Alineamiento Múltiple y Obtención de Genomas Consenso.....	21
Anotación de genomas consenso y selección de proteínas.....	21
Modelamiento 3D de Proteínas y Ensamblaje de Complejos y Homodimeros.....	22
Refinamiento estructural.....	22
Validación estructural.....	23
Protonación y Minimización de Energías.....	24
Docking Molecular.....	25
<b>Discusión.....</b>	<b>26</b>
<b>Tablas suplementarias.....</b>	<b>48</b>

## ÍNDICE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama de flujo del pipeline computacional para el modelado estructural, refinamiento y evaluación de antivirales frente a complejos y homodímeros del virus Mpox.....	15
<b>Figura 2.</b> Distribución geográfica y temporal de variantes identificadas en América durante 2024–2025. (A) Mapa de América con diagramas circulares que muestran la proporción de variantes detectadas en Norteamérica y Sudamérica. (B) Diagrama de puntos que indica la presencia de cada linaje en ambas regiones a lo largo del tiempo.....	21
<b>Figura 4.</b> Acoplamiento molecular del antiviral. (A) Complejo F8L-DNA-CDFpp (B) Detalle del sitio de unión en F8L con (C) Homodímero de F13. (D) Detalle del sitio de unión en el homodímero con el antiviral en rojo, residuos hidrofóbicos en salmón y residuos en contacto en sticks.....	26
<b>Figura Suplementaria 1.</b> Acoplamiento molecular del antiviral TVM con las variantes de los homodímeros analizados, mostrando las poses de unión y los residuos involucrados en cada interacción (Parte 1). Los aminoácidos hidrofóbicos se representan en color salmón, el antiviral en color rojo, y los residuos en interacción se muestran en formato de bastones dentro del sitio de unión.....	45
<b>Figura Suplementaria 2.</b> Acoplamiento molecular del antiviral TVM con las variantes de los homodímeros analizados, mostrando las poses de unión y los residuos involucrados en cada interacción (Parte 2). Los aminoácidos hidrofóbicos se representan en color salmón, el antiviral en color rojo, y los residuos en interacción se muestran en formato de bastones dentro del sitio de unión.....	46
<b>Figura Suplementaria 3.</b> Acoplamiento molecular del antiviral de CDFpp con las variantes de los complejos analizados (Parte 1), mostrando las poses de unión y los residuos que participan en las interacciones. Los residuos hidrofóbicos se muestran en violeta, el antiviral en azul, el ion $Mg^{2+}$ en celeste y el ADN en negro.....	47
<b>Figura Suplementaria 4.</b> Acoplamiento molecular del antiviral de CDFpp con las variantes de los complejos analizados (Parte 2), mostrando las poses de unión y los residuos que participan en las interacciones. Los residuos hidrofóbicos se muestran en violeta, el antiviral en azul, el ion $Mg^{2+}$ en celeste y el ADN en negro.....	48

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clados y linajes de Mpox identificados en Norteamérica y Sudamérica durante 2024–2025, con el número total de genomas y el identificador correspondiente del EPI_SET....	16
<b>Tabla Suplementaria 1.</b> Valores individuales de Ranking_score, Ptm, Disordered y Clashes para cada variante de las proteínas F13 y F8L predichas por AlphaFold.....	49
<b>Tabla Suplementaria 2.</b> Resultados del análisis del diagrama de Ramachandran para las estructuras modeladas, indicando el porcentaje de residuos en regiones más favorecidas, adicionalmente permitidas, generosamente permitidas y no permitidas (outliers).....	50
<b>Tabla Suplementaria 3.</b> Energía de unión (kcal/mol) y residuos involucrados en el acoplamiento del antiviral con cada variante.....	52

## **Resumen**

El *Monkeypox virus* (Mpox) ha resurgido como una amenaza significativa para la salud pública global, especialmente tras el brote multinacional de 2022, que evidenció su capacidad de propagación en poblaciones previamente no expuestas. Uno de los principales desafíos en el manejo clínico de esta infección es la aparición de resistencia antiviral, particularmente frente a Tecovirimat (TVM) y Cidofovir difosfato (CDFpp), forma activa de Brincidofovir (BCF) y Cidofovir (CDF).

Diversos estudios recientes han identificado mutaciones en genes clave como F13L (OPG057), que codifica una proteína de membrana palmitoilada del virión envuelto extracelular (EEV), indispensable para el envolvimiento y el egreso viral, además de ser la principal diana del antiviral tecovirimat. En el caso del complejo de la ADN polimerasa, conformado por las proteínas F8L (OPG071), A22R (OPG148) y E4R (OPG116), se debe señalar que, aunque A22R y E4R cumplen funciones complementarias como factor de procesividad y uracil DNA glicosilasa respectivamente, es F8L, la subunidad catalítica de la polimerasa, la que ha demostrado interacciones directas con compuestos antivirales, de forma análoga a F13, constituyéndose en un blanco terapéutico clave para el desarrollo de inhibidores de la replicación del Mpox. Dichas mutaciones podrían comprometer la eficacia de los antivirales disponibles, limitando las opciones terapéuticas y favoreciendo la aparición y circulación de variantes resistentes.

La escasa información disponible sobre los mecanismos moleculares que subyacen a esta resistencia dificulta el desarrollo de estrategias eficaces de vigilancia y control. En este contexto, el presente proyecto tiene como objetivo identificar y caracterizar genes relacionados con resistencia antiviral en variantes recientes del Mpox circulantes en América desde 2024 hasta la actualidad. Para ello, se integraron herramientas de bioinformática, análisis genómico y modelado estructural, priorizando variantes clínicamente relevantes.

El estudio se apoyó en bases de datos públicas como GISAID, ChEMBL y Protein Data Bank (PDB), y empleó herramientas reconocidas para la anotación funcional, predicción estructural y evaluación de interacciones proteína-ligando. A partir de ello, se generaron modelos

moleculares que permitieron analizar la afinidad de unión de los antivirales con sus respectivas dianas virales, considerando el efecto de mutaciones emergentes.

La hipótesis de trabajo plantea que ciertas mutaciones en F13L y la proteína F8L del subcomplejo F8L/A22R/E4R alteran la interacción con antivirales como TVM y CDF difosfato, disminuyendo su efectividad terapéutica. Se espera que los resultados del estudio permitan validar esta hipótesis y contribuyan a comprender los mecanismos de resistencia en el Mpox. Por ende, este proyecto es de alta relevancia en el escenario actual, ya que puede fortalecer la vigilancia genómica, orientar la toma de decisiones clínicas y respaldar el diseño de nuevos antivirales. En última instancia, busca aportar evidencia científica sólida para enfrentar de forma más eficaz los desafíos que plantea la evolución de este virus.

**Palabras clave:** Resistencia antiviral, Tecovirimat, Cidofovir difosfato, Mutaciones en genes virales, Mpox.

### **Justificación**

El presente trabajo, enfocado en el análisis genómico y estructural del virus Mpox para identificar mutaciones asociadas a la resistencia antiviral, se fundamenta en la necesidad urgente de comprender y anticipar los mecanismos moleculares que subyacen a la resistencia en un patógeno con un genoma de ADN bicatenario lineal de aproximadamente 197 kb, que codifica más de 190 genes, incluyendo proteínas clave implicadas en la replicación, ensamblaje y evasión inmune, como F13L (proteína de membrana palmitoilada de EEV, diana de tecovirimat), F8L (ADN polimerasa, diana de cidofovir difosfato), A22R (factor de procesividad de ADN polimerasa) y E4R (uracil-DNA glicosilasa) (Huang et al., 2022; *Viruela simica, un reto para la salud pública mundial*, n.d.). Desde mayo de 2022, se han reportado casos de Mpox en múltiples países no endémicos, evidenciando una propagación sin precedentes y subrayando la importancia de desarrollar estrategias terapéuticas y de vigilancia efectivas que permitan anticipar la aparición y dispersión de cepas potencialmente resistentes (Isidro et al., 2022).

En particular, la región de América ha sido una de las más afectadas por la diseminación del Mpox durante y después del brote de 2022, con cientos de casos reportados en países como Estados Unidos, Brasil, México, Colombia, Perú y Ecuador (Díaz-Brochero & Cucunubá, 2024;

Ramírez-Soto, 2023). Esta realidad epidemiológica justifica un enfoque regionalizado en el estudio de variantes virales recientes, dado que la dinámica evolutiva del virus podría diferir entre continentes debido a presiones selectivas distintas, patrones de transmisión y disponibilidad desigual de tratamientos antivirales (Díaz-Brochero & Cucunubá, 2024; Guan et al., 2023).

El antiviral TVM ha sido ampliamente utilizado en Estados Unidos como tratamiento de primera línea desde el inicio del brote global. Sin embargo, mutaciones en la proteína F13 (diana de este fármaco) han demostrado conferir resistencia, lo que resalta la importancia de monitorear y caracterizar genéticamente estas variantes para adaptar las intervenciones terapéuticas de manera oportuna y localizada (Garrigues et al., 2023).

Asimismo, estudios recientes han identificado una nueva subvariante del clado I del Mpox, denominada clado Ib, que ha emergido en la República Democrática del Congo y se ha propagado rápidamente a otros países africanos. Esta subvariante contiene mutaciones que podrían aumentar su adaptación al hospedero humano, planteando nuevos desafíos para el control de la enfermedad y evidenciando la necesidad de estudios que aborden tanto la evolución genética del virus como su impacto sobre la eficacia de los tratamientos existentes (Schwartz & Pittman, 2023).

En este contexto, la identificación y caracterización de mutaciones asociadas a la resistencia antiviral no solo es fundamental para el desarrollo de terapias más eficaces, sino también para fortalecer los sistemas de vigilancia genómica y prevenir la diseminación de cepas resistentes en la región americana. La integración de análisis genómicos y estructurales en esta investigación permitirá una comprensión más profunda de los mecanismos de resistencia, facilitando la adaptación de políticas de salud pública y estrategias terapéuticas frente a un patógeno en constante evolución.

### **Planteamiento del problema**

El virus Mpox, causante de la viruela del mono, se consolidó como una amenaza significativa para la salud pública global tras el brote multinacional de 2022, que registró más de 87.000 casos en más de 110 países previamente no endémicos (Thornhill et al., 2022). Durante

este brote, el antiviral Tecovirimat (TVM) fue empleado extensamente bajo protocolos de acceso expandido en Estados Unidos y Europa, siendo considerado el tratamiento de primera línea frente a orthopoxvirus por su perfil de seguridad favorable (Adler et al., 2022; O’Laughlin et al., 2022).

Sin embargo, se ha documentado la aparición de mutaciones en el gen F13L, que codifica la proteína blanco de TVM, capaces de reducir la eficacia del fármaco. Dichas mutaciones se han reportado particularmente en pacientes inmunocomprometidos, incluidos aquellos con infección avanzada por VIH tratados durante periodos prolongados, en quienes se identificó heterogeneidad intra-paciente en las lesiones y evidencias de resistencia adquirida durante la terapia (Garrigues et al., 2023; Lee et al., 2024). Más aún, la detección de variantes resistentes en transmisión comunitaria sugiere un riesgo real de diseminación de cepas con escape antiviral, lo que subraya la necesidad de fortalecer la vigilancia genómica y fenotípica (“In the Literature,” 2023; Smith et al., 2023).

Si bien F13L constituye la diana primaria de TVM, resulta igualmente crítico considerar otros genes virales involucrados en la replicación del genoma. Entre ellos, la proteína F8L, subunidad catalítica de la ADN polimerasa y parte del subcomplejo con A22R y E4R, es el blanco molecular de los análogos nucleotídicos Cidofovir (CDF) y Brincidofovir (BCF). Ambos profármacos requieren fosforilación intracelular para convertirse en Cidofovir difosfato (CDFpp), la forma activa que inhibe la síntesis de ADN viral al competir con los nucleótidos naturales (Florescu & Keck, 2014; Lanier et al., 2010). Mutaciones en F8L podrían comprometer la unión de CDFpp al sitio catalítico de la polimerasa, reduciendo su eficacia y favoreciendo la emergencia de variantes resistentes.

En este contexto, la identificación y caracterización estructural de mutaciones en F13L y F8L asociadas con resistencia antiviral es fundamental para comprender los mecanismos moleculares de escape, orientar el diseño de nuevas estrategias terapéuticas y reforzar las políticas de salud pública dirigidas al control de cepas resistentes de Mpxv en escenarios de transmisión sostenida.

## **Contextualización del tema u objeto**

El Mpox, un ortopoxvirus zoonótico, ha sido históricamente considerado endémico en regiones de África Central y Occidental, donde los brotes esporádicos estaban principalmente vinculados a la transmisión zoonótica a partir de animales silvestres, como roedores y primates (McCollum & Damon, 2014). No obstante, el brote multinacional de 2022 marcó un punto de inflexión, ya que el virus logró expandirse a múltiples países no endémicos, afectando a poblaciones previamente no expuestas y desencadenando una crisis sanitaria global (Guan et al., 2023; Isidro et al., 2022). La transmisión de persona a persona, que históricamente había sido poco común, se ha convertido en un factor importante en la dinámica de propagación actual, lo que subraya la necesidad de un monitoreo más detallado y la implementación de estrategias de contención más efectivas.

En términos moleculares, el Mpox posee un genoma de ADN lineal de doble cadena con aproximadamente 197 kilobases, que codifica proteínas involucradas en procesos esenciales como la replicación, la evasión inmune y la patogenicidad (Likos et al., 2005). De particular interés es los genes F13L y OPG071, responsables de codificar una proteína esencial para la formación de la envoltura viral (F13L) y la proteína de la subunidad catalítica de la ADN polimerasa viral (F8L) los cuales son objetivos primarios de antivirales como TVM, CDF y BCF (Garrigues et al., 2023; Siegrist & Sassine, 2023). Recientes estudios han evidenciado mutaciones en este gen, las cuales podrían reducir la eficacia de los antivirales, favoreciendo la aparición de cepas resistentes (Garrigues et al., 2023).

El contexto global actual exige un enfoque integral que permita monitorear, caracterizar y predecir la evolución genética del Mpox, especialmente en lo que respecta a la aparición de mutaciones asociadas a la resistencia antiviral. Si bien existen terapias aprobadas, como TVM, BCF y CDF, la presión selectiva generada por su uso podría dar lugar a variantes del virus menos susceptibles a estos tratamientos (Thornhill et al., 2022). Este escenario plantea desafíos significativos en términos de salud pública, dado que las mutaciones en regiones clave del genoma viral no solo podrían comprometer la eficacia terapéutica, sino también influir en la virulencia y la transmisibilidad del virus (Thornhill et al., 2022).

