

**FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA**

**ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES ENTRE LAS PROTEÍNAS
TRANSCRIPTASA INVERSA (RT) Y DNA DEL VIRUS DE LA
INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1) A TRAVÉS DE DINÁMICA
MOLECULAR.**

PRESENTAN:

Pertuz-Peña Maria Fernanda¹, Puello-Guerra Natalia Melitza¹

¹ Facultad de ciencias básicas y biomédicas. Universidad Simón Bolívar, Barranquilla-Atlántico, Colombia. Programa de Microbiología.

Email: maria.pertuz1@unisimon.edu.co

¹ Facultad de ciencias básicas y biomédicas. Universidad Simón Bolívar, Barranquilla-Atlántico, Colombia. Programa de Microbiología.

Email: natalia.puello@unisimon.edu.co

PROFESOR TUTOR:

MOISES ALBERTO ARQUEZ MENDOZA

Email: marquez2@unisimonbolivar.edu.co

**30 DE OCTUBRE
BARRANQUILLA, ATLÁNTICO
REPÚBLICA DE COLOMBIA**

1. RESUMEN

El VIH ha sido un tema de preocupación a nivel global y continúa siendo uno de los desafíos más apremiantes en la esfera de la salud pública a nivel mundial. La elevada diversidad genética del virus ha dado lugar a mutaciones en la RT que confieren resistencia a diversos inhibidores de la RT. Por lo tanto, esta tesis se centró en analizar las interacciones entre las proteínas RT y el ADN del virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1) mediante dinámica molecular. El estudio comenzó con la búsqueda de secuencias en la base de datos Protein Data Bank (PDB) que contienen cristales de los complejos RT WT-DNA y RT mutante-DNA. Para obtener estructuras iniciales, se utilizó un modelo generado por AlphaFold2 para la RT mutante, debido a que el cristal encontrado tenía Gaps, mientras que se usó la estructura del PDB para la RT WT. A su vez, se llevó a cabo un modelado de la proteína mutante, seleccionando el mejor candidato generado por AlphaFold2 y validando su estructura con la herramienta MatchMaker. Posteriormente, se preparó el sistema para la simulación de dinámica molecular, que implicó la adición de iones y agua, así como la parametrización de las interacciones entre átomos y moléculas utilizando campos de fuerza específicos. Simultáneamente, se realizó una fase de minimización en el sistema, seguida de calentamiento y equilibrio bajo condiciones de presión constante. Finalmente, se llevó a cabo una simulación de producción de 100 ns.

La relevancia biológica de estas mutaciones radica en su potencial impacto en la eficacia de los tratamientos antirretrovirales y la capacidad del VIH-1 para resistirlos. Es por esta razón que resultados revelaron diferencias significativas en la estructura y flexibilidad entre la RT mutante y la RT WT, lo que sugiere que las mutaciones pueden influir en la estabilidad y la función de la proteína.

Además, se calculó la energía libre de unión a través de mecánica molecular - área de superficie basada en Poisson-Boltzmann (MM/PBSA) para evaluar la afinidad entre la RT y el ADN. Posteriormente, se identificaron residuos específicos que contribuyen

significativamente a la estabilidad del complejo. Asimismo, se analizaron las interacciones entre residuos a lo largo de la simulación, identificando cinco categorías de interacciones: aniónicas, hidrofóbicas, contactos de van der Waals, interacciones tipo pi-stacking y enlaces donadores y aceptores de puentes de hidrógeno. Los resultados revelaron diferencias en las interacciones en la RT mutante y la RT WT, lo que proporciona información valiosa sobre cómo las mutaciones pueden alterar la dinámica molecular de la proteína.

Los resultados sugieren la hipótesis de que la RT mutante, al tener un mayor número de interacciones en los tipos de Anionic, VdWcontact y HBAceptor, podría estar mejor preparada para resistir la acción de los fármacos antirretrovirales. Por otro lado, la RT WT, al carecer de estas interacciones en la misma medida, podría ser menos eficaz en la resistencia a los medicamentos.

Para concluir, esta tesis utilizó la dinámica molecular para analizar las interacciones entre las proteínas RT y el ADN del VIH-1, proporcionando información esencial sobre cómo las mutaciones en la RT pueden afectar su estructura y función, así como su capacidad de resistir a los tratamientos antirretrovirales. Los resultados obtenidos tienen implicaciones significativas en la investigación y el tratamiento del VIH-1.

Palabras claves: VIH-1, Retrovirus, Bioinformática, DNA, Transcriptasa inversa, Dinámica molecular.

ABSTRACT

HIV has been an issue of global concern and continues to be one of the most pressing public health challenges worldwide. The high genetic diversity of the virus has resulted in mutations in RT that confer resistance to various RT inhibitors. Therefore, this thesis focused on analyzing the interactions between RT proteins and Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) DNA by molecular dynamics. The study began by searching the Protein Data Bank (PDB) database for sequences containing crystals of the RT WT-DNA and RT mutant-DNA complexes. To obtain initial structures, a model generated by AlphaFold2 was used for mutant

RT, because the crystal found had Gaps, while the PDB structure was used for WT RT. In turn, a modeling of the mutant protein was carried out, selecting the best candidate generated by AlphaFold2 and validating its structure with the MatchMaker tool. Subsequently, the system was prepared for molecular dynamics simulation, which involved the addition of ions and water, as well as the parameterization of interactions between atoms and molecules using specific force fields. Simultaneously, a minimization phase was performed on the system, followed by heating and equilibrium under constant pressure conditions. Finally, a 100 ns production simulation was carried out.

The biological relevance of these mutations lies in their potential impact on the efficacy of antiretroviral treatments and the ability of HIV-1 to resist them. It is for this reason that results revealed significant differences in structure and flexibility between mutant RT and WT RT, suggesting that mutations may influence protein stability and function.

In addition, binding free energy was calculated via molecular mechanics-Poisson-Boltzmann-based surface area (MM/PBSA) to assess the affinity between RT and DNA. Subsequently, specific residues that contribute significantly to the stability of the complex were identified. Furthermore, the interactions between residues throughout the simulation were analyzed, identifying five categories of interactions: anionic, hydrophobic, van der Waals contacts, pi-stacking interactions, and hydrogen bridge donor and acceptor bonds. The results revealed differences in the interactions in mutant RT and WT RT, providing valuable information on how mutations can alter the molecular dynamics of the protein.

The results suggest the hypothesis that mutant RT, having a greater number of interactions in the Anionic, VdWcontact and HBAacceptor types, might be better able to resist the action of antiretroviral drugs. On the other hand, RT WT, lacking these interactions to the same extent, might be less effective in drug resistance.

To conclude, this thesis used molecular dynamics to analyze the interactions between RT proteins and HIV-1 DNA, providing essential information on how mutations in RT may

affect its structure and function, as well as its ability to resist antiretroviral treatments. The results obtained have significant implications for HIV-1 research and treatment.

Keywords: HIV-1, Retrovirus, Bioinformatics, DNA, Reverse transcriptase, Molecular dynamics.