La integración de herramientas bioinformáticas, como el modelado estructural tridimensional y las simulaciones de docking molecular, se presenta como una solución prometedora para anticipar la aparición de mutaciones críticas y evaluar su impacto en la interacción proteína-antiviral (Ali et al., 2023; Xu et al., 2024). Así, la presente investigación busca no solo identificar y caracterizar las mutaciones responsables de la resistencia antiviral, sino también ofrecer información valiosa que permita mejorar las estrategias de vigilancia y control del Mpxv a nivel global, aportando evidencia científica robusta para el desarrollo de nuevas terapias y la optimización de las existentes.

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

Analizar el impacto de mutaciones en el genoma del Mpxv virus sobre la resistencia a los antivirales TVM, BCF y CDF mediante enfoques bioinformáticos, modelado molecular y docking.

### **Objetivos Específicos**

- Seleccionar los linajes y sublinajes distribuidos en el continente americano para la evaluación de su diversidad genética
- Generar secuencias consenso para establecer referencias representativas y de alta calidad que sirvan como base para los análisis genómicos y estructurales.
- Identificar proteínas virales clave involucradas en la acción de los antivirales para la identificación de las dianas antivirales.
- Evaluar la interacción proteína-antiviral mediante docking molecular en presencia y ausencia de mutaciones

## **Marco teórico y conceptual**

### **Antecedentes**

El contexto general de esta investigación se enmarca en la emergencia global del Mpxv, un virus que ha trascendido su condición endémica en África Central y Occidental para desencadenar brotes internacionales sin precedentes en 2022, evidenciando su capacidad de propagación en poblaciones no inmunizadas y planteando importantes desafíos para la salud

pública (Huang et al., 2022; Thornhill et al., 2022). Diversos estudios han abordado la caracterización genómica y la evolución molecular del Mpox, revelando una notable heterogeneidad en las cepas aisladas y la aparición de nuevos sublinajes, lo que sugiere una rápida microevolución impulsada por presiones ambientales y terapéuticas (Huang et al., 2022; Isidro et al., 2022).

La relevancia del gen F13L, que codifica una proteína esencial para la formación de la envoltura viral y constituye el blanco de TVM, ha sido destacada en investigaciones recientes que demuestran cómo mutaciones en este gen pueden reducir la eficacia del antiviral y favorecer la resistencia (Garrigues et al., 2023; Vernuccio et al., 2025).

Además, estudios clínicos y retrospectivos realizados en países no endémicos han aportado información valiosa sobre las características clínicas, la transmisión y la respuesta terapéutica, reforzando la necesidad de enfoques integrados que combinen análisis genómicos, bioinformáticos y estructurales para comprender de manera integral la patogenia del Mpox (Ceña-Diez et al., 2022; Huang et al., 2022; Isidro et al., 2022).

Sin embargo, a pesar de estos avances, persisten brechas en la correlación entre los cambios genéticos detectados y la manifestación clínica de la resistencia antiviral, lo que subraya la importancia de continuar con investigaciones multidisciplinarias que permitan desarrollar estrategias terapéuticas más efectivas y fortalecer la vigilancia epidemiológica en tiempo real.

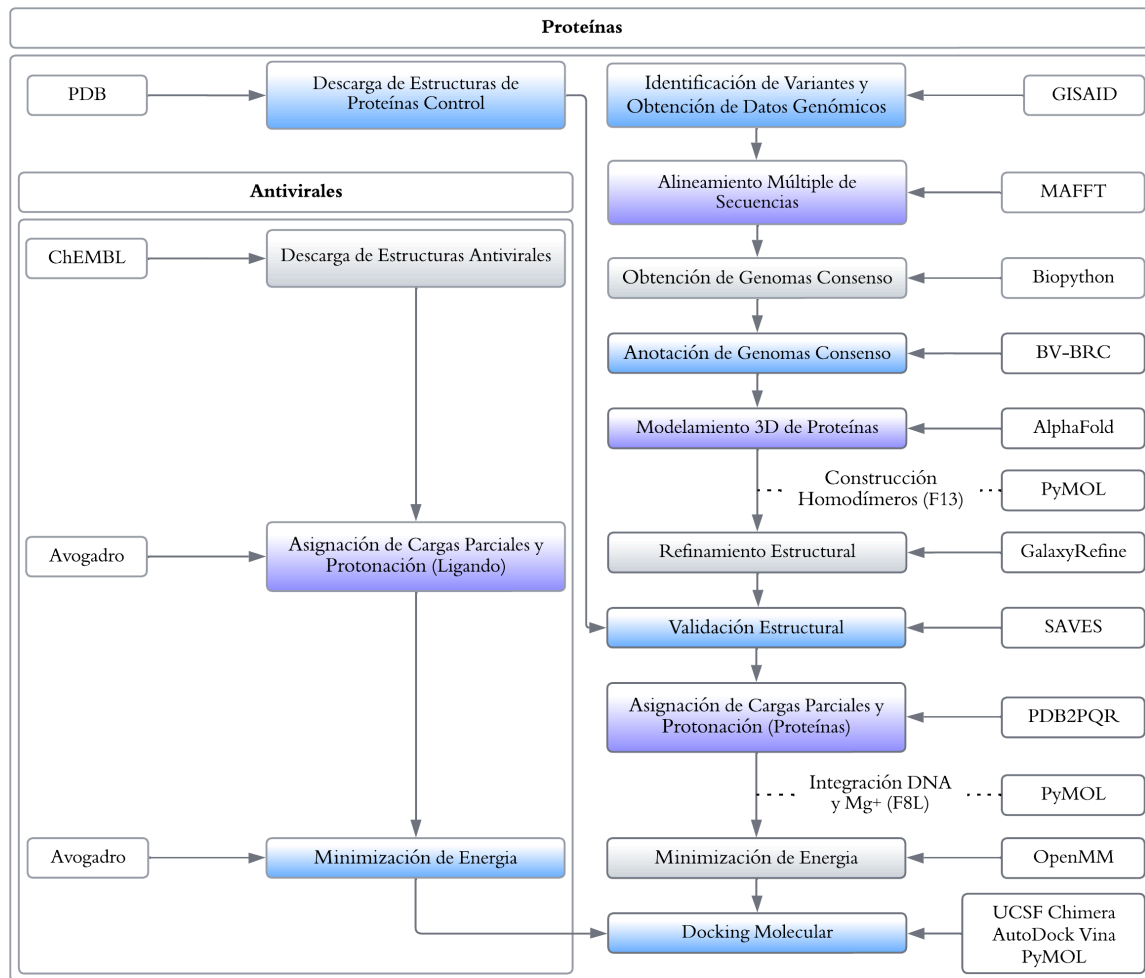
### **Marco Teórico**

El Mpox es un ortopoxvirus de creciente relevancia en la salud pública global, cuya historia se remonta a su descubrimiento en 1958 y al primer caso humano documentado en 1970 (Ladnyj et al., 1972), aunque hasta el brote multinacional de 2022 se consideraba mayormente endémico en regiones de África Central y Occidental, donde la transmisión se asociaba principalmente al contacto con roedores y primates (McCollum & Damon, 2014); en este nuevo escenario epidemiológico, estudios recientes han evidenciado una heterogeneidad genética significativa en las cepas aisladas, identificando nuevos sublinajes y mutaciones en genes críticos como el F13L, que codifica una proteína esencial para la formación de la envoltura viral y constituye la diana terapéutica de TVM (Isidro et al., 2022; Vernuccio et al., 2024); antiviral que,

pese a su eficacia demostrada, enfrenta el riesgo de resistencia inducida por mutaciones que alteran su afinidad de unión (Garrigues et al., 2023); paralelamente, el avance en herramientas de bioinformática, técnicas de secuenciación de próxima generación y modelado estructural mediante docking molecular ha permitido simular, a nivel atómico, las interacciones entre TVM y la proteína F13, proporcionando nuevas perspectivas sobre los mecanismos moleculares que subyacen a la resistencia antiviral (Guo et al., 2021; Vernuccio et al., 2024); sin embargo, persisten brechas significativas en la comprensión integral de la correlación entre los cambios genéticos en el gen F13L y su manifestación fenotípica en términos de resistencia clínica, así como en la integración holística de datos genómicos, estructurales y clínicos y en la implementación de sistemas de vigilancia en tiempo real para monitorear la evolución del virus (Ceña-Diez et al., 2022; Thornhill et al., 2022); por ello, la presente investigación se propone abordar estas carencias mediante un enfoque multidisciplinario que combine secuenciación avanzada, análisis bioinformático y modelado molecular, con el fin de identificar y caracterizar de forma integral las mutaciones críticas asociadas a la resistencia a antivirales en el Mpox, aportando así una base científica sólida que contribuya a optimizar las estrategias terapéuticas y a fortalecer las políticas de salud pública frente a esta amenaza emergente.

### **Metodología y Técnicas**

El presente estudio empleó un enfoque bioinformático y estructural para analizar genes asociados a la resistencia antiviral en el virus Mpox, integrando técnicas de filtrado y curación de datos genómicos, anotación funcional, modelado estructural y simulaciones de interacción molecular como lo podemos observar en el diagrama de flujo de la Figura 1 donde observamos el nombre de los procesos en colores de gradientes y las herramientas utilizadas en escala de grises.



**Figura 1.** Diagrama de flujo del pipeline computacional para el modelado estructural, refinamiento y evaluación de antivirales frente a complejos y homodímeros del virus Mpxo.

### Identificación de variantes

En primera instancia, se identificaron las variantes circulantes del virus Mpxo en América durante el periodo comprendido entre el año 2024 y la fecha actual, utilizando la herramienta EpiCharts v1.01 y el árbol de filodinámica para clados I y II, ambas disponibles en la base de datos GISAID (<https://gisaid.org/>). Estas herramientas permitieron visualizar de forma integrada la dinámica temporal y geográfica de las variantes, lo que facilitó la identificación precisa de aquellas actualmente vigentes en el continente (Khare et al., 2021). El periodo de análisis se delimitó a partir de 2024 con el fin de focalizar el estudio en cepas recientes, cuya

aparición podría estar asociada a cambios epidemiológicos y genéticos relevantes, incluyendo la posible emergencia de mutaciones vinculadas a resistencia antiviral, aspectos críticos para la vigilancia y el desarrollo de estrategias terapéuticas actualizadas.

### **Obtención de datos**

A continuación, se descargaron 848 secuencias genómicas completas en formato FASTA desde GISAID del virus Mpox, seleccionando una por cada variante de interés previamente identificadas durante el periodo comprendido entre enero de 2024 y agosto de 2025. Se aplicaron criterios de control de calidad, excluyendo aquellas secuencias que contenían más del 25% de bases ambiguas (Ns) o que presentaban una longitud inferior a 196.000 pares de bases. Una vez identificadas esas secuencias se generó el EPI\_SET correspondiente de cada uno de los genomas de cada variante como podemos observar en la Tabla 1. Adicionalmente, se identificaron modelos estructurales depositados en la base de datos Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>), correspondientes al subcomplejo de la polimerasa F8L/E4R/A22R (ID: 8J8G), resuelto mediante microscopía electrónica criogénica (cryo-EM) con una resolución de 2.79 Å, en estado de partícula y reconstruido por el método de single particle, ligado con Cidofovir difosfato (CDFpp) y ADN (holo). Asimismo, se utilizó el modelo del homodímero de F13 (ID: 9FHK), obtenido por difracción de rayos X con una resolución de 2.10 Å, con valores de R-Value Work de 0.218 y R-Value Free de 0.249, lo que respalda la confiabilidad del modelo cristalográfico. Ambas estructuras fueron empleadas como estructuras de referencia para el presente estudio (Berman et al., 2000; Vernuccio et al., 2025; Xu et al., 2023).

También, se descargaron las estructuras antivirales para el estudio: TVM (ChEMBL1257073) y CDFpp (ChEMBL4594372), este último considerado como la forma activa común de los antivirales BCF y CDF. Ambas moléculas fueron obtenidas desde la base de datos ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>), un recurso especializado en información química y bioactiva asociada a compuestos con actividad farmacológica (Mendez et al., 2019).

**Tabla 1.** Clados y linajes de Mpx identificados en Norteamérica y Sudamérica durante 2024–2025, con el número total de genomas y el identificador correspondiente del EPI\_SET.

N°	Clado	Linaje	Total	EPI_SET ID
1	Ib	N/A	10	EPI_SET_250805ax
2	IIb	A.2.2	6	EPI_SET_250805wf
3	IIb	B.1.20	20	EPI_SET_250805ru
4	IIb	B.1.21	12	EPI_SET_250805cg
5	IIb	B.1.22	35	EPI_SET_250805ou
6	IIb	B.1.23	2	EPI_SET_250805fz
7	IIb	C.1	5	EPI_SET_250805hq
8	IIb	D.1	23	EPI_SET_250805ua
9	IIb	E.1	5	EPI_SET_250805xk
10	IIb	E.2	15	EPI_SET_250805hz
11	IIb	E.3	215	EPI_SET_250805pk
12	IIb	F.1	211	EPI_SET_250805eg
13	IIb	F.2	217	EPI_SET_250805pd, EPI_SET_250805nv
14	IIb	F.4	48	EPI_SET_250805vx
15	IIb	F.5	3	EPI_SET_250805ub
16	IIb	F.6	21	EPI_SET_250805vg

### Alineamiento múltiple y generación de secuencias consenso

Las secuencias del virus Mpx que fueron seleccionadas se alinearon mediante la herramienta MAFFT v7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>), reconocida por su eficiencia y precisión en alineamientos múltiples de secuencias (Kato et al., 2019). Posteriormente, se generaron secuencias consenso utilizando la librería AlignIO del paquete Biopython (<https://biopython.org/>), la cual permitió procesar y manipular de forma eficiente los archivos resultantes, calculando el nucleótido más frecuente en cada posición para obtener la secuencia consenso representativa (Cock et al., 2009).

### **Anotación estructural**

Una vez obtenidas las secuencias consenso, las mismas fueron sometidas a un proceso de anotación estructural con la herramienta VIGOR4, integrada en el portal del Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC v3.53.3) (<https://www.bv-brc.org/>), diseñada específicamente para la predicción de regiones codificantes en genomas virales. Para realizar esta anotación, se empleó como referencia el identificador taxonómico (taxid) 10244 del *Monkeypox virus* en la base de datos de taxonomía del NCBI, lo que garantizó la correcta asignación de genes y marcos de lectura abiertos en las secuencias analizadas (Olson et al., 2023).

### **Modelamiento 3D de proteínas**

Para la caracterización estructural de las proteínas diana F13 y F8L se generaron modelos tridimensionales de cada polímero utilizando el servidor AlphaFold v3 (<https://alphafoldserver.com/>), el cual es ampliamente reconocido por su alta precisión en la predicción de estructuras proteicas basada en inteligencia artificial (Abramson et al., 2024). Posteriormente, los homodímeros de F13 se construyeron mediante modelado por superposición estructural en PyMOL v3.1.5.1 (<https://www.pymol.org>). En este procedimiento, las estructuras individuales de cada proteína predicha se alinearon sobre las cadenas correspondientes a la estructura de referencia, empleando la geometría y orientación de los modelos experimentales plantilla estructural. Para el complejo F8L/ADN se utilizó como plantilla la estructura 8J8G, mientras que para los homodímeros de F13 se empleó el modelo 9FHK. Es importante recalcar que la incorporación del ADN en F8L se llevará a cabo en pasos posteriores a la protonación como se visualiza en la Figura 1, ya que procesos como el refinamiento estructural y protonación únicamente aceptan proteínas aisladas y no complejos proteína-ADN, lo cual garantiza la correcta disposición espacial de sus polímeros en fases posteriores del análisis. (Schrodinger, 2021).

## **Refinamiento estructural**

Con las proteínas modeladas anteriormente, se procedió al refinamiento estructural de la proteína F8L y de los homodímeros de la proteína F13 mediante la herramienta GalaxyRefine, disponible en el servidor GalaxyWEB (<https://galaxy.seoklab.org>). Este procedimiento aplica relajación estereoquímica y minimización de energía mediante dinámicas moleculares para optimizar la geometría local y global de los modelos, reducir choques atómicos y mejorar la conformación de las cadenas laterales. Posteriormente, para cada estructura refinada se calcularon indicadores de calidad como GDT-HA, RMSD, MolProbity score, Clashscore, porcentaje de rotámeros pobres y residuos favorecidos en el diagrama de Ramachandran, lo que permitió seleccionar el modelo con el mejor balance entre precisión estructural y estabilidad conformacional (Heo et al., 2013).

## **Validación estructural**

Una vez concluido el refinamiento, se procedió a su validación estructural utilizando SAVES v6.0 (*Structural Analysis and Verification Server*) (<https://saves.mbi.ucla.edu>), el cual integra diversas herramientas de verificación de calidad de modelos proteicos. En particular, se empleó el módulo PROCHECK, que generó los diagramas de Ramachandran para evaluar la distribución de los ángulos dihedrales  $\phi$  (phi) y  $\psi$  (psi) de los residuos de aminoácidos, permitiendo así comprobar la calidad estereoquímica y la conformación general de las proteínas modeladas (Laskowski et al., 1996).

## **Protonación y Minimización de Energías**

Una vez validadas las proteínas, estas fueron procesadas mediante la herramienta PDB2PQR (<https://server.poissonboltzmann.org/pdb2pqr>), que permitió asignar cargas parciales y protonar los residuos de acuerdo con un pH fisiológico de 7.4, valor representativo del rango estándar del flujo sanguíneo humano (7.35–7.45). Este paso constituye una etapa crítica para garantizar condiciones realistas en los estudios posteriores de acoplamiento molecular (Jurrus et al., 2018). Posteriormente, se efectuó una minimización rápida de energía

utilizando el software OpenMM v.8.3.1 (<https://openmm.org>), empleando el campo de fuerza AMBER14 en condiciones de vacío. Durante este procedimiento se aplicaron integradores de dinámica molecular y restricciones armónicas sobre el esqueleto principal (N, Ca y C) para preservar la conformación global, mientras se relajaban los átomos laterales y se reducían tensiones estéricas locales (Eastman et al., 2024).

A su vez, las estructuras moleculares de los antivirales TVM y CDFpp fueron cargadas inicialmente en el programa Avogadro v1.2.0 (<https://avogadro.cc/>), el cual permitió asignar el estado de protonación correspondiente a un pH de 7.4. Posteriormente, estas estructuras fueron optimizadas mediante un proceso de minimización de energía basado en el campo de fuerza MMFF94 (*Merck Molecular Force Field 94*), reconocido por su precisión en la modelación de compuestos orgánicos y farmacéuticos. Este procedimiento permitió obtener conformaciones tridimensionales estables y correctamente protonadas de cada antiviral, adecuadas para su uso en estudios posteriores de acoplamiento molecular (Hanwell et al., 2012).

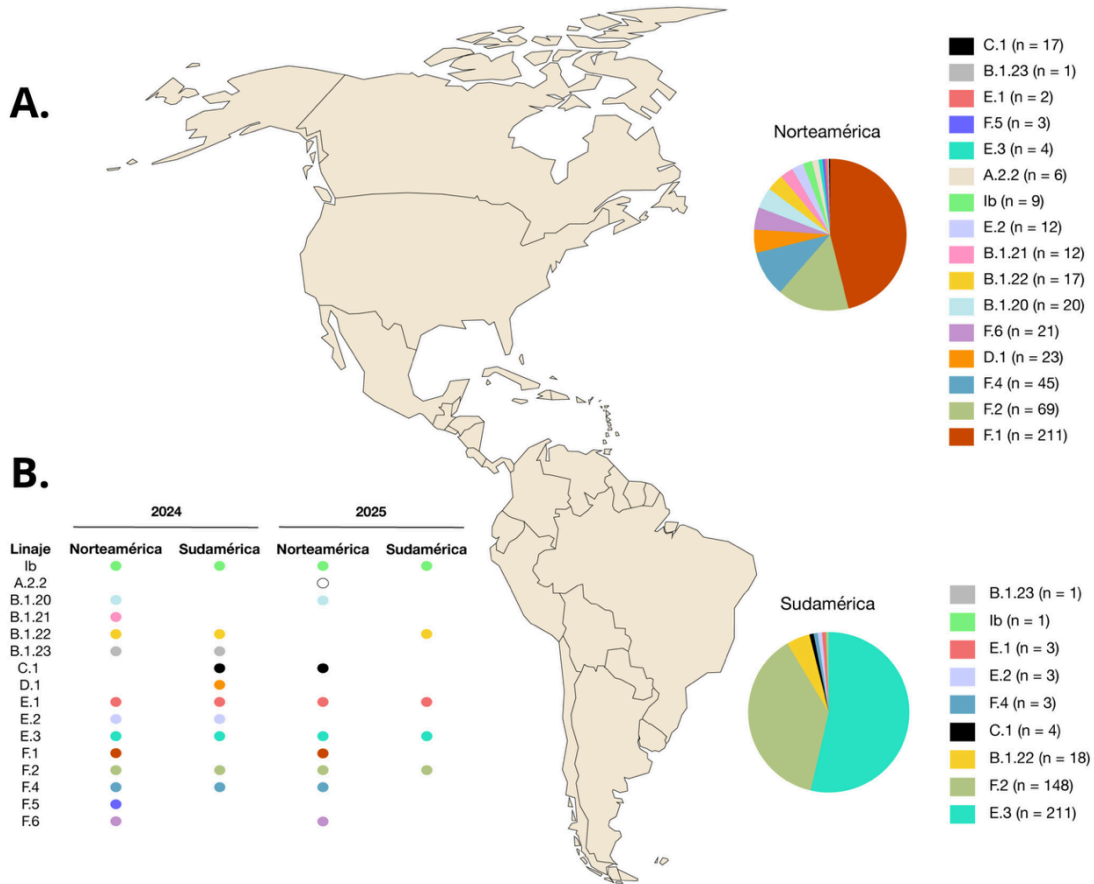
### **Docking Molecular**

Se realizaron estudios de acoplamiento molecular utilizando el motor AutoDock Vina v1.2.0 (<https://vina.scripps.edu/>) descargado como ejecutable desde su sitio oficial e integrado en UCSF Chimera v1.19, con el objetivo de evaluar la afinidad de unión entre los antivirales y las proteínas previamente modeladas (Trott & Olson, 2010). Este procedimiento, que emplea un enfoque de docking rígido con flexibilidad en el ligando, permitió predecir las posibles interacciones moleculares y analizar cómo las mutaciones podrían influir en la eficacia terapéutica.

Una vez obtenidos los resultados obtenidos del docking fueron analizados y visualizados en PyMOL v3.1.5.1, identificando los residuos del sitio activo e interacciones clave entre el ligando y la proteína. Se seleccionaron los residuos cercanos al ligando, se identificaron por su nombre y posición, y se representaron en formato sticks con codificación de colores diferenciada para el complejo y el ligando. Las interacciones caracterizadas incluyeron puentes de hidrógeno, contactos hidrofóbicos y puentes salinos entre residuos cargados opuestos. Esta estrategia de

análisis permitió una interpretación precisa de las interacciones moleculares relevantes para la afinidad de unión.

### Resultados Identificación de Variantes y Obtención de Datos



**Figura 2.** Distribución geográfica y temporal de variantes identificadas en América durante 2024–2025. (A) Mapa de América con diagramas circulares que muestran la proporción de variantes detectadas en Norteamérica y Sudamérica. (B) Diagrama de puntos que indica la presencia de cada linaje en ambas regiones a lo largo del tiempo.

A partir del análisis con la herramienta Epicharts y los árboles de filodinámica de GISAID se identificaron un total de 16 linajes circulantes en Norteamérica y Sudamérica durante los años 2024 y 2025 como observamos en la Figura 2. En la subfigura 2A, se muestra el mapa geográfico junto con diagramas circulares que representan la distribución relativa de cada linaje

en ambas regiones. En Norteamérica, el linaje F.1 presentó la mayor frecuencia ( $n = 211$ ), seguido de F.2 ( $n = 69$ ) y F.4 ( $n = 45$ ), mientras que en Sudamérica predominaron E.3 ( $n = 211$ ), F.2 ( $n = 148$ ) y B.1.22 ( $n = 18$ ). La subfigura 2B presenta la cronología de la detección de cada linaje en ambas regiones, diferenciando su presencia entre 2024 y 2025, lo que permite visualizar patrones de persistencia y la aparición de variantes nuevas en el periodo analizado. Posteriormente, en la descarga de los genomas correspondientes a cada linaje, se obtuvo un total de 456 genomas para Norteamérica y 392 para Sudamérica (Total 848).

### **Alineamiento Múltiple y Obtención de Genomas Consenso**

En el análisis de alineamiento múltiple se procesaron 848 genomas completos de Mpx, correspondientes a las variantes previamente identificadas con anterioridad. Cada conjunto de genomas perteneciente a una misma variante fue alineado de forma independiente, obteniéndose así un total de 16 alineamientos múltiples. A partir de cada alineamiento se generó su respectiva secuencia consenso, resultando en 16 genomas consenso que representan de forma precisa las características nucleotídicas predominantes de cada variante. Estas secuencias sirvieron como referencia individual para los análisis posteriores del estudio.

### **Anotación de genomas consenso y selección de proteínas**

La anotación estructural de los 16 genomas consenso mediante la herramienta VIGOR4 del BV-BRC permitió identificar un total de 180 genes en el conjunto de variantes analizadas. Para cada uno de estos genes se obtuvieron tanto las secuencias nucleotídicas como sus respectivas traducciones en aminoácidos. A partir de este repertorio génico se seleccionaron específicamente cuatro proteínas de interés: F13 (*Palmytilated EEV membrane protein*), F8L (*DNA polymerase (2)*), E4R (*Uracil DNA glycosylase superfamily*) y A22R (*DNA polymerase processivity factor*). Estos nombres corresponden a las denominaciones originales generadas por la anotación automática y se mantuvieron para asegurar la trazabilidad con la base de datos.

## **Modelamiento 3D de Proteínas y Ensamblaje de Complejos y Homodímeros**

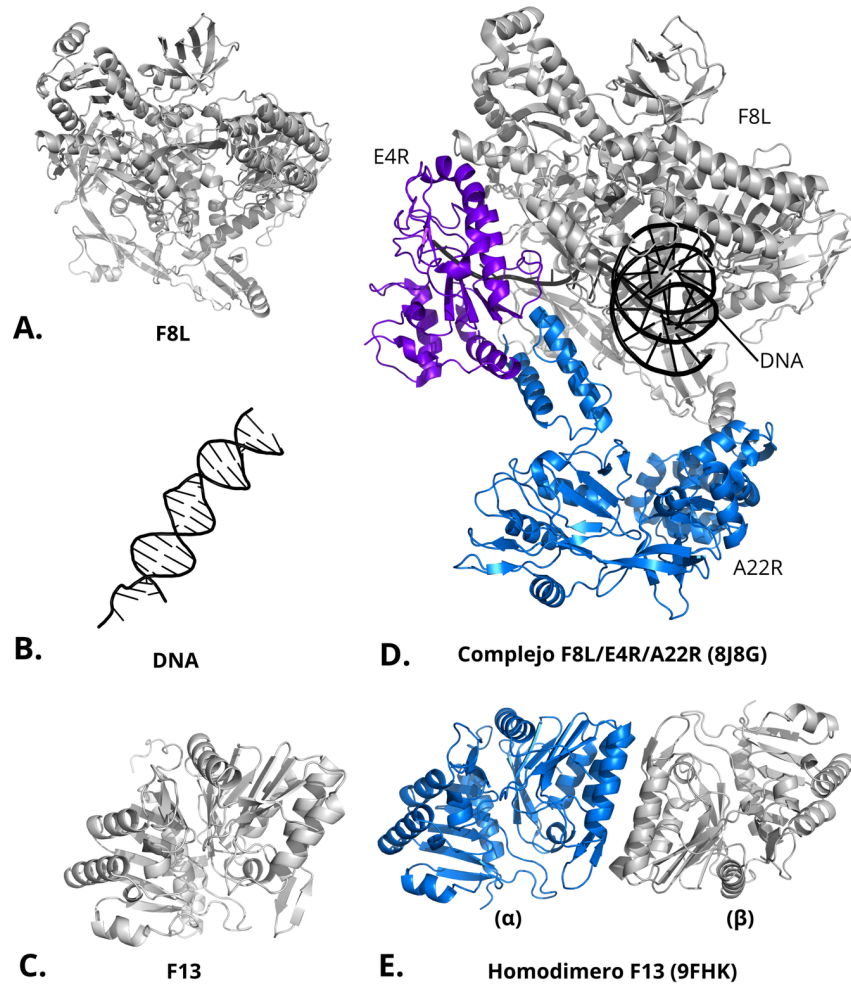
Una vez obtenidas las secuencias individuales de cada monómero a través del servidor AlphaFold, se evaluaron las métricas *Ranking\_score*, *Ptm*, *Disordered* y *Clashes* para cada proteína modelada. En la Figura 3A se muestra la proteína F8L, que presentó valores altos y consistentes de *Ranking\_score* y *Ptm* (0,91 a 0,92), con *Disordered* y *Clashes* en 0,0. La Figura 3B corresponde a E4R, con valores máximos de confianza (*Ranking\_score* y *Ptm* en 0,94) y ausencia total de regiones desordenadas o choques estéricos. En la Figura 3C, la proteína A22R presentó los valores más bajos de confianza relativa (0,75 a 0,76), aunque manteniendo *Disordered* y *Clashes* en 0,0, por lo que sigue siendo estructuralmente confiable. Finalmente, la Figura 3D muestra F13, con *Ranking\_score* y *Ptm* de 0,92 a 0,93, y sin regiones desordenadas ni choques estéricos. En general, todas las proteínas modeladas presentan métricas favorables para un uso confiable en análisis posteriores. Los valores exactos por monómero se detallan en la Tabla Suplementaria 1.