2. INTRODUCCIÓN

Desde la aparición del primer caso de VIH/SIDA en la década de 1980, este virus ha sido un tema de preocupación a nivel global y continúa siendo uno de los desafíos más apremiantes en la esfera de la salud pública a nivel mundial. Esto ha dado lugar a incertidumbres epidemiológicas relacionadas con el futuro del VIH/SIDA. Por lo tanto, resulta crucial mantener una vigilancia constante de las estadísticas globales que abordan la prevalencia del VIH/SIDA, las tasas de mortalidad, los años de vida ajustados por discapacidad (AVAD) y los factores de riesgo con el fin de asegurar una prevención y control efectivos (Tian et al., 2023).

Según los datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que hubo 39.0 millones de personas que viven con el VIH a finales del 2022 (OMS, 2023). De ellas, 37,5 millones eran adultos y 1,5 millones eran niños (<15 años). Además, el 53% eran mujeres y niñas (HIV and AIDS Epidemic Global Overview | HIV.Gov, 2023). El 29,8 millón de personas tuvieron acceso a la terapia antirretroviral en 2022 (ONUSIDA, 2023). Por lo que, esta infección ejerce un impacto adverso tanto en el ámbito de la salud como en el económico, dado el elevado costo del tratamiento del VIH y las tasas elevadas de mortalidad y morbilidad asociadas (Menzies et al., 2011).

La búsqueda de terapias efectivas y estrategias preventivas sigue siendo una prioridad esencial en la lucha contra esta enfermedad, en particular para las personas en edad

reproductiva o aquellas con otras enfermedades de alto riesgo (Menzies et al., 2011). En el caso de Colombia, las estadísticas revelan una significativa prevalencia del VIH en el país. Según el Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia, hasta el año 2021 se han notificado más de 150,000 casos de VIH en el territorio colombiano (Montana et al., 2021).

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), pertenece a la familia Retroviridae y se clasifica como un lentivirus, tiene una estructura virionica que está recubierta por una bicapa lipídica de origen celular, formando una envoltura externa. En esta envoltura, se encuentran glicoproteínas virales que desempeñan un papel esencial en la entrada del virus en las células huésped. Dentro del virión del VIH, se halla un núcleo interno compuesto por una capa exterior de moléculas de proteína de la cápside (proteína CA) que rodean el genoma de ARN dimérico. Además, el núcleo contiene alrededor de 2000 moléculas de proteína de la nucleocápside (proteína NC), así como moléculas de transcriptasa inversa (RT) e integrasa (IN) (Kasaraneni et al., 2017). La enzima viral transcriptasa inversa (RT) es esencial para la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Iliina et al., 2012). La RT del VIH es multifuncional, por lo que ha sido un objetivo central en el desarrollo de fármacos contra el VIH. La elevada diversidad genética del virus ha dado lugar a mutaciones en la RT que confieren resistencia a diversos inhibidores de la RT (Cilento et al., 2021). Las actividades de la ADN polimerasa dependiente de ARN, la ribonucleasa H y la ADN polimerasa dependiente de ADN de la RT son esenciales para la transcripción del ARN viral para producir ADN bicatenario que puede integrarse en el genoma del huésped. (Matamoros et al., 2013).

La RT es una enzima heterodimérica asimétrica que consiste en una subunidad de 560 aminoácidos de 66 kDa (p66) y una subunidad de 440 aminoácidos de 51 kDa (p51) El

heterodímero contiene un único sitio de polimerización de ADN activo, un sitio activo de RNasa H y un sitio de unión de ARN (Warren et al., 2009).

Las interacciones proteína-proteína y las características específicas de cada subunidad son determinantes en la estructura y función de la RT. El heterodímero RT p66/p51 ha sido objeto de amplias investigaciones y representa el principal blanco de la terapia antirretroviral (Amblard et al., 2022). La subunidad p66 tiene 560 residuos de largo y exhibe todas las actividades enzimáticas de la RT, engloba tanto los sitios activos de polimerasa como de RNasa H. Esta subunidad se divide en cuatro subdominios conocidos como "fingers" (F) (que comprenden los residuos 1-85 y 118-155), "palm" (P) (que abarcan los residuos 86-117 y 156-236), "thumb" (T) (que incluye los residuos 237-318), y "connection" (C) (que engloba los residuos 319-426). La subunidad p51 más pequeña tiene aproximadamente 440 residuos de largo y es idéntica a la porción N-terminal de p66. En su mayor parte, la subunidad p51 estabiliza el heterodímero, pero también puede participar en la unión del cebador de ARNt (Herschhorn & Hizi, 2010).

La actividad de la transcriptasa inversa (RT) en el VIH-1 desempeña un rol fundamental en la reproducción del virus al permitir la conversión del ARN viral en ADN. La transcriptasa inversa (RT) del VIH-1 contribuye al desarrollo de resistencia a todos los fármacos contra el SIDA al introducir mutaciones en el genoma viral. A nivel molecular, las mutaciones en RT dan como resultado resistencia a los inhibidores de RT. (Das & Arnold, 2013). Esto es de gran relevancia en el contexto del tratamiento del VIH, ya que, a la fecha, no se ha encontrado una cura o vacuna para la enfermedad. Sin embargo, gracias al desarrollo de fármacos antirretrovirales, se ha logrado reducir significativamente la morbilidad y mortalidad de los pacientes. Cuando se diagnostica a un paciente en las etapas iniciales de la infección y se le proporciona el tratamiento adecuado, se puede disminuir la carga viral y minimizar el riesgo

de desarrollar el SIDA. Actualmente, existen alrededor de 30 fármacos antirretrovirales aprobados, los cuales se agrupan en 6 clases según su mecanismo de acción. Entre estas clases se incluyen los inhibidores no nucleosídicos de la retrotranscriptasa (NNRTIs) (Martínez Del Río & Menéndez Arias, 2020). El papel que juegan los distintos aminoácidos en la actividad DNA polimerasa de la RT ha sido extensamente estudiado, generándose numerosos cambios de aminoácidos entre las posiciones 65 y 205 (Grande, T. M. 2008).

El VIH se clasifica en dos serotipos debido a su diversidad genética: el VIH-1, que es más prevalente, y el VIH-2, que se encuentra comúnmente en ciertas regiones de África. Ambos comparten similitudes en términos de estructura y ciclo de vida, aunque presentan algunas diferencias. El VIH-2 es menos virulento, mientras que el VIH-1 es el agente causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Santoro et al., 2013).

El SIDA es una enfermedad que debilita el sistema inmunológico, dejando al organismo vulnerable a infecciones oportunistas y enfermedades graves. Uno de los rasgos distintivos del VIH-1 es su alta tasa de mutación, lo que le permite evadir con rapidez las respuestas del sistema inmunológico y desarrollar resistencia a los antirretrovirales. Estos medicamentos son fundamentales en el tratamiento del VIH, ya que actúan inhibiendo la replicación del virus y reduciendo la carga viral en el organismo, lo que contribuye a controlar la progresión de la enfermedad y mejorar la calidad de vida de las personas infectadas (Alave et al., 2013).

Existen diversas clases de antirretrovirales, cada una con mecanismos de acción específicos, como los inhibidores de la transcriptasa inversa, los inhibidores de la proteasa y los inhibidores de la integrasa (Machado & Alzate, 2008). Estos medicamentos se utilizan en combinación, en lo que se conoce como terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), con el fin de maximizar su eficacia y reducir el riesgo de resistencia viral (Alave et al., 2013). La terapia antirretroviral ha tenido un impacto significativo en la reducción de la mortalidad

relacionada con el VIH. Los fármacos antirretrovirales aprobados tienen como objetivo distintas etapas del ciclo de vida del virus, abarcando desde la entrada viral, con el uso de antagonistas de los coreceptores e inhibidores de la fusión, hasta la maduración del virus, que se aborda mediante inhibidores de proteasa (Menéndez-Arias, 2010).