Luego, al aplicar el modelado por superposición estructural guiada, se obtuvieron valores de RMSD que evidencian una alta correspondencia entre los modelos y sus referencias. Las subunidades E4R,  $\alpha$  y  $\beta$  mostraron promedios particularmente bajos (0,897 Å, 0,377 Å y 0,380 Å respectivamente), mientras que F8L alcanzó 1,612 Å y A22R 2,628 Å, manteniéndose todos dentro de rangos aceptables para similitud estructural. La Figura 3E ilustra uno de los ensamblajes completos con ADN tras la superposición guiada, mientras que la Figura 3F muestra el homodímero de F13 alineado con el mismo enfoque, resaltando la coherencia estructural alcanzada en ambos casos.

### **Refinamiento estructural**

Tras el refinamiento con GalaxyRefine, las métricas evidenciaron mejoras notables en la calidad estructural. Los valores de GDT-HA se ubicaron en el rango de 0.991 a 0.994, mientras que el RMSD presentó valores entre 0.250 y 0.272 Å, lo que confirma una alta fidelidad respecto a las estructuras iniciales. Los puntajes de MolProbity oscilaron entre 1.525 y 1.579, y los valores de Clashscore se mantuvieron entre 10.1 y 11.6, evidenciando una reducción significativa de choques estéricos. En cuanto a la calidad conformacional, el porcentaje de rotámeros pobres

fue mínimo, con valores de 0.1 a 0.4 %, mientras que los residuos en regiones favorecidas del diagrama de Ramachandran alcanzaron entre 99.0 y 99.5 %. Estos resultados confirman que los modelos seleccionados presentan una geometría optimizada y una mayor estabilidad conformacional, características esenciales para garantizar la confiabilidad de los análisis de acoplamiento molecular desarrollados en etapas posteriores del estudio.



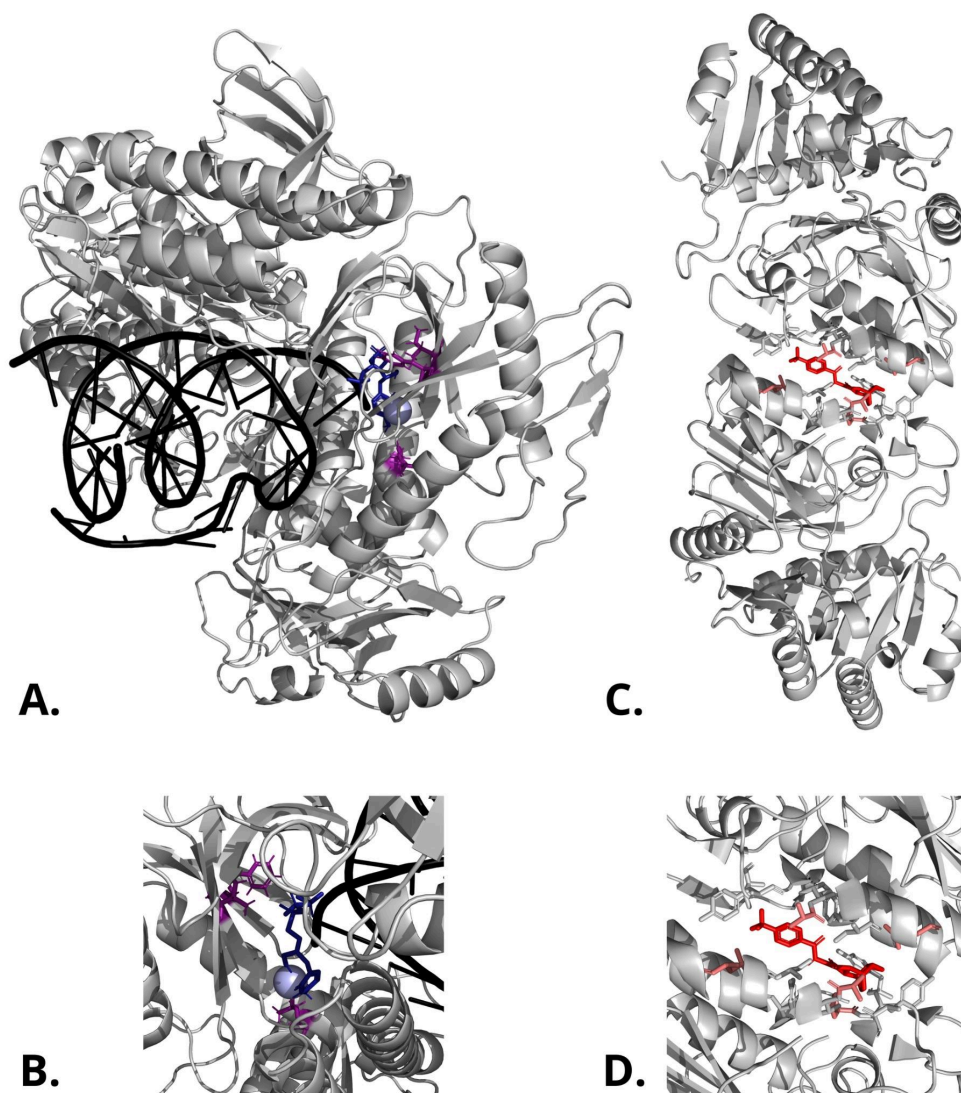
**Figura 3.** Representación estructural de los modelos generados por AlphaFold y sus estructuras de referencia. (A) Proteína F8L, (B) segmento de ADN viral, y (C) proteína F13, mostrados como componentes individuales. (D) Subcomplejo F8L/E4R/A22R asociado a ADN del virus Mpox (PDB: 8J8G). (E) Homodímero de F13 (PDB: 9FHK).

### **Validación estructural**

El análisis del diagrama de Ramachandran evidenció una excelente calidad estereoquímica en las estructuras modeladas. En promedio, el 92,30 % de los residuos se localizaron en regiones más favorecidas, mientras que un 7,52 % se encontró en regiones adicionales permitidas. Las regiones generosamente permitidas representaron apenas un 0,14 % y la fracción de residuos en zonas no permitidas (outliers) fue mínima, con un promedio de 0,05 %. Estos valores, con un alto porcentaje en zonas favorecidas y una proporción prácticamente nula de residuos en regiones prohibidas, confirman la adecuada geometría conformacional y la confiabilidad de los modelos para su uso en análisis estructurales posteriores. Estos resultados pueden observarse en detalle en la Tabla Suplementaria 2.

### **Protonación y Minimización de Energías**

La protonación de todas las estructuras, incluyendo las proteínas F8L, el homodímero de F13 y los antivirales TVM y CDFpp, se realizó de forma exitosa bajo condiciones equivalentes a un pH fisiológico de 7.4. Posteriormente, la minimización de energía permitió que tanto las proteínas como los compuestos antivirales alcancen conformaciones estables, evidenciadas por valores de energía optimizados y derivada igual a cero ( $dE = 0$ ), lo que indica la ausencia de tensiones energéticas relevantes y la obtención de modelos estructurales aptos para estudios de acoplamiento molecular posteriores.



**Figura 4.** Acoplamiento molecular del antiviral. (A) Complejo F8L-DNA-CDFpp (B) Detalle del sitio de unión en F8L con (C) Homodímero de F13. (D) Detalle del sitio de unión en el homodímero con el antiviral en rojo, residuos hidrofóbicos en salmón y residuos en contacto en *sticks*.

En el caso del homodímero de F13, el acoplamiento molecular con el antiviral mostró energías de unión comprendidas entre  $-8,8$  y  $-7,7$  kcal/mol, con un promedio de  $-8,15$  kcal/mol y una desviación estándar de  $0,33$  kcal/mol, lo que indica interacciones estables y consistentes en los diferentes ensayos. El análisis de las interacciones reveló la participación recurrente de residuos hidrofóbicos como Tyr285, Ala288, Ser292, Leu296 y Pro243, junto con otros

aminoácidos que establecen contactos directos con el ligando, todos representados en formato *sticks* en la visualización. En la Figura 4C se muestra la disposición general del antiviral en el sitio de unión del homodímero, mientras que en la Figura 4D se detalla su posición resaltada en color rojo, acompañada de los residuos hidrofóbicos en tonos salmón, evidenciando la red de interacciones que contribuyen a la estabilidad del complejo. Los valores individuales de energía y los residuos involucrados en cada interacción se presentan en la Tabla Suplementaria 3.

## **Discusión**

En el escenario terapéutico reciente frente a Mpox, Tecovirimat (TVM) se ha consolidado como el antiviral de uso predominante debido a su disponibilidad programática y a un perfil de seguridad favorable documentado en cohortes tratadas bajo protocolos de acceso expandido, con baja frecuencia de eventos adversos graves; sin embargo, los ensayos controlados más recientes no han mostrado beneficios clínicos claros en enfermedad leve-moderada, lo que refuerza la necesidad de complementar su evaluación con análisis mecanísticos y de resistencia (por ejemplo, en F13L, su diana), así como considerar estrategias antivirales alternativas. (*National Institutes of Health (NIH)*, 2024; O’Laughlin et al., 2022; PALM007 Writing Group et al., 2025) En paralelo, Cidofovir (CDF) y su profármaco Brincidofovir (BCF) constituyen opciones menos frecuentes, limitadas por toxicidad renal (CDF) o efectos gastrointestinales/hepáticos (BCF); no obstante, su forma activa intracelular común, Cidofovir difosfato (CDFpp), es la que interactúa con la maquinaria replicativa y, por tanto, la molécula más pertinente para estudios de acoplamiento sobre la polimerasa viral (eje F8L/DNA). Este marco terapéutico de TVM sobre F13 y CDFpp sobre el subcomplejo polimerasa, justifica el enfoque dual de este trabajo y prepara el terreno para interpretar, desde la estructura, posibles vías de escape antiviral ya observadas en pacientes y clústeres comunitarios (Garrigues et al., 2023; Pourkarim & Entezari-Maleki, 2024; Siegrist & Sassine, 2023; Stafford et al., 2023).

Desde el inicio del brote multinacional en 2022, la circulación en las Américas ha estado dominada por mpox clado I1b, con transmisión comunitaria sostenida y picos concentrados en grandes centros urbanos; entre 2022 y fines de 2024, la región acumuló decenas de miles de casos confirmados y reportes continuos en varios países, según los partes de PAHO/OPS y la

síntesis de situación de CDC. Estos informes ubican a clado I1b como la variante de mayor relevancia clínica y de salud pública en el continente durante el periodo analizado. (*Mpox in the United States and Around the World: Current Situation | Mpox | CDC*, n.d.; *Summary of the situation*, n.d.)

En paralelo, a fines de 2024 emergieron reportes internacionales de clado I1b asociados principalmente a África central, con casos importados detectados en países fuera de la región africana incluida la primera notificación en América (Estados Unidos) sin transmisión sostenida, lo que refuerza que, para las Américas, el escenario predominante siguió siendo clado I1b durante 2024–2025. Por ello, nuestro análisis prioriza variantes circulantes en 2024 y 2025 en el continente: maximiza la pertinencia epidemiológica del modelado y del docking para la vigilancia regional y evita extrapolar conclusiones desde linajes con dinámica distinta (clado I1b) aún no establecidos en transmisión comunitaria en la región (Du et al., 2025; Levy et al., 2025; Vakaniaki et al., 2024).

Para anclar el modelado en evidencia experimental de alta calidad, empleamos como plantillas dos entradas del PDB directamente pertinentes a nuestras dianas: 8J8G para el subcomplejo de la polimerasa (F8L/E4R/A22R) y 9FHK para F13 en su forma homodimérica. La 8J8G captura el holoenzima F8L–A22R–E4R ligado a ADN y a cidofovir difosfato (CDFpp), con resolución cryo-EM de 2.79 Å, lo que fija de manera realista el registro del ADN, la coordinación de Mg<sup>2+</sup> y la geometría del sitio catalítico donde se ubica el análogo nucleotídico (CDFpp) en la posición del sustrato dCTP. Esto reduce la incertidumbre al evaluar afinidades y contactos en el eje F8L/DNA–CDFpp, frente a construir el complejo por docking desde estructuras separadas (*EMDR : EMD-36069*, n.d.; Vernuccio et al., 2025; Xu et al., 2023). En paralelo, la 9FHK proporciona la estructura cristalográfica de F13 como homodímero a 2.10 Å, y cuenta además con un estado complejado con tecovirimat (2.6 Å), ofreciendo referencias directas para el sitio de unión de TVM y para la interfaz de dimerización relevante en el mecanismo de acción y en la cartografía de mutaciones de resistencia. Utilizar 9FHK como marco para nuestros homodímeros de F13 garantiza una comparación geométrica robusta antes del docking, optimizando la interpretación de variaciones en poses y contactos (Vernuccio et al., 2025; Xu et al., 2023). Por ello, partir de plantillas experimentales específicas del sistema (8J8G y 9FHK)

nos permitió conservar la arquitectura nativa de los sitios activos e interfaces y minimizar artefactos de ensamblaje in silico, reforzando la validez de las inferencias posteriores de docking (Xu et al., 2024).