Sin embargo, los mecanismos de resistencia viral han complicado la eficacia de estos medicamentos a lo largo del tiempo. Uno de los factores que contribuye a esta resistencia es la interacción entre la proteína RT y el ADN durante la transcripción inversa, un proceso crítico que modula la eficacia de la replicación viral. Esta interacción se produce en varias etapas durante la replicación viral. En primer lugar, la proteína RT se une al ARN viral y comienza la síntesis del ADN complementario (cADN). Durante este proceso, la RT muestra una alta fidelidad al copiar el ARN viral, lo que asegura la integridad del genoma viral. No obstante, la RT también puede cometer errores durante la síntesis del cADN, lo que resulta en la generación de mutaciones en el genoma viral y en la aparición de variantes resistentes a los medicamentos antirretrovirales. Una vez sintetizado el cADN, la RT lleva a cabo una actividad de exonucleasa para eliminar el ARN viral remanente y completar la síntesis del ADN viral de doble cadena. Esta actividad exonucleasa es esencial para la estabilidad e integridad del genoma viral (Herschhorn & Hizi, 2010).

Dada la creciente problemática relacionada con la resistencia a los antirretrovirales, se han desarrollado diversas estrategias para el diagnóstico, tratamiento y prevención de la infección por VIH-1. Estas estrategias incluyen el uso de la bioinformática y la dinámica molecular. La bioinformática desempeña un papel crucial en la predicción y análisis de los sitios de unión, la comprensión de las características estructurales y la predicción de las consecuencias funcionales de estas interacciones (Waterman, 1998).

A través del uso de algoritmos y herramientas computacionales, es posible analizar secuencias y estructuras de proteínas y ADN para obtener información sobre sus interacciones. La dinámica molecular (MD) es una técnica computacional que se utiliza para simular los movimientos e interacciones de átomos y moléculas a lo largo del tiempo, actualmente resulta ser una herramienta eficaz para describir a nivel atómico sistemas biológicos complejos y poder responder preguntas de investigación asociadas a estos sistemas (Rámirez et al., 2021).

En el contexto de las interacciones proteína-ADN, las simulaciones de MD ofrecen información valiosa acerca del comportamiento dinámico del complejo, incluyendo cambios conformacionales, afinidad de unión y estabilidad del complejo proteína-ADN (Goeta, 2002).

Con respecto a la proteína RT y el ADN del VIH-1, la bioinformática y la dinámica molecular pueden ser empleadas para estudiar las interacciones entre la proteína RT y el ADN viral durante el proceso de transcripción inversa. Estas técnicas pueden proporcionar información valiosa sobre los sitios de unión, los cambios conformacionales y la dinámica del complejo RT-DNA, elementos cruciales para comprender la replicación del virus y desarrollar terapias antivirales efectivas.

3. Objetivo general:

Determinar la interacción entre la proteína RT del VIH-1, el DNA molde y su impacto en la resistencia a los antirretrovirales utilizando dinámica molecular.

4. Objetivos específicos:

Objetivo 1. Modelar la estructura de proteínas RT WT y RT mutantes (E138K/M184I) del VIH-1 a partir de programas de modelado molecular.

Objetivo 2. Realizar dinámica molecular con las proteínas RT y sustrato de DNA.

Objetivo 3. Determinar los aminoácidos implicados en la estabilidad del complejo RT DNA.

5. METODOLOGÍA

5.1. Búsqueda de secuencias

Se utilizó el servidor Protein Data Bank (PDB), en donde se hallaron los cristales de los complejos RT WT-DNA que se encuentra con el código 6UJX y RT mutante-DNA con el código 7Z29.

5.2. Obtención de estructuras iniciales

Para la obtención de la estructura tridimensional de la proteína RT mutante se identificaron cristales con alta resolución, sin embargo, estos presentaban gaps en sus estructuras, por lo tanto, se decidió utilizar un modelo generado por AlphaFold 2, el cual se basó en la secuencia de aminoácidos del cristal encontrado.

Por el contrario, para la proteína WT si se utilizó el cristal hallado en el servidor PDB, ya que está si cumplía con los estándares de calidad que se requerían.

5.3. Modelamiento de las proteínas.

Debido a que Alphafold2 género cinco posibles candidatos de la RT mutante del VIH-1, se escogió entre estos al mejor, teniendo en cuenta tests de predicción de diferencias de distancias locales (pLDDT) y gráficos de predicción de error de alineamiento (PAE).

A su vez, la estructura se validó a través de un método basado en superposición con la herramienta MatchMaker del software UCSF CHIMERAX que permitió conocer la similitud entre el cristal y la estructura obtenida en el Alphafold2.

5.4. Preparación del sistema para simulación de dinámica molecular.

El proceso de simulación de dinámica molecular comienza configurando el sistema molecular, lo que implica la adición de iones, agua u otros componentes necesarios para representar el entorno fisiológico o experimental relevante. Posteriormente, se procede a la parametrización de las interacciones entre átomos y moléculas en el sistema, utilizando parámetros específicos de fuerza que describen las energías potenciales y las fuerzas intermoleculares. Estos parámetros son fundamentales para determinar cómo las moléculas interactúan entre sí a lo largo de la simulación, por lo que se deben tener los campos de fuerzas para poder hacer una correcta interpretación de los resultados.

Los Campos de fuerzas que se utilizaron para DNA es el OL15, para las proteínas ff19SB, los cuales son los campos establecidos por el programa AMBER22. El sistema se solvato en una caja cúbica de 30 Å utilizando el modelo de aguas OPC.

5.5. Minimización del sistema

Una vez obtenidas las estructuras tridimensionales de las proteínas, se procede a realizar la simulación de dinámica molecular utilizando el programa Amber22.

Se hicieron 2 dinámicas, la primera fue de 100ns para relajar la RT y dejarla preparada para ya luego hacer la dinámica molecular de 100ns, pero con el ADN incluido, las condiciones de minimización de las aguas, minimización del sistema, calentamiento, equilibrio de presión y equilibrio en general fueron las mismas para los dos casos.

Se realizó una fase de minimización en el sistema, con un enfoque particular en las moléculas de agua. Durante este proceso, se impuso una restricción de 100 kcal/mol-Å² en el soluto. La minimización se llevó a cabo a lo largo de 50,000 ciclos, con un enfoque escalonado. Los primeros 1,500 ciclos involucraron una minimización de descenso lineal (ncyc), tras lo cual se cambió al método de gradiente conjugado. Luego, se procedió a una minimización del

sistema en su conjunto, manteniendo el volumen constante, con una duración de 10,000 ciclos y un valor de τ_{cyc} de 1,000.

Tras completar la minimización de energía, se procedió a calentar gradualmente el sistema, aumentando la temperatura hasta alcanzar los 300 K a lo largo de 500 ps. Durante esta etapa, se mantuvo el soluto restringido con una fuerza de 2.0 kcal/mol-Å². Además, se llevó a cabo una etapa de equilibrio bajo condiciones de presión constante durante 500 ps en el último paso.

Posteriormente, se realizó una etapa de equilibrio adicional, extendiéndose a 1 ns de duración. En esta etapa, se aplicó un escalado de posición isotrópica como regulación de presión ($\tau_{p}=1$) y se utilizó la dinámica de Langevin ($\tau_{L}=3$) para controlar la escala de temperatura. Las restricciones de longitud de enlace SHAKE se aplicaron a enlaces que involucran átomos de hidrógeno ($\tau_{H}=2$). El tiempo de relajación de la presión se estableció en 2.0 ($\tau_{p} = 2.0$), y las interacciones de enlace que involucran átomos de hidrógeno se excluyeron de los parámetros de la función potencial ($\tau_{f} = 2$) bajo condiciones de presión constante.

Finalmente, para el análisis inicial, se llevó a cabo una simulación de producción de 100 ns. Es fundamental destacar que este proceso de minimización y equilibrio es esencial en las simulaciones de dinámica molecular, ya que garantizan que el sistema esté en un estado termodinámico adecuado para que las simulaciones posteriores sean representativas y proporcionen información científicamente válida sobre el comportamiento de las biomoléculas estudiadas. Es por esta razón, que se tomó la última estructura, la cual, se usó como modelo inicial para los demás estudios que se realizaron.

5.6. Cálculo de desviación media cuadrática del desplazamiento (RMSD) y fluctuación media cuadrática del desplazamiento (RMSF):

Para analizar las fluctuaciones estructurales de las dinámicas moleculares de cada RT con el dominio de unión al ADN del VIH-1 se emplearon dos métricas: la RMSD, y el RMSF. El RMSD se utilizó para detectar cambios en la estructura de la proteína en comparación con su estado inicial. Por otro lado, se calculó el RMSF para evaluar las fluctuaciones individuales de los residuos a lo largo de la simulación en relación con el estado inicial. Estos dos parámetros se calcularon usando la herramienta cpptraj del paquete de AmberTools.

Para este estudio se evaluó tanto la proteína como el ADN, con el fin de evaluar las variaciones que se tuvieron en la interacción.

5.7. Cálculo de la energía libre de unión a través de mecánica molecular - área de superficie basada en poisson-boltzmann (MM/PBSA):

Generada la simulación de dinámica molecular, se realizó el cálculo de la energía libre de unión para cada sistema proteína-ácido nucleico (DNA) utilizando el script MM/PBSA del paquete AmberTools. En este estudio, se tuvo en cuenta la contribución entrópica a partir de una aproximación cuasi-armónica ($\text{entropy} = 1$). Como método para calcular las energías libres de solvatación no polares se utilizó la opción que modela como un solo término linealmente proporcional al área de la superficie accesible del solvente ($\text{inp} = 1$), para la configuración de los radios atómicos se utilizó los radios presentes en el archivo de topología ($\text{radiopt} = 0$) y para generar la contribución de las energías de cada residuo por separado se realizó la descomposición por residuo en el resultado del cálculo MM/PBSA, configurando la opción decomp general con $\text{idecomp} = 1$. Para realizar el cálculo se tomaron los últimos 2 ns de la producción.

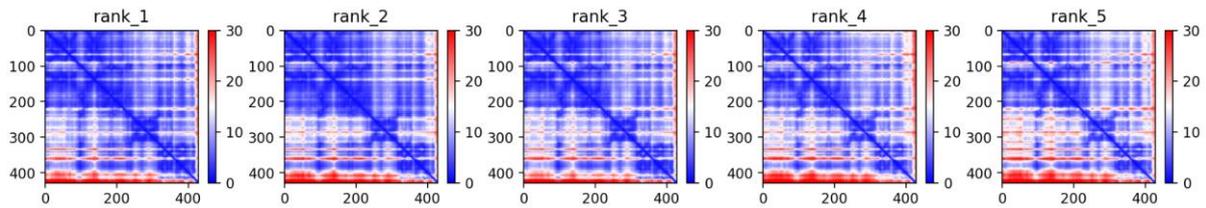
5.8. Cálculo de interacciones.

Para evaluar los tipos de interacciones que se generaron entre los residuos de las proteínas RT y el DNA del VHI-1 a lo largo de la simulación de dinámica molecular, se empleó la librería de python Prolif. Para las interacciones producidas, se consideró toda la simulación tomando intervalos de 10 en 10 frames, hasta analizar los 10000 frames totales (10 ns), se evaluaron a exclusivamente aquellas interacciones que se presentaron por más del 30% de la simulación.

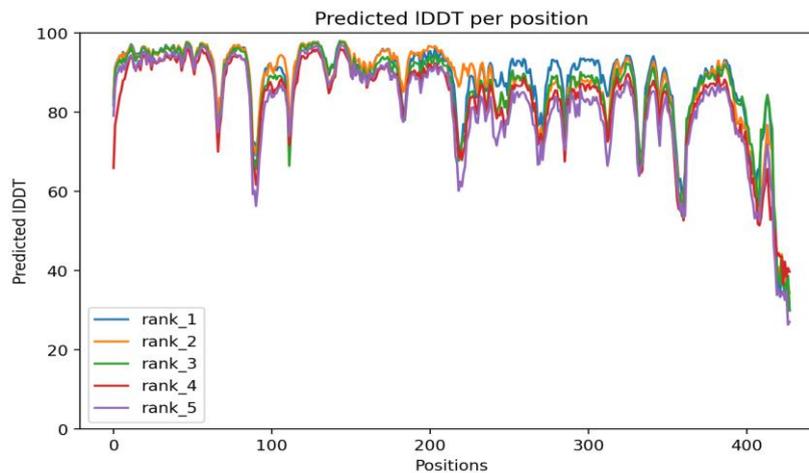
6. RESULTADOS

6.1. Modelado de la proteína con Mutantes

Debido a que el programa Alphafold2 generó cinco posibles estructuras de la RT mutante, se seleccionó el candidato más prometedor utilizando los valores de pLDDT y el PAE. En el gráfico 1, se observan los perfiles de PAE para cada uno de los cinco candidatos generados por AlphaFold2. El color azul indicando un valor de PAE cercano a cero, propone una alineación precisa, mientras que el color rojo indica una menor precisión. Por otro lado, en el gráfico 2, se representa el pLDDT para los mismos cinco candidatos generados por AlphaFold2. El pLDDT es una medida de confianza que evalúa la calidad de la predicción del pliegue estructural. Valores más altos de pLDDT indican una mayor confianza en la precisión de la predicción del pliegue. Con respecto a lo anterior, la estructura elegida fue el candidato número 1, el cual, ocupó el primer lugar en el ranking. Esto se debe a que, en la gráfica 2, se presenta mejores valores de pLDDT por residuo que el resto de los candidatos, específicamente una mejor conformación entre los residuos 250 y 310, esto siendo apoyado por el gráfico de PAE, en el cual se aprecia un mejor patrón de una alineación precisa de la estructura proteica.



Gráfica 1: Gráficos de PAE para los cinco candidatos generados por AlphaFold2. El eje X representa la puntuación de cada residuo, mientras que el eje Y muestra los residuos muestreados. Se utiliza una escala de colores, donde el azul indica una resolución adecuada de la estructura y el rojo indica una resolución inadecuada. (Elaborado por los autores).