Los complejos F8L/DNA mostraron porcentajes en regiones favorecidas entre 95.2–96.7%, con adicionalmente permitidas de 3.1–4.4% y outliers de 0.1–0.3% (n=16), lo que indica una geometría de esqueleto bien ajustada tras la superposición (Homodímeros F13) y como paso anterior a la protonación y minimización. En los homodímeros de F13, los valores favorecidos se ubicaron en 89.4–92.0% con 0% de outliers en todos los casos (n=16), un resultado consistente con un esqueleto mayoritariamente bien definido y sin violaciones graves de torsiones  $\phi/\psi$ . En términos comparativos, los controles presentaron una calidad inferior: F8L/DNA con 86.8% favorecido y 0.3% outliers, y el homodímero con 88.8% favorecido y 0.3% outliers, lo que refuerza que el protocolo de superposición guiada y minimización son necesarios para mejorar la estereoquímica frente a los puntos de partida. Estas cifras se alinean con los criterios de validación ampliamente aceptados, donde el diagrama de Ramachandran es una métrica central y se busca minimizar outliers (idealmente cero) y maximizar el porcentaje en regiones favorecidas (habitualmente >95% en modelos de alta calidad), siempre interpretando los porcentajes en conjunto con otras métricas y el contexto estructural (Laskowski et al., 1996; Sobolev et al., 2020; Wlodawer, 2017).

En cuanto a los homodimeros de F13 las energías de acoplamiento se ubican en  $-7.7$  a  $-8.8$  kcal/mol, con un núcleo de contactos recurrentes en PRO243, TYR253, TYR258, ILE262, TYR285, ALA288, THR289, SER292, ALA295, LEU296 y VAL298. El patrón, dominado por aromáticos/hidrofóbicos (p. ej., Tyr, Leu, Val, Ala) con contribuciones polares (Ser/Thr), es consistente con un bolsillo profundo e hidrofóbico para TVM, en línea con estudios estructurales recientes que describen la interacción de tecovirimat con F13 y su papel en el bloqueo del egreso viral. Estos datos respaldan la conservación del sitio de unión a través de las variantes evaluadas (Vernuccio et al., 2024).

En los complejos F8L/DNA–CDFpp las energías se concentraron en  $-6.0$  a  $-6.8$  kcal/mol y muestran un conjunto de residuos catalítico/posicionales repetidos: ASP549, ASP751, ASP753, THR752, SER754, PHE756, LYS661, ASN665, además de  $Mg^{2+}$  (MG 1104) y vecinos

(ILE547, TYR550, ASN551, SER552, LEU553, TYR554/PRO555, ARG634). El enriquecimiento de aspartatos y la coordinación de  $Mg^{2+}$  son coherentes con el mecanismo de dos metales característico de las ADN-polimerasas, en el que los Asp conservados y los cationes divalentes organizan el estado de transición y estabilizan el pirofosfato del análogo nucleotídico (CDFpp), mientras residuos básicos (p. ej., Lys661) asisten en la interacción con fosfatos del sustrato. Este patrón respalda que el docking se realizó en un entorno catalítico correcto (registro de ADN y geometría del sitio activo) (Batra et al., 2006; Yang et al., 2006).

El control del homodímero (Vaccinia) arrojó una energía más favorable ( $-10.5$  kcal/mol), lo que es esperable cuando el docking se aproxima a un estado co-cristalizado/cognato; en contraste, el control del complejo F8L/DNA ( $-6.4$  kcal/mol) quedó dentro del rango observado para las variantes. Recordamos que los scores de docking son semicuantitativos y su comparación entre sistemas distintos (proteína–ligando vs. polimerasa–nucleótido) debe interpretarse con cautela; la prioridad es la consistencia de poses/contactos con la química del sitio activo y la reproducibilidad entre variantes (Trott & Olson, 2010; Zheng et al., 2022).

Con base en los puntajes de acoplamiento, priorizamos las variantes con afinidad reducida (energías menos negativas) como candidatas a disminuir la susceptibilidad a los antivirales, y aquellas con afinidad conservada (más negativas) como de bajo riesgo. En F13/TVM, las variantes B.1.23 ( $-8.8$ ), B.1.20 ( $-8.6$ ), E.1 y E.2 ( $-8.5$ ) y F.2 ( $-8.4$ ) muestran el perfil más favorable (susceptibilidad preservada), mientras que B.1.22 y F.6 ( $-7.7$ ), seguidas por el clado Ib ( $-7.8$ ) y 4 ( $-7.9$ ), exhiben afinidades comparativamente menores y, por tanto, un señal de alerta relativa; el resto se agrupa en un rango intermedio ( $\approx -8.0$  a  $-8.2$ ). Este criterio es consistente con la interpretación semicuantitativa de los scores de docking, útil para priorizar pero no para confirmar resistencia, dado que las funciones de “scoring” tienen limitaciones y requieren validación experimental/estructural adicional (J. Li et al., 2019; Macip et al., 2022). En F8L/DNA–CDFpp, las variantes Ib y E.3 ( $-6.8$ ) y B.1.20, B.1.21, B.1.23 y F.4 ( $-6.7$ ) retienen la afinidad más alta (perfil favorable), mientras que E.1 y F.6 ( $-6.0$ ), seguidas por D.1 y E.2 ( $-6.2$ ) y A.2.2 y F.1 ( $-6.3$ ), muestran afinidades menores y se priorizan como candidatas a posible merma de eficacia; esta lectura se alinea con la arquitectura del sitio catalítico observada experimentalmente para la polimerasa F8 con CDFpp y ADN, donde la coordinación de  $Mg^{2+}$  y

los residuos ácidos y básicos vecinos gobiernan la unión del análogo nucleotídico (Xu et al., 2023). Considerando que la numeración corresponde a los mismos clados en ambas proteínas, destacan dos patrones útiles para vigilancia: variantes de “doble riesgo” como F.6 (débil para TVM y CDFpp) y perfiles disociados como E.1 (fuerte para TVM pero débil para CDFpp). En conjunto, estos hallazgos no constituyen por sí solos confirmación de resistencia, pero sí un mapa de priorización coherente con la evidencia clínica y de vigilancia que documenta mutaciones de resistencia en F13L durante tratamientos con tecovirimat y su potencial diseminación, reforzando la necesidad de validación y seguimiento genómico (Garrigues et al., 2023; Gigante et al., 2024).

El patrón que observamos en el acoplamiento F13/TVM (energías en el rango  $-7.7$  a  $-8.8$  kcal/mol) y un bolsillo dominado por residuos hidrofóbicos/aromáticos (p. ej., Tyr253, Tyr258, Tyr285, Leu296, Ala288) con contribuciones polares (Ser/Thr), concuerda con trabajos que han modelado o resuelto la unión de tecovirimat a F13. Estudios *in silico* orientados a descubrimiento/optimización de ligandos describen una cavidad hidrofóbica para F13 compatible con poses de TVM y análogos, y con dinámica estable tras simulaciones MD, en línea con nuestros contactos recurrentes (Ali et al., 2023). Más aún, datos estructurales recientes muestran a F13 como homodímero y capturan complejos con tecovirimat, proponiendo que el fármaco actúa como “molecular glue” en la interfaz del dímero; las mutaciones clínicas de resistencia mapean precisamente en esa superficie, coherente con que nuestro núcleo de interacción involucra tirosinas y alifáticos de la zona interfacial. Estas evidencias refuerzan la plausibilidad de las poses que obtuvimos y su relevancia funcional para el mecanismo de acción y la emergencia de resistencia (Ali et al., 2023; Chen et al., 2023).

En cambio, nuestras poses y contactos para CDFpp que son coordinación con  $Mg^{2+}$  y proximidad a Asp catalíticos (Asp549, Asp751, Asp753), junto a residuos básicos (p. ej., Lys661) capaces de estabilizar fosfatos son concordantes con la arquitectura catalítica de polimerasas B y, específicamente, con las estructuras cryo-EM de Mpox donde CDFpp ocupa la posición de dCTP en el sitio activo de F8, compitiendo con el nucleótido entrante y explicando su efecto inhibitor. En paralelo, modelados previos que evaluaron CDVpp frente a polimerasas de orthopoxvirus (E9 de VACV y F8 de MPXV) también predicen unión en el sitio catalítico

dependiente de dos metales, con la red de Asp/Mg<sup>2+</sup> organizando el estado de transición, en buen acuerdo con nuestro mapa de interacciones y el rango de energías observado. En conjunto, la comparación con estas referencias sugiere que las poses obtenidas reflejan un modo de unión fisiológicamente consistente para un análogo nucleotídico trifosfato (Y. Li et al., 2023; Xu et al., 2024).

Los puntajes de docking son semitantitativos y dependen de muestreo/reescalado; distintas funciones de *scoring* pueden recuperar la pose correcta pero fallar al jerarquizar afinidades. Los *benchmarks* (p. ej., CASF-2016) muestran variabilidad entre funciones en “scoring/ranking/docking/screening power”, por lo que se recomiendan controles (re-docking, enriquecimiento) y protocolos estandarizados antes de extrapolar a eficacia biológica (Bender et al., 2021; Macip et al., 2022; Su et al., 2019; Warren et al., 2006).

La validación mínima de un flujo de docking es el re-docking del ligando co-cristalizado para verificar la recuperación de la pose nativa; idealmente, debe complementarse con mutagénesis dirigida, ensayos bioquímicos/enzimáticos y pruebas fenotípicas. Hay precedentes donde predicciones de docking fueron confirmadas de forma experimental (p. ej., unión a tubulina verificada por termofóresis), y metodologías de escaneo mutacional profundo (DMS) permiten cartografiar paisajes de resistencia a gran escala, lo que las convierte en vías idóneas para validar y extender nuestros hallazgos (Moshari et al., 2022; Temml & Kutil, 2021; Wei & Li, 2023).

Por ello, integrar dinámica molecular (MD) y cálculos rigurosos de energía libre puede reducir falsos positivos y mejorar la priorización de variantes/ligandos: MD captura flexibilidad conformacional de blanco y ligando, mientras que RBE/ABFE han mostrado valor prospectivo en proyectos reales de *drug discovery* y ofrecen una base física más robusta que el *scoring* empírico. En conjunto con buenas prácticas (preparación estandarizada, controles de enriquecimiento) esto refina la inferencia sobre afinidades y modos de unión. Finalmente, a escala poblacional, mantener vigilancia genómica activa en las Américas (incluida secuenciación continua) es clave para detectar a tiempo variantes con escape antiviral y orientar el diseño de nuevos inhibidores o combinaciones terapéuticas (Ahmed et al., 2023; Cournia et al., 2017; PAHO, 2024.).

Bajo estas consideraciones, nuestros resultados estructurales y de docking ofrecen un marco mecanístico útil para priorizar mutaciones y *leads* en Mpox; su impacto se consolidará al integrarlos con MD/energías libres y validación experimental, y al conectarlos con la vigilancia genómica regional para anticipar y mitigar la resistencia antiviral.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Ronneberger, O., Willmore, L., Ballard, A. J., Bambrick, J., Bodenstein, S. W., Evans, D. A., Hung, C.-C., O'Neill, M., Reiman, D., Tunyasuvunakool, K., Wu, Z., Žemgulytė, A., Arvaniti, E., ... Jumper, J. M. (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, 630(8016), 493–500. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>
- Adler, H., Gould, S., Hine, P., Snell, L. B., Wong, W., Houlihan, C. F., Osborne, J. C., Rampling, T., Beadsworth, M. B., Duncan, C. J., Dunning, J., Fletcher, T. E., Hunter, E. R., Jacobs, M., Khoo, S. H., Newsholme, W., Porter, D., Porter, R. J., Ratcliffe, L., ... NHS England High Consequence Infectious Diseases (Airborne) Network. (2022). Clinical features and management of human monkeypox: a retrospective observational study in the UK. *The Lancet Infectious Diseases*, 22(8), 1153–1162. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00228-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00228-6)
- Ahmed, M., Maldonado, A. M., & Durrant, J. D. (2023). From byte to bench to bedside: molecular dynamics simulations and drug discovery. *ArXiv*.
- Ali, Y., Imtiaz, H., Tahir, M. M., Gul, F., Saddozai, U. A. K., Ur Rehman, A., Ren, Z.-G., Khattak, S., & Ji, X.-Y. (2023). Fragment-Based Approaches Identified Tecovirimat-Competitive Novel Drug Candidate for Targeting the F13 Protein of the Monkeypox Virus. *Viruses*, 15(2). <https://doi.org/10.3390/v15020570>

- Batra, V. K., Beard, W. A., Shock, D. D., Krahn, J. M., Pedersen, L. C., & Wilson, S. H. (2006). Magnesium-induced assembly of a complete DNA polymerase catalytic complex. *Structure*, *14*(4), 757–766. <https://doi.org/10.1016/j.str.2006.01.011>
- Bender, B. J., Gahbauer, S., Lutten, A., Lyu, J., Webb, C. M., Stein, R. M., Fink, E. A., Balias, T. E., Carlsson, J., Irwin, J. J., & Shoichet, B. K. (2021). A practical guide to large-scale docking. *Nature Protocols*, *16*(10), 4799–4832. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00597-z>
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, *28*(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Ceña-Diez, R., Singh, K., Spetz, A.-L., & Sönnernborg, A. (2022). Novel Naturally Occurring Dipeptides and Single-Stranded Oligonucleotide Act as Entry Inhibitors and Exhibit a Strong Synergistic Anti-HIV-1 Profile. *Infectious Diseases and Therapy*, *11*(3), 1103–1116. <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00626-8>
- Chen, Z.-R., Lv, Q.-L., Peng, H.-W., Liu, X.-Y., Hu, W.-L., & Hu, J.-F. (2023). Drug screening against F13 protein, the target of tecovirimat, as potential therapies for monkeypox virus. *The Journal of Infection*, *86*(2), 154–225. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2022.11.018>
- Cock, P. J. A., Antao, T., Chang, J. T., Chapman, B. A., Cox, C. J., Dalke, A., Friedberg, I., Hamelryck, T., Kauff, F., Wilczynski, B., & de Hoon, M. J. L. (2009). Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics*, *25*(11), 1422–1423. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp163>
- Cournia, Z., Allen, B., & Sherman, W. (2017). Relative binding free energy calculations in drug discovery: recent advances and practical considerations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *57*(12), 2911–2937. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.7b00564>