Gráfica 2: Gráfico de pLDDT para los cinco candidatos generados por AlphaFold2. El eje X muestra la posición de los residuos, mientras que el eje Y muestra los valores de pLDDT. (Elaborado por los autores).

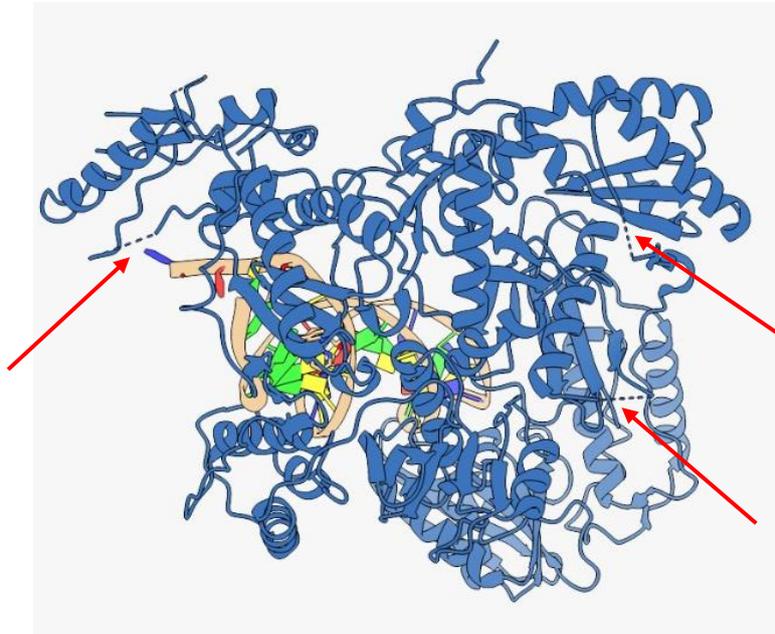


Figura 1: Se evidencian los Gaps en la proteína cristal que se extrajo del PDB, el cual, corresponde al código 7Z29. (Elaborado por los autores).

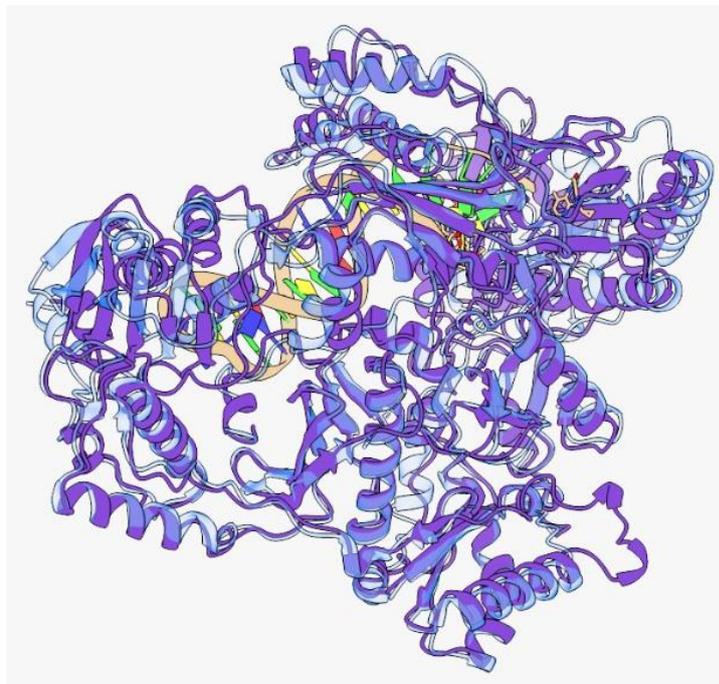


Figura 2: Comparación estructural entre el modelo de la proteína RT mutante generado por AlphaFold2 y la estructura cristalizada con el código 7Z29 en el PDB. (Elaborado por los autores).

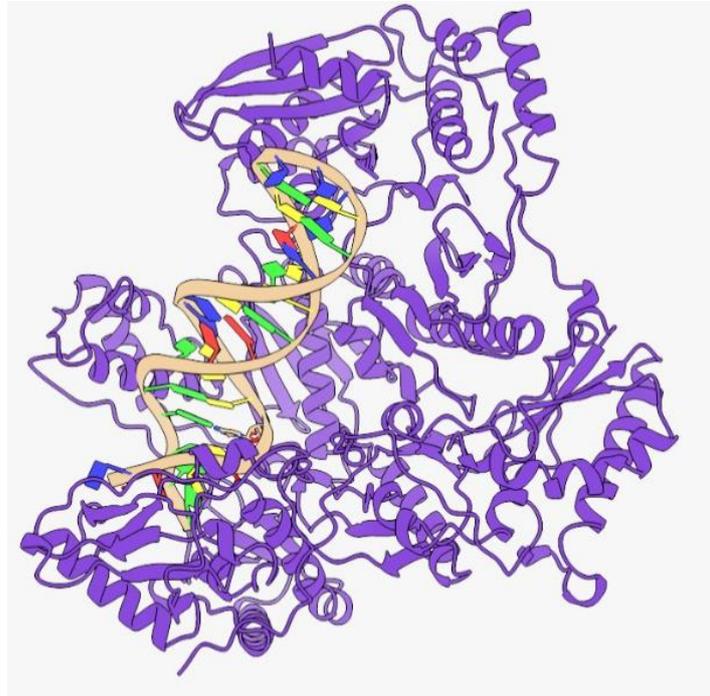
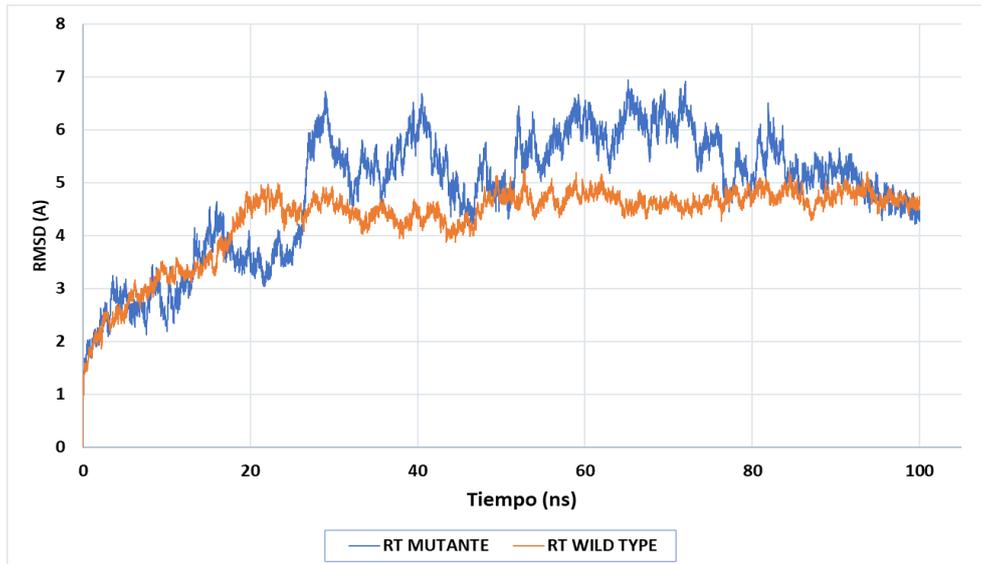