- Díaz-Brochero, C., & Cucunubá, Z. M. (2024). Epidemiological findings, estimates of the instantaneous reproduction number, and control strategies of the first Mpox outbreak in Latin America. *Travel Medicine and Infectious Disease*, *59*, 102701.  
<https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2024.102701>
- Du, M., Liu, M., & Liu, J. (2025). Mpox caused by Clade Ib: Epidemiological characteristics, prevention, and control. *Chinese Medical Journal*, *138*(5), 505–508.  
<https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000003464>
- Eastman, P., Galvelis, R., Peláez, R. P., Abreu, C. R. A., Farr, S. E., Gallicchio, E., Gorenko, A., Henry, M. M., Hu, F., Huang, J., Krämer, A., Michel, J., Mitchell, J. A., Pande, V. S., Rodrigues, J. P., Rodriguez-Guerra, J., Simmonett, A. C., Singh, S., Swails, J., ... Markland, T. E. (2024). OpenMM 8: Molecular Dynamics Simulation with Machine Learning Potentials. *The Journal of Physical Chemistry. B*, *128*(1), 109–116.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.3c06662>
- EMDR : EMD-36069. (n.d.). Retrieved August 29, 2025, from  
[https://www.emdataresource.org/EMD-36069?utm\\_source=chatgpt.com](https://www.emdataresource.org/EMD-36069?utm_source=chatgpt.com)
- Florescu, D. F., & Keck, M. A. (2014). Development of CMX001 (Brincidofovir) for the treatment of serious diseases or conditions caused by dsDNA viruses. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *12*(10), 1171–1178. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.948847>
- Garrigues, J. M., Hemarajata, P., Karan, A., Shah, N. K., Alarcón, J., Marutani, A. N., Finn, L., Smith, T. G., Gigante, C. M., Davidson, W., Wynn, N. T., Hutson, C. L., Kim, M., Terashita, D., Balter, S. E., & Green, N. M. (2023). Identification of Tecovirimat Resistance-Associated Mutations in Human Monkeypox Virus - Los Angeles County. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *67*(7), e0056823.

<https://doi.org/10.1128/aac.00568-23>

- Gigante, C. M., Takakuwa, J., McGrath, D., Kling, C., Smith, T. G., Peng, M., Wilkins, K., Garrigues, J. M., Holly, T., Barbian, H., Kittner, A., Haydel, D., Ortega, E., Richardson, G., Hand, J., Hacker, J. K., Espinosa, A., Haw, M., Kath, C., ... Hutson, C. L. (2024). Notes from the Field: Mpox Cluster Caused by Tecovirimat-Resistant Monkeypox Virus - Five States, October 2023-February 2024. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 73(40), 903–905. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7340a3>
- Guan, H., Gul, I., Xiao, C., Ma, S., Liang, Y., Yu, D., Liu, Y., Liu, H., Zhang, C. Y., Li, J., & Qin, P. (2023). Emergence, phylogeography, and adaptive evolution of mpox virus. *New Microbes and New Infections*, 52, 101102. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2023.101102>
- Guo, B., Zhang, Z., Guo, Y., Guo, G., Wang, H., Ma, J., Chen, R., Zheng, X., Bao, J., He, L., Wang, T., Qi, W., Tian, M., Wang, J., Zhou, C., Giraudoux, P., Marston, C. G., McManus, D. P., Zhang, W., & Li, J. (2021). High endemicity of alveolar echinococcosis in Yili Prefecture, Xinjiang Autonomous Region, the People’s Republic of China: Infection status in different ethnic communities and in small mammals. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(1), e0008891. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008891>
- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: An Advanced Semantic Chemical Editor, Visualization, and Analysis Platform. *Journal of Cheminformatics*, 4(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
- Heo, L., Park, H., & Seok, C. (2013). GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking. *Nucleic Acids Research*, 41(Web Server issue), W384-8. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt458>
- Huang, Y., Mu, L., & Wang, W. (2022). Monkeypox: epidemiology, pathogenesis, treatment and

prevention. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 373.

<https://doi.org/10.1038/s41392-022-01215-4>

In the Literature. (2023). *Clinical Infectious Diseases*, 77(11), i–ii.

<https://doi.org/10.1093/cid/ciad691>

Isidro, J., Borges, V., Pinto, M., Sobral, D., Santos, J. D., Nunes, A., Mixão, V., Ferreira, R., Santos, D., Duarte, S., Vieira, L., Borrego, M. J., Nuncio, S., de Carvalho, I. L., Pelerito, A., Cordeiro, R., & Gomes, J. P. (2022). Phylogenomic characterization and signs of microevolution in the 2022 multi-country outbreak of monkeypox virus. *Nature Medicine*, 28(8), 1569–1572. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01907-y>

Jurrus, E., Engel, D., Star, K., Monson, K., Brandi, J., Felberg, L. E., Brookes, D. H., Wilson, L., Chen, J., Liles, K., Chun, M., Li, P., Gohara, D. W., Dolinsky, T., Konecny, R., Koes, D. R., Nielsen, J. E., Head-Gordon, T., Geng, W., ... Baker, N. A. (2018). Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Science*, 27(1), 112–128.

<https://doi.org/10.1002/pro.3280>

Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), bbx108. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>

Khare, S., Gurry, C., Freitas, L., Schultz, M. B., Bach, G., Diallo, A., Akite, N., Ho, J., Lee, R. T., Yeo, W., Curation Team, G. C., & Maurer-Stroh, S. (2021). GISAID's role in pandemic response. *China CDC Weekly*, 3(49), 1049–1051. <https://doi.org/10.46234/ccdcw2021.255>

Ladnyj, I. D., Ziegler, P., & Kima, E. (1972). A human infection caused by monkeypox virus in Basankusu Territory, Democratic Republic of the Congo. *Bulletin of the World Health Organization*, 46(5), 593–597.

Lanier, R., Trost, L., Tippin, T., Lampert, B., Robertson, A., Foster, S., Rose, M., Painter, W.,

O'Mahony, R., Almond, M., & Painter, G. (2010). Development of CMX001 for the treatment of poxvirus infections. *Viruses*, 2(12), 2740–2762.

<https://doi.org/10.3390/v2122740>

Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R., & Thornton, J. M. (1996).

AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *Journal of Biomolecular NMR*, 8(4), 477–486.

<https://doi.org/10.1007/BF00228148>

Lee, M., Choi, C.-H., Kim, J.-W., Sim, G., Lee, S. E., Shin, H., Lee, J. H., Choi, M.-M., Yi, H.,

& Chung, Y.-S. (2024). Prolonged viral shedding in an immunocompromised Korean patient infected with hMPXV, sub-lineage B.1.3, with acquired drug resistant mutations during tecovirimat treatment. *Journal of Medical Virology*, 96(3), e29536.

<https://doi.org/10.1002/jmv.29536>

Levy, V., Branzuela, A., Hsieh, K., Getabecha, S., Berumen, R., Saadeh, K., Snyder, R. E.,

Marek, G., Dodson, D., Newman, A., Hacker, J. K., Kath, C., Minhaj, F. S., Gigante, C. M., Gearhart, S., Kallen, A., Hutson, C. L., Jacobson, K., & Clade I Mpox Response Team.

(2025). First Clade Ib Monkeypox Virus Infection Reported in the Americas - California, November 2024. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 74(4), 44–49.

<https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7404a1>

Likos, A. M., Sammons, S. A., Olson, V. A., Frace, A. M., Li, Y., Olsen-Rasmussen, M.,

Davidson, W., Galloway, R., Khristova, M. L., Reynolds, M. G., Zhao, H., Carroll, D. S.,

Curns, A., Formenty, P., Esposito, J. J., Regnery, R. L., & Damon, I. K. (2005). A tale of two clades: monkeypox viruses. *The Journal of General Virology*, 86(Pt 10), 2661–2672.

<https://doi.org/10.1099/vir.0.81215-0>

- Li, J., Fu, A., & Zhang, L. (2019). An Overview of Scoring Functions Used for Protein-Ligand Interactions in Molecular Docking. *Interdisciplinary Sciences : Computational Life Sciences*, *11*(2), 320–328. <https://doi.org/10.1007/s12539-019-00327-w>
- Li, Y., Shen, Y., Hu, Z., & Yan, R. (2023). Structural basis for the assembly of the DNA polymerase holoenzyme from a monkeypox virus variant. *Science Advances*, *9*(16), eadg2331. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adg2331>
- Macip, G., Garcia-Segura, P., Mestres-Truyol, J., Saldivar-Espinoza, B., Ojeda-Montes, M. J., Gimeno, A., Cereto-Massagué, A., Garcia-Vallvé, S., & Pujadas, G. (2022). Haste makes waste: A critical review of docking-based virtual screening in drug repurposing for SARS-CoV-2 main protease (M-pro) inhibition. *Medicinal Research Reviews*, *42*(2), 744–769. <https://doi.org/10.1002/med.21862>
- McCollum, A. M., & Damon, I. K. (2014). Human monkeypox. *Clinical Infectious Diseases*, *58*(2), 260–267. <https://doi.org/10.1093/cid/cit703>
- Mendez, D., Gaulton, A., Bento, A. P., Chambers, J., De Veij, M., Félix, E., Magariños, M. P., Mosquera, J. F., Mutowo, P., Nowotka, M., Gordillo-Marañón, M., Hunter, F., Junco, L., Mugumbate, G., Rodriguez-Lopez, M., Atkinson, F., Bosc, N., Radoux, C. J., Segura-Cabrera, A., ... Leach, A. R. (2019). ChEMBL: towards direct deposition of bioassay data. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D930–D940. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1075>
- Moshari, M., Wang, Q., Michalak, M., Klobukowski, M., & Tuszynski, J. A. (2022). Computational prediction and experimental validation of the unique molecular mode of action of scoulerine. *Molecules*, *27*(13). <https://doi.org/10.3390/molecules27133991>

*Mpox in the United States and Around the World: Current Situation* | Mpox | CDC. (n.d.).

Retrieved August 29, 2025, from

[https://www.cdc.gov/mpox/situation-summary/index.html?utm\\_source=chatgpt.com](https://www.cdc.gov/mpox/situation-summary/index.html?utm_source=chatgpt.com)

*NIH Study Finds Tecovirimat Was Safe but Did Not Improve Mpox Resolution or Pain* | National

*Institutes of Health (NIH)*. (n.d.). Retrieved August 29, 2025, from

[https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-study-finds-tecovirimat-was-safe-did-not-improve-mpox-resolution-or-pain?utm\\_source=chatgpt.com](https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-study-finds-tecovirimat-was-safe-did-not-improve-mpox-resolution-or-pain?utm_source=chatgpt.com)

O’Laughlin, K., Tobolowsky, F. A., Elmor, R., Overton, R., O’Connor, S. M., Damon, I. K., Petersen, B. W., Rao, A. K., Chatham-Stephens, K., Yu, P., Yu, Y., & CDC Monkeypox Tecovirimat Data Abstraction Team. (2022). Clinical Use of Tecovirimat (Tpoxx) for Treatment of Monkeypox Under an Investigational New Drug Protocol - United States, May-August 2022. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 71(37), 1190–1195. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7137e1>

Olson, R. D., Assaf, R., Brettin, T., Conrad, N., Cucinell, C., Davis, J. J., Dempsey, D. M., Dickerman, A., Dietrich, E. M., Kenyon, R. W., Kuscuoglu, M., Lefkowitz, E. J., Lu, J., Machi, D., Macken, C., Mao, C., Niewiadomska, A., Nguyen, M., Olsen, G. J., ... Stevens, R. L. (2023). Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D678–D689. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1003>

*PAHO calls on countries of the Americas to maintain Mpox surveillance and genomic sequencing - PAHO/WHO* | Pan American Health Organization. (n.d.). Retrieved August 29, 2025, from <https://www.paho.org/en/news/26-11-2024-paho-calls-countries-americas-maintain-mpox-su>

rveillance-and-genomic-sequencing?utm\_source=chatgpt.com

- PALM007 Writing Group, Ali, R., Alonga, J., Biampata, J.-L., Kombozi Basika, M., Maljkovic Berry, I., Bisento, N., Blum, E., Bonnett, T., Cone, K., Crozier, I., Davey, R., Dilu, A., Dodd, L. E., Gulati, I., Hruby, D., Ibanda, A., Isse, F., Kasareka, S. S., ... Weyers, S. (2025). Tecovirimat for clade I MPXV infection in the democratic republic of congo. *The New England Journal of Medicine*, 392(15), 1484–1496.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2412439>
- Pourkarim, F., & Entezari-Maleki, T. (2024). Clinical considerations on monkeypox antiviral medications: An overview. *Pharmacology Research & Perspectives*, 12(1), e01164.  
<https://doi.org/10.1002/prp2.1164>
- Ramírez-Soto, M. C. (2023). Monkeypox outbreak in peru. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 59(6).  
<https://doi.org/10.3390/medicina59061096>
- Schrodinger, L. L. C. (2021). The PyMOL Molecular Graphics System. (*No Title*).
- Schwartz, D. A., & Pittman, P. R. (2023). Mpox (Monkeypox) in Pregnancy: Viral Clade Differences and Their Associations with Varying Obstetrical and Fetal Outcomes. *Viruses*, 15(8). <https://doi.org/10.3390/v15081649>
- Siegrist, E. A., & Sassine, J. (2023). Antivirals with activity against mpox: A clinically oriented review. *Clinical Infectious Diseases*, 76(1), 155–164. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac622>
- Smith, T. G., Gigante, C. M., Wynn, N. T., Matheny, A., Davidson, W., Yang, Y., Condori, R. E., O’Connell, K., Kovar, L., Williams, T. L., Yu, Y. C., Petersen, B. W., Baird, N., Lowe, D., Li, Y., Satheshkumar, P. S., & Hutson, C. L. (2023). Tecovirimat Resistance in Mpox Patients, United States, 2022-2023. *Emerging Infectious Diseases*, 29(12), 2426–2432.  
<https://doi.org/10.3201/eid2912.231146>