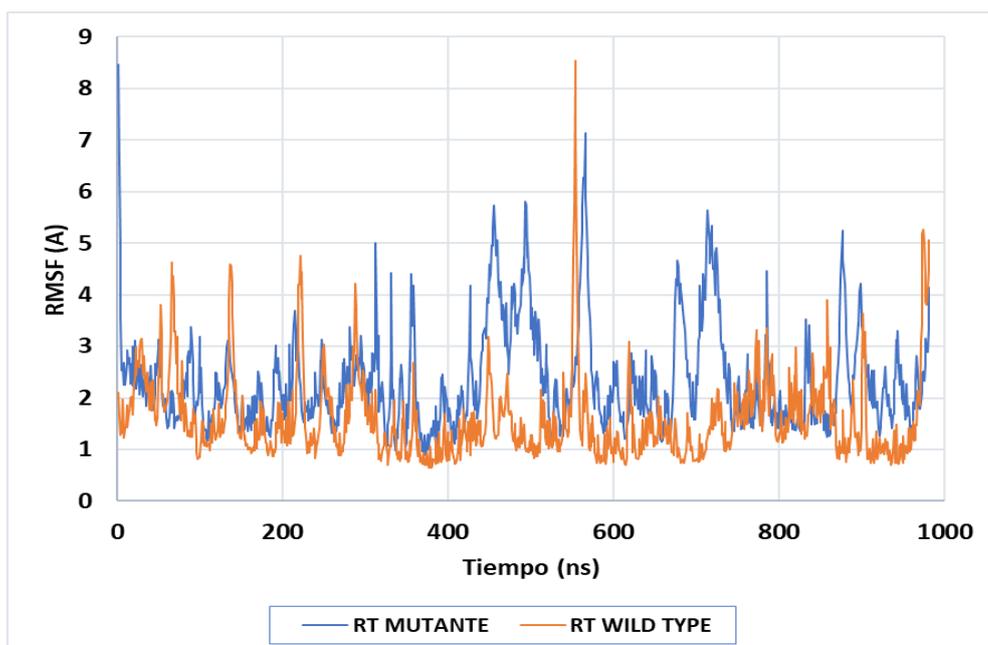
Figura 3: Proteína modela por Alphafold 2 sin Gaps, con gran porcentaje de similitud con la proteína cristal (7Z29) (Elaborado por los autores).

6.2. Cálculo de desviación media cuadrática del desplazamiento (RMSD) y fluctuación media cuadrática del desplazamiento (RMSF):

A partir de la simulación de la dinámica molecular se generaron los cálculos de RMSD y RMSF para cada uno de los complejos RT WT-DNA, RT mutante-DNA, esto con el fin de reconocer las fluctuaciones estructurales que se generaron.



Grafica 3: Gráfica de la Desviación Cuadrática Media (RMSD) de los resultados de la dinámica molecular para la RT mutante con DNA y WT con DNA. El eje X representa el tiempo de la dinámica molecular en ns, mientras que el eje Y muestra la magnitud de la RMSD en Å. (Elaborado por los autores).



Grafica 4: Se puede observar la comparación de la fluctuación media cuadrática del desplazamiento (RMSF) obtenido a partir de los resultados de la dinámica molecular para la

RT mutante con DNA y la WT con DNA. En el eje X se representan los residuos tanto de la proteína como del ácido nucleico, mientras que en el eje Y se muestra la magnitud de la RMSF en Å. (Elaborado por los autores).

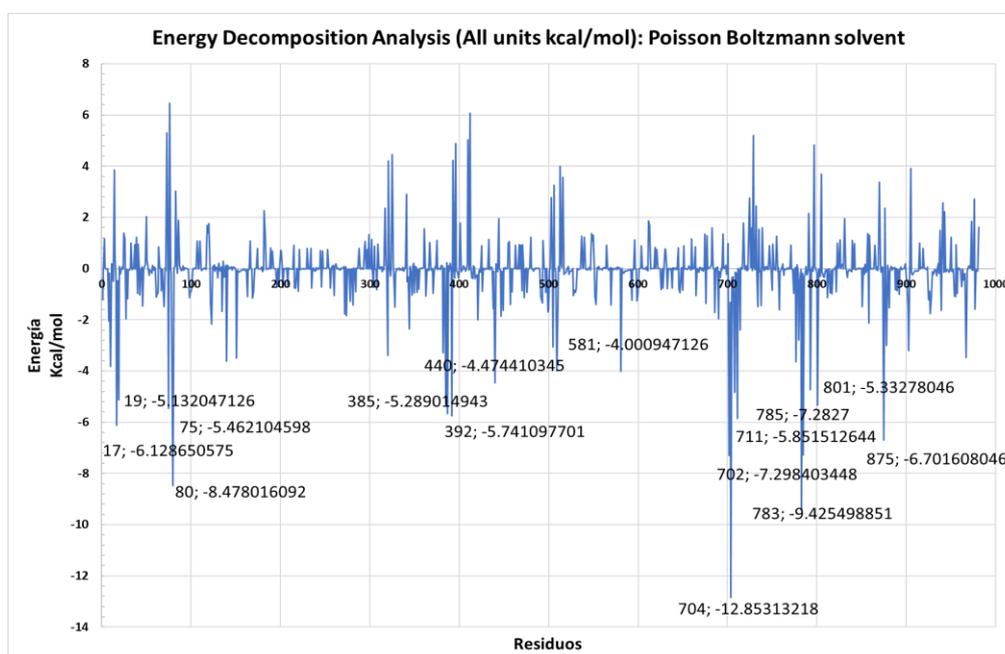
6.3. Cálculo de la energía libre de unión a través de mecánica molecular - área de superficie basada en poisson-boltzmann (MM/PBSA):

Para identificar las energías de interacción del complejo RT mutante-DNA durante la simulación de dinámica molecular, se realizó un cálculo de MMPBSA. Un valor negativo indica que la unión es energéticamente favorable y que el complejo es más estable que los componentes individuales. Como resultado de estas evaluaciones, se obtuvieron valores favorables a la energía libre de unión, como se detalla en la Tabla 1.

Energía kcal/mol	Residuos favorables
-5.13204712643677	LYS 19
-6.12865057471263	LYS 17
-5.46210459770116	ARG 75
-8.47801609195402	ARG 80
-5.28901494252873	LYS 385
-5.74109770114943	LYS 392
-4.47441034482759	LYS 440
-4.00094712643677	LYS 581

-7.29840344827585	702 LYS
-12.853132183908	ARG 704
-5.85151264367815	ARG 711
-9.42549885057471	ARG 783
-7.28269999999999	ARG 785
-5.33278045977011	LYS 801
-6.70160804597701	ARG 875

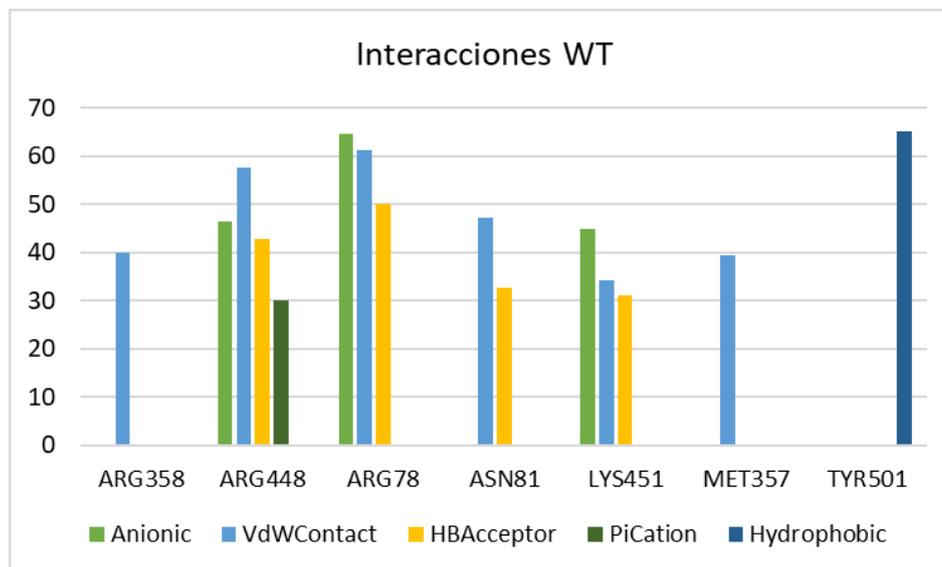
Tabla 1: Se muestran los valores de energía libre de unión para 15 residuos favorables, se tomaron en cuenta los valores que estaban por debajo a -4 Kcal/mol, debido a que los negativos indican interacciones de unión favorables entre la proteína y el DNA, por lo que, los residuos específicos que contribuyen de manera más significativa a la estabilidad y afinidad del complejo son los 15 que se pueden observar representados por su código. (Elaborado por los autores).



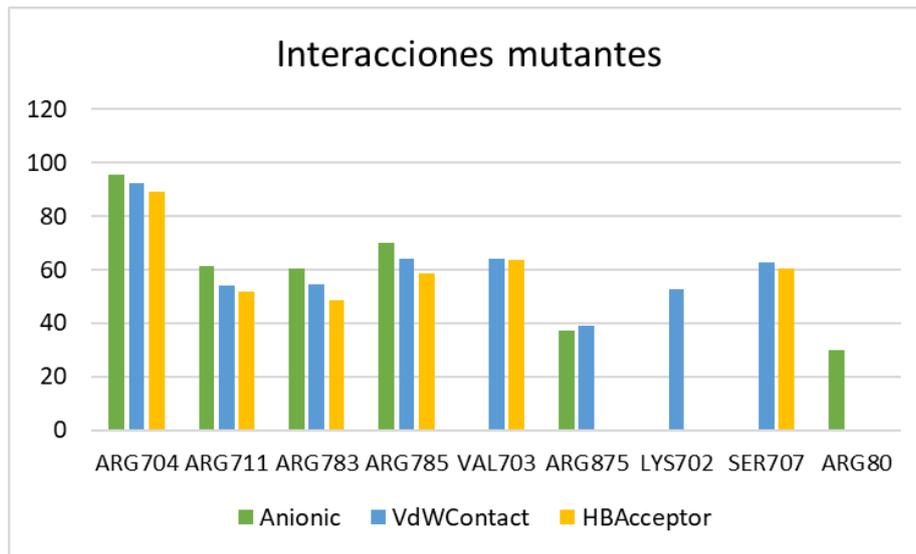
Grafica 5: Se observa los residuos de la proteína mutante, calculadas mediante el método de descomposición de energías MMPBSA, en el eje Y se muestran el valor de energía en Kcal/mol y en el eje X se evidencian los residuos de la proteína mutante (Elaborado por los autores).

6.4. Cálculo de las interacciones entre residuos para las RT WT y mutante

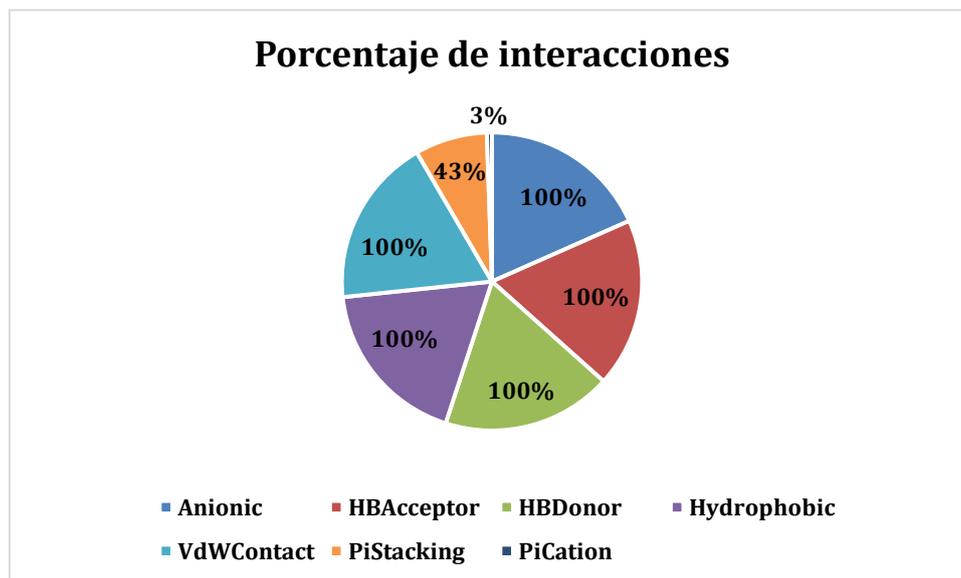
se logró identificar los tipos de interacción que surgieron entre los residuos a lo largo de todo el período de dinámica molecular. En total, se distinguieron 5 categorías de interacciones claramente definidas: aniónicas, hidrofóbicas, contactos de van der Waals, interacciones tipo pi-stacking y enlaces donadores y aceptores de puentes de hidrógeno.



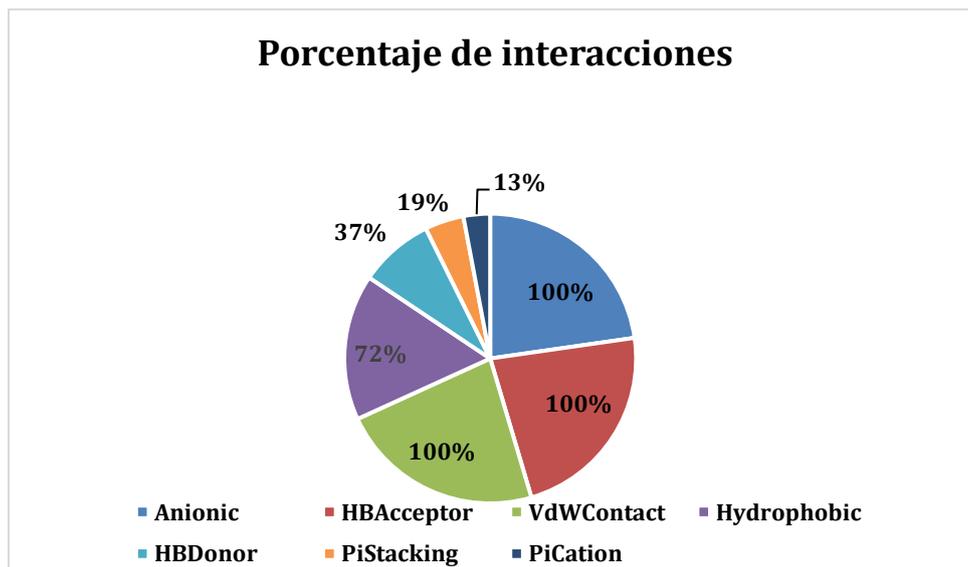
Grafica 6: Se observan los tipos de interacciones en los residuos que presentaron mayor interacción tomando intervalos de 10 en 10 frames, hasta analizar los 10000 frames totales, en la proteína RT WT. (Elaborado por los autores).