- Sobolev, O. V., Afonine, P. V., Moriarty, N. W., Hekkelman, M. L., Joosten, R. P., Perrakis, A., & Adams, P. D. (2020). A Global Ramachandran Score Identifies Protein Structures with Unlikely Stereochemistry. *Structure*, 28(11), 1249-1258.e2.  
<https://doi.org/10.1016/j.str.2020.08.005>
- Stafford, A., Rimmer, S., Gilchrist, M., Sun, K., Davies, E. P., Waddington, C. S., Chiu, C., Armstrong-James, D., Swaine, T., Davies, F., Gómez, C. H. M., Kumar, V., ElHaddad, A., Awad, Z., Smart, C., Mora-Peris, B., Muir, D., Randell, P., Peters, J., ... Abbara, A. (2023). Use of cidofovir in a patient with severe mpox and uncontrolled HIV infection. *The Lancet Infectious Diseases*, 23(6), e218–e226. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00044-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00044-0)  
*Summary of the situation.* (n.d.).
- Su, M., Yang, Q., Du, Y., Feng, G., Liu, Z., Li, Y., & Wang, R. (2019). Comparative Assessment of Scoring Functions: The CASF-2016 Update. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 59(2), 895–913. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00545>
- Temml, V., & Kutil, Z. (2021). Structure-based molecular modeling in SAR analysis and lead optimization. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 1431–1444.  
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.02.018>
- Thornhill, J. P., Barkati, S., Walmsley, S., Rockstroh, J., Antinori, A., Harrison, L. B., Palich, R., Nori, A., Reeves, I., Habibi, M. S., Apea, V., Boesecke, C., Vandekerckhove, L., Yakubovsky, M., Sendagorta, E., Blanco, J. L., Florence, E., Moschese, D., Maltez, F. M., ... SHARE-net Clinical Group. (2022). Monkeypox Virus Infection in Humans across 16 Countries - April-June 2022. *The New England Journal of Medicine*, 387(8), 679–691.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2207323>
- 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>

- Vakaniaki, E. H., Kacita, C., Kinganda-Lusamaki, E., O’Toole, Á., Wawina-Bokalanga, T., Mukadi-Bamuleka, D., Amuri-Aziza, A., Malyamungu-Bubala, N., Mweshi-Kumbana, F., Mutimbwa-Mambo, L., Belesi-Siangoli, F., Mujula, Y., Parker, E., Muswamba-Kayembe, P.-C., Nundu, S. S., Lushima, R. S., Makangara-Cigolo, J.-C., Mulopo-Mukanya, N., Pukuta-Simbu, E., ... Mbala-Kingebezi, P. (2024). Sustained human outbreak of a new MPXV clade I lineage in eastern Democratic Republic of the Congo. *Nature Medicine*, 30(10), 2791–2795. <https://doi.org/10.1038/s41591-024-03130-3>
- Vernuccio, R., León, A. M., Poojari, C. S., Buchrieser, J., Selverian, C., Jaleta, Y., Meola, A., Guivel-Benhassine, F., Porrot, F., Haouz, A., Chevreuil, M., Raynal, B., Mercer, J., Simon-Loriere, E., Chandran, K., Schwartz, O., Hub, J. S., & Guardado-Calvo, P. (2024). Mechanisms of tecovirimat antiviral activity and poxvirus resistance. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-5002222/v1>
- Vernuccio, R., Martínez León, A., Poojari, C. S., Buchrieser, J., Selverian, C. N., Jaleta, Y., Meola, A., Guivel-Benhassine, F., Porrot, F., Haouz, A., Chevreuil, M., Raynal, B., Mercer, J., Simon-Loriere, E., Chandran, K., Schwartz, O., Hub, J. S., & Guardado-Calvo, P. (2025). Structural insights into tecovirimat antiviral activity and poxvirus resistance. *Nature Microbiology*, 10(3), 734–748. <https://doi.org/10.1038/s41564-025-01936-6>
- Viruela símica, un reto para la salud pública mundial*. (n.d.). Retrieved October 8, 2024, from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1684-18242022000400637&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1684-18242022000400637&script=sci_arttext)
- Warren, G. L., Andrews, C. W., Capelli, A.-M., Clarke, B., LaLonde, J., Lambert, M. H., Lindvall, M., Nevins, N., Semus, S. F., Senger, S., Tedesco, G., Wall, I. D., Woolven, J. M.,

Peishoff, C. E., & Head, M. S. (2006). A critical assessment of docking programs and scoring functions. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(20), 5912–5931.

<https://doi.org/10.1021/jm050362n>

Wei, H., & Li, X. (2023). Deep mutational scanning: A versatile tool in systematically mapping genotypes to phenotypes. *Frontiers in Genetics*, 14, 1087267.

<https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1087267>

Wlodawer, A. (2017). Stereochemistry and validation of macromolecular structures. *Methods in Molecular Biology*, 1607, 595–610. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7000-1\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7000-1_24)

Xu, Y., Wu, Y., Wu, X., Zhang, Y., Yang, Y., Li, D., Yang, B., Gao, K., Zhang, Z., & Dong, C. (2024). Structural basis of human mpox viral DNA replication inhibition by brincidofovir and cidofovir. *International Journal of Biological Macromolecules*, 270(Pt 2), 132231.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132231>

Xu, Y., Wu, Y., Zhang, Y., Fan, R., Yang, Y., Li, D., Zhu, S., Yang, B., Zhang, Z., & Dong, C. (2023). Cryo-EM structures of human monkeypox viral replication complexes with and without DNA duplex. *Cell Research*, 33(6), 479–482.

<https://doi.org/10.1038/s41422-023-00796-1>

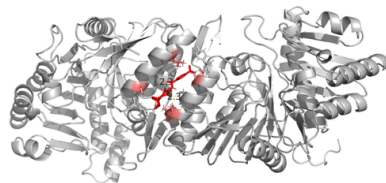
Yang, W., Lee, J. Y., & Nowotny, M. (2006). Making and breaking nucleic acids: two-Mg<sup>2+</sup>-ion catalysis and substrate specificity. *Molecular Cell*, 22(1), 5–13.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.03.013>

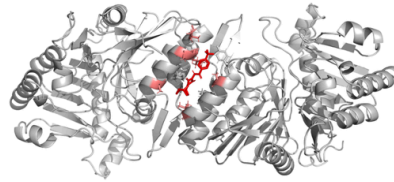
Zheng, L., Meng, J., Jiang, K., Lan, H., Wang, Z., Lin, M., Li, W., Guo, H., Wei, Y., & Mu, Y. (2022). Improving protein-ligand docking and screening accuracies by incorporating a scoring function correction term. *Briefings in Bioinformatics*, 23(3).

<https://doi.org/10.1093/bib/bbac051>

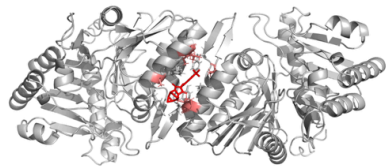
Figuras complementarias



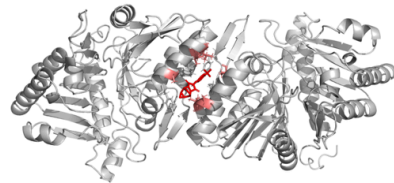
**Homodimero 1**



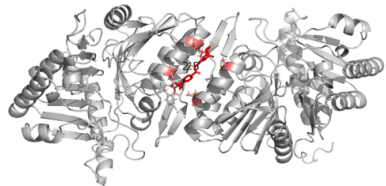
**Homodimero 2**



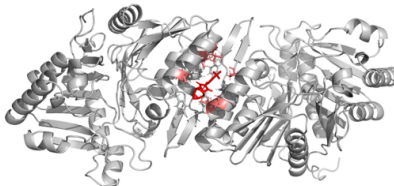
**Homodimero 3**



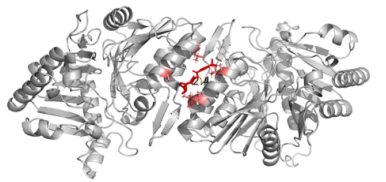
**Homodimero 4**



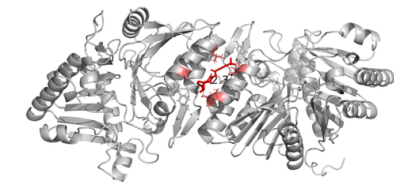
**Homodimero 5**



**Homodimero 6**

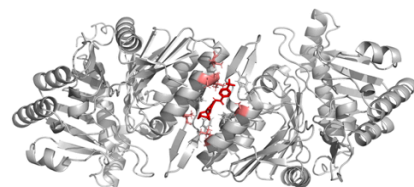


**Homodimero 7**

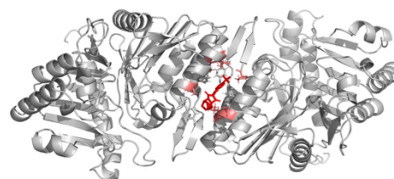


**Homodimero 8**

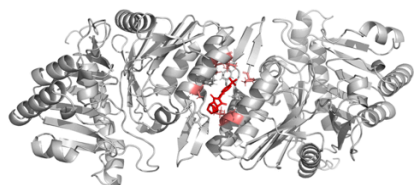
**Figura Suplementaria 1.** Acoplamiento molecular del antiviral TVM con las variantes de los homodímeros analizados, mostrando las poses de unión y los residuos involucrados en cada interacción (Parte 1). Los aminoácidos hidrofóbicos se representan en color salmón, el antiviral en color rojo, y los residuos en interacción se muestran en formato de bastones dentro del sitio de unión.



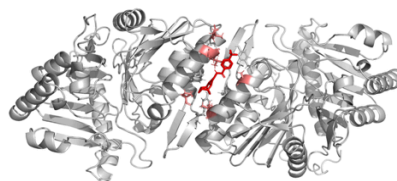
**Homodímero 9**



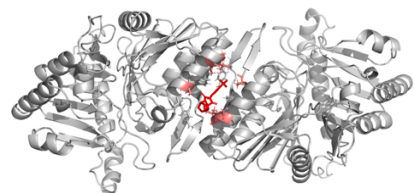
**Homodímero 10**



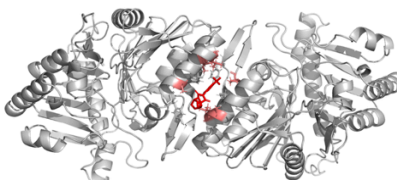
**Homodímero 11**



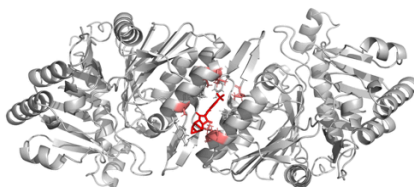
**Homodímero 12**



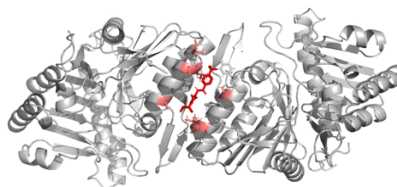
**Homodímero 13**



**Homodímero 14**

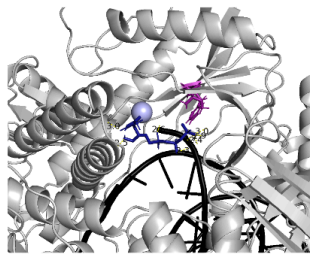


**Homodímero 15**

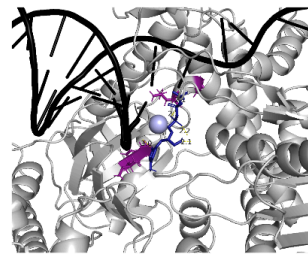


**Homodímero 16**

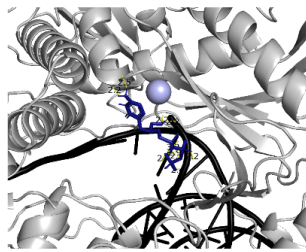
**Figura Suplementaria 2.** Acoplamiento molecular del antiviral TVM con las variantes de los homodímeros analizados, mostrando las poses de unión y los residuos involucrados en cada interacción (Parte 2). Los aminoácidos hidrofóbicos se representan en color salmón, el antiviral en color rojo, y los residuos en interacción se muestran en formato de bastones dentro del sitio de unión.



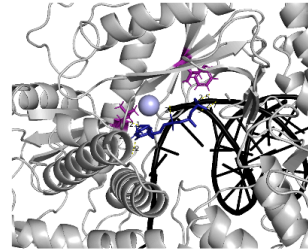
Complejo 1



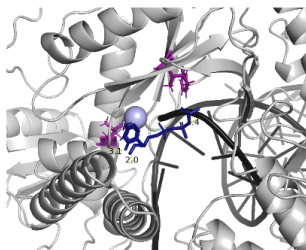
Complejo 2



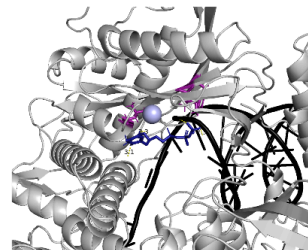
Complejo 3



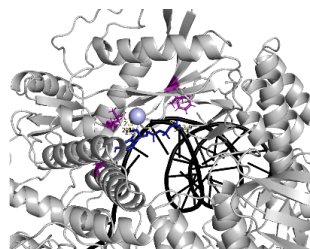
Complejo 4



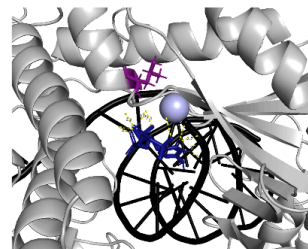
Complejo 5



Complejo 6

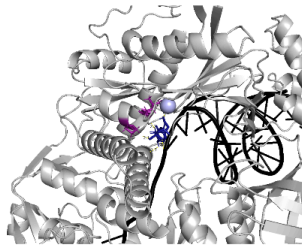


Complejo 7

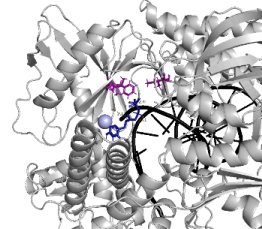


Complejo 8

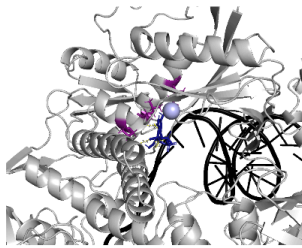
**Figura Suplementaria 3.** Acoplamiento molecular del antiviral de CDFpp con las variantes de los complejos analizados (Parte 1), mostrando las poses de unión y los residuos que participan en las interacciones. Los residuos hidrofóbicos se muestran en violeta, el antiviral en azul, el ion  $Mg^{2+}$  en celeste y el ADN en negro.