Gráfica 7: Se observan los tipos de interacciones en los residuos que presentaron mayor interacción tomando intervalos de 10 en 10 frames, hasta analizar los 10000 frames totales, en la proteína RT mutante. (Elaborado por los autores).



Gráfica 8: Se observan los tipos de interacciones medidos en porcentaje que se presentaron en la dinámica de la RT WT, las interacciones que fueron más frecuentes como se puede visualizar en la gráfica fue la aniónica, la de VdwContact y la HBAcceptor, Hydrophobic, HBDonor. (Elaborado por los autores).



Grafica 9: Se observan los tipos de interacciones medidos en porcentaje que se presentaron en la dinámica de la RT mutante, las interacciones que fueron más frecuentes como se puede visualizar en la gráfica fue la aniónica, la de VdwContact y la HBAcceptor. (Elaborado por los autores).

7. DISCUSIÓN

En esta tesis se han utilizado programas de modelado y sistemas que permitieron realizar la dinámica molecular para poder determinar las interacciones entre las proteínas RT mutante y WT del VIH-1, el DNA molde y su impacto en la resistencia a los antirretrovirales, así como también, el establecimiento de los aminoácidos implicados en la estabilidad del complejo RT DNA. Esta capacidad de análisis dinámico es respaldada por varios estudios. Por ejemplo, (Aat et al. 2018), destacan cómo la dinámica molecular ha sido ampliamente utilizada en el diseño de fármacos, permitiendo evaluar la estabilidad y la conformación de los complejos ligando-proteína.

La referencia a los estándares de calidad en AlphaFold Protein Structure Database (APSD), como los valores de pLDDT y PAE, es fundamental. Estos criterios aseguran la

confiabilidad de las estructuras predichas. Un valor pLDDT por debajo de 50 se asocia con baja calidad y escasa fidelidad, mientras que valores altos de PAE indican predicciones incorrectas en la posición de los residuos (Varadi et al., 2021). Esta validación es crucial para garantizar la utilidad de las estructuras generadas por AlphaFold2 en investigaciones posteriores.

En el gráfico 1 y 2 se pudo observar que, todas las estructuras candidatas no presentaban valores favorables según lo establecido para los valores de pLDDT y PAE, por lo que, se utilizó el programa chimeraX para poder hacer una comparación de la estructura predicha del cristal con el código 7Z29. Después de realizar el modelado molecular de una proteína usando AlphaFold2, es necesario comparar su similitud en ChimeraX (figura 3), debido a que, a pesar de que AlphaFold2 proporciona predicciones altamente precisas, todavía es importante validar estas predicciones y evaluar su similitud con las estructuras experimentales (Figura 4).

Por otro lado, El análisis de RMSD permite identificar y cuantificar los cambios estructurales causados por las mutaciones en proteínas. Estos cambios pueden afectar la estabilidad de la proteína, su capacidad de unión o su diversidad biológica. Por lo tanto, el RMSD, es fundamental para entender cómo las mutaciones en proteínas pueden influir en su estructura y función. Las mutaciones, como la E138K y la M184I en la RT del VIH-1, condujeron a cambios en la secuencia de aminoácidos. La comparación de RMSD de la RT mutante con la RT WT, que se puede observar en la gráfica 3, revela cómo las mutaciones en posiciones específicas pueden afectar la estructura y la función de la proteína a lo largo del tiempo.

Las mutaciones en los genes pueden conducir a cambios en la secuencia de aminoácidos de una proteína, lo que, a su vez, puede afectar su plegamiento, estabilidad e interacciones con otras moléculas. Asimismo, se pueden visualizar las diferencias en la estructura de las proteínas

mutadas en comparación con las proteínas sin mutantes, lo que sugiere que estas mutaciones pueden influir en la diversidad estructural de la proteína y, por lo tanto, en la respuesta a la resistencia a los antirretrovirales.

El RMSF es una medida que cuantifica la variabilidad o fluctuación de las posiciones de los átomos en una proteína a lo largo de una simulación dinámica o un conjunto de estructuras conformacionales. Un valor alto de RMSF indica que los átomos en la proteína mutante tienen una mayor amplitud de movimiento en comparación con la proteína WT.

En un estudio realizado por (Bhakat et al., 2014) “An integrated molecular dynamic, principal component analysis and residue interaction network approach reveals the impact of M184V mutation on HIV reverse transcriptase resistance to lamivudine. Molecular BioSystems” se evaluó la flexibilidad de las proteínas utilizando simulaciones moleculares, se encontró que las proteínas mutantes tienen una mayor flexibilidad en comparación con las proteínas WT. Esto se debe a que las mutaciones pueden introducir cambios en la red de interacciones y en la estabilidad de la estructura, lo que permite una mayor libertad de movimiento de los átomos en la proteína mutante. Por lo tanto, los valores más altos de RMSF en la proteína mutante en comparación con la proteína WT, como se puede observar en la gráfica 4, muestra que hay mayor flexibilidad en la mutante, por lo que, puede tener implicaciones para la función y la actividad de la proteína, es por esta razón, que es importante comprender las diferencias en RMSF entre proteínas mutantes y de tipo salvaje para poder ayudar a dilucidar las consecuencias estructurales y funcionales de las mutaciones.

En otros estudios, tales como “Single Active Site Mutation Causes Serious Resistance of HIV Reverse Transcriptase to Lamivudine: Insight from Multiple Molecular Dynamics Simulations” (Moonsamy et al., 2016), también se descubrió que la mutación M184I afecta la dinámica general de algunas regiones distales de aminoácidos debido a que, algunos residuos exhiben mayores fluctuaciones, mientras que los residuos de la proteína WT mostraban menos

fluctuaciones y por ende, era más estable que la mutante, asimismo, se evaluaron los cálculos de energía libre de unión a través de mecánica molecular - área de superficie basada en poisson-boltzmann (MM/PBSA) que tenía la proteína WT en comparación con la mutante, en donde se evidencio, que los componentes de energía libre que se muestran, sugieren que la mayoría de las contribuciones favorables observadas del resultado de la mutación podría provocar una pérdida de eficacia en el fármaco.

La contribución de cada residuo a la energía libre proporciona información sobre los residuos específicos que contribuyen de manera más significativa a la estabilidad y afinidad del complejo (Bignon et al., 2023). Los valores de energía de afinidad obtenidos para los complejos RTmutante-DNA del VIH-1 de este estudio se presentan en la Tabla 1, se tomaron en cuenta los valores que estaban por debajo a -4 kcal/mol, debido a que los negativos indican interacciones de unión favorables entre la proteína y el DNA, por lo que, los residuos específicos que contribuyen de manera más significativa a la estabilidad y afinidad del complejo son los 15 que se pueden observar en la gráfica 5.

De esta manera, se pueden generar ciertas premisas a partir de la (Gráfica 7), donde se muestran los residuos que presentaron mayor interacción en la RT