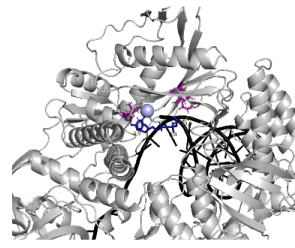
**Complejo 9**



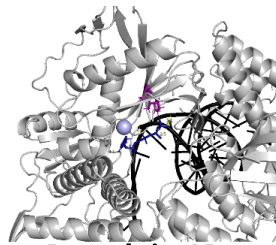
**Complejo 10**



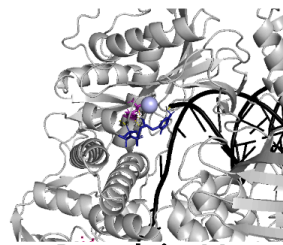
**Complejo 11**



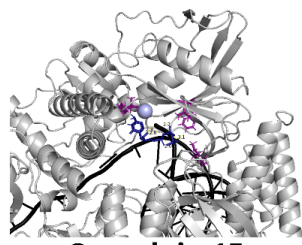
**Complejo 12**



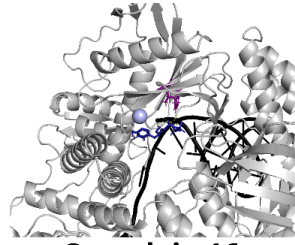
**Complejo 13**



**Complejo 14**



**Complejo 15**



**Complejo 16**

**Figura Suplementaria 4.** Acoplamiento molecular del antiviral de CDFpp con las variantes de los complejos analizados (Parte 2), mostrando las poses de unión y los residuos que participan en las interacciones. Los residuos hidrofóbicos se muestran en violeta, el antiviral en azul, el ion  $Mg^{2+}$  en celeste y el ADN en negro.

**Tablas suplementarias**

**Tabla Suplementaria 1.** Valores individuales de *Ranking\_score*, *Ptm*, *Disordered* y *Clashes* para cada variante de las proteínas F13 y F8L predichas por AlphaFold.

Proteína	Variante	Ranking_score	Ptm	Disordered	Clashes
f13	1	0.93	0.93	0.0	0.0
f13	2	0.93	0.93	0.0	0.0
f13	3	0.92	0.92	0.0	0.0
f13	4	0.93	0.93	0.0	0.0
f13	5	0.93	0.93	0.0	0.0
f13	6	0.93	0.93	0.0	0.0
f13	7	0.93	0.93	0.0	0.0
f13	8	0.93	0.93	0.0	0.0
f13	9	0.93	0.93	0.0	0.0
f13	10	0.93	0.93	0.0	0.0
f13	11	0.93	0.93	0.0	0.0
f13	12	0.93	0.93	0.0	0.0
f13	13	0.93	0.93	0.0	0.0
f13	14	0.93	0.93	0.0	0.0
f13	15	0.93	0.93	0.0	0.0
f13	16	0.93	0.93	0.0	0.0
f8l	1	0.92	0.92	0.0	0.0
f8l	2	0.92	0.92	0.0	0.0
f8l	3	0.91	0.91	0.0	0.0
f8l	4	0.92	0.92	0.0	0.0
f8l	5	0.92	0.92	0.0	0.0
f8l	6	0.92	0.92	0.0	0.0
f8l	7	0.91	0.91	0.0	0.0
f8l	8	0.91	0.91	0.0	0.0
f8l	9	0.91	0.91	0.0	0.0
f8l	10	0.91	0.91	0.0	0.0
f8l	11	0.92	0.92	0.0	0.0
f8l	12	0.91	0.91	0.0	0.0
f8l	13	0.91	0.91	0.0	0.0
f8l	14	0.92	0.92	0.0	0.0
f8l	15	0.91	0.91	0.0	0.0
f8l	16	0.92	0.92	0.0	0.0

**Tabla Suplementaria 2.** Resultados del análisis del diagrama de Ramachandran para las estructuras modeladas, indicando el porcentaje de residuos en regiones más favorecidas, adicionalmente permitidas, generosamente permitidas y no permitidas (outliers).

Nº	Polímero	Más favorecidas (favoured)	Adicionalmente permitidas	Generosamente permitidas	Disallowed (outliers)
1	F8L/DNA	96,0	3,7	0,2	0,1
2	F8L/DNA	96,0	3,9	0,0	0,1
3	F8L/DNA	95,9	3,8	0,1	0,2
4	F8L/DNA	96,0	3,7	0,1	0,2
5	F8L/DNA	95,2	4,4	0,2	0,2
6	F8L/DNA	95,8	3,9	0,1	0,2
7	F8L/DNA	95,5	4,3	0,0	0,2
8	F8L/DNA	95,8	3,9	0,1	0,2
9	F8L/DNA	95,8	3,9	0,1	0,2
10	F8L/DNA	95,6	4,1	0,1	0,2
11	F8L/DNA	96,1	3,4	0,1	0,3
12	F8L/DNA	96,1	3,6	0,1	0,2
13	F8L/DNA	95,8	3,9	0,1	0,2
14	F8L/DNA	96,0	3,7	0,1	0,2
15	F8L/DNA	96,7	3,1	0,0	0,2
16	F8L/DNA	95,6	4,1	0,1	0,2
1	Homodímero	91,7	8,3	0,0	0,0
2	Homodímero	90,0	10,0	0,0	0,0
3	Homodímero	91,4	8,6	0,0	0,0
4	Homodímero	90,9	9,1	0,0	0,0
5	Homodímero	92,0	8,0	0,0	0,0
6	Homodímero	89,5	10,5	0,0	0,0
7	Homodímero	90,9	9,1	0,0	0,0
8	Homodímero	90,3	9,7	0,0	0,0
9	Homodímero	90,6	9,4	0,0	0,0
10	Homodímero	91,4	8,6	0,0	0,0
11	Homodímero	91,2	8,8	0,0	0,0

12	Homodímero	89,4	10,6	0,0	0,0
13	Homodímero	90,9	9,1	0,0	0,0
14	Homodímero	90,6	9,4	0,0	0,0
15	Homodímero	91,2	8,8	0,0	0,0
16	Homodímero	91,2	8,8	0,0	0,0

**Tabla Suplementaria 3.** Energía de unión (kcal/mol) y residuos involucrados en el acoplamiento del antiviral con cada variante.

Nº	Protein	Energía (kcal/mol)	Residues
1	Homodímero	-7.8	TYR 285, ALA 288, SER 292, LEU 296, PRO 243, TYR 285, ALA 288, THR 289, SER 292, ALA 295, LEU 296
2	Homodímero	-8.0	TYR 258, TYR 285, ALA 288, SER 292, LEU 296, TYR 258, ALA 288, SER 292, ALA 295, LEU 296, VAL 298
3	Homodímero	-8.6	PRO 243, TYR 253, TYR 258, SER 292, ALA 295, LEU 296, TYR 253, TYR 258, ILE 262, TYR 285, ALA 288, THR 289, SER 292, LEU 296
4	Homodímero	-7.9	PRO 243, TYR 253, TYR 258, SER 292, ALA 295, LEU 296, TYR 258, ILE 262, TYR 285, ALA 288, SER 292, LEU 296
5	Homodímero	-7.7	ALA 288, SER 292, LEU 296, PRO 243, TYR 285, ALA 288, THR 289, SER 292, ALA 295, LEU 296
6	Homodímero	-8.8	PRO 243, TYR 253, TYR 258, SER 292, ALA 295, LEU 296, TYR 253, TYR 258, ILE 262, TYR 285, ALA 288, THR 289, SER 292, LEU 296
7	Homodímero	-8.0	PRO 243, TYR 285, ALA 288, THR 289, SER 292, ALA 295, LEU 296, ALA 288, SER 292, LEU 296
8	Homodímero	-8.1	PRO 243, TYR 285, ALA 288, THR 289, SER 292, ALA 295, LEU 296, TYR 285, ALA 288, SER 292, LEU 296
9	Homodímero	-8.5	TYR 258, TYR 285, ALA 288, SER 292, LEU 296, PRO 243, TYR 253, TYR 258, SER 292, ALA 295, LEU 296, VAL 298
10	Homodímero	-8.5	PRO 243, TYR 253, TYR 258, SER 292, ALA 295, LEU 296, TYR 258, ILE 262, TYR 285, ALA 288, THR 289, SER 292, LEU 296
11	Homodímero	-8.2	PRO 243, TYR 253, TYR 258, SER 292, ALA 295, LEU 296, TYR 258, ILE 262, TYR 285, ALA 288, SER 292, LEU 296
12	Homodímero	-8.2	TYR 258, TYR 285, ALA 288, SER 292, LEU 296, PRO 243, TYR 253, TYR 258, SER 292, ALA 295, LEU 296, VAL 298
13	Homodímero	-8.4	PRO 243, TYR 253, TYR 258, SER 292, ALA 295, LEU 296, TYR 258, ILE 262, TYR 285, ALA 288, THR 289, SER 292, LEU 296
14	Homodímero	-8.0	PRO 243, TYR 253, TYR 258, SER 292, ALA 295, LEU 296, TYR 258, ILE 262, TYR 285, ALA 288, SER 292, LEU 296
15	Homodímero	-8.0	PRO 243, TYR 253, TYR 258, SER 292, ALA 295, LEU 296, TYR 258, ILE 262, TYR 285, ALA 288, THR 289, SER 292, LEU 296

16	Homodímero	-7.7	TYR 258, TYR 285, ALA 288, SER 292, ALA 295, LEU 296, ALA 288, SER 292, ALA 295, LEU 296, VAL 298
1	Complejo	-6.8	ILE 547, ASP 549, TYR 550, ASN 551, SER 552, ARG 634, LYS 661, ASN 665, ASP 751, THR 752, ASP 753, SER 754, PHE 756, TYR 795, TYR 806, LYS 826, MG 1104
2	Complejo	-6.3	ILE 547, PHE 548, ASP 549, SER 552, LEU 553, TYR 554, PRO 555, LYS 661, ASN 665, TYR 668, THR 752, ASP 753, SER 754, GLU 792, TYR 795, MG 1104
3	Complejo	-6.7	ILE 547, ASP 549, TYR 550, ASN 551, SER 552, ARG 634, LYS 661, ASN 665, TYR 749, ASP 751, THR 752, ASP 753, SER 754, PHE 756, TYR 795, LYS 804, TYR 806, LYS 826
4	Complejo	-6.7	ILE 547, ASP 549, TYR 550, ASN 551, SER 552, LEU 553, ARG 634, LYS 638, LYS 661, ASN 665, ASP 751, THR 752, ASP 753, SER 754, PHE 756, GLU 790, GLU 792, TYR 795, TYR 806, LYS 826, MG 1104
5	Complejo	-6.5	ILE 547, ASP 549, TYR 550, ASN 551, SER 552, LEU 553, ARG 634, LYS 638, ASN 665, ASP 751, THR 752, ASP 753, SER 754, PHE 756, GLU 790, TYR 795, TYR 806, LYS 826, MG 1104
6	Complejo	-6.7	ILE 547, ASP 549, TYR 550, ASN 551, SER 552, LEU 553, TYR 554, ARG 634, LYS 661, ASN 665, ASP 751, THR 752, ASP 753, SER 754, PHE 756, TYR 795, TYR 806, LYS 826, MG 1104
7	Complejo	-6.6	ILE 547, ASP 549, TYR 550, ASN 551, SER 552, LEU 553, ARG 634, LYS 661, ALA 664, ASN 665, ASP 751, THR 752, ASP 753, SER 754, PHE 756, TYR 795, TYR 806, LYS 826, MG 1104
8	Complejo	-6.2	ASP 549, TYR 550, ASN 551, SER 552, LEU 553, ARG 634, LYS 661, ASN 665, ASP 751, THR 752, ASP 753, SER 754, GLU 790, LYS 804, LYS 826
9	Complejo	-6.0	TYR 550, ASN 551, SER 552, LEU 553, TYR 554, PRO 555, ARG 634, LYS 638, GLN 657, LYS 661, ASN 665, TYR 668, ASP 753, GLU 790, MG 1104
10	Complejo	-6.2	ILE 547, ASP 549, TYR 550, ASN 551, SER 552, ARG 634, ASN 665, ASP 751, THR 752, ASP 753, SER 754, PHE 756, GLU 792, TYR 795, LYS 804, TYR 806, LYS 810, ILE 824, LYS 826, MG 1104
11	Complejo	-6.8	GLY 531, LYS 532, ASN 551, SER 552, LEU 553, TYR 554, PRO 555, ARG 634, LYS 661, ASN 665, TYR 668, THR 688, GLY 691, ARG 692, ILE 695, THR 752, ASP 753
12	Complejo	-6.3	ILE 547, ASP 549, TYR 550, ASN 551, SER 552, LEU 553, ARG 634, LYS 661, ASN 665, ASP 751, THR 752, ASP 753, SER 754, PHE 756, TYR 795, LYS 804, TYR 806, MG 1104
13	Complejo	-6.5	ILE 547, ASP 549, TYR 550, ASN 551, SER 552, ARG 634, LYS 661, ASN 665, ASP 751, THR 752, ASP 753, SER 754, PHE 756, GLU 790, TYR 795, TYR 806, LYS 826, MG 1104

14	Complejo	-6.7	ASP 549, TYR 550, ASN 551, SER 552, LEU 553, TYR 554, ARG 634, LYS 638, LYS 661, ASN 665, ASP 751, THR 752, ASP 753, SER 754, GLU 790, MG 1104
15	Complejo	-6.4	ILE 547, ASP 549, TYR 550, ASN 551, SER 552, LEU 553, ASN 665, ASP 751, THR 752, ASP 753, SER 754, PHE 756, GLU 792, TYR 795, TYR 806, LYS 810, ILE 824, LYS 826, SER 878, MG 1104
16	Complejo	-6.0	ILE 547, ASP 549, TYR 550, ASN 551, SER 552, LYS 661, ASP 751, THR 752, ASP 753, SER 754, PHE 756, TYR 795, LYS 804, TYR 806, LYS 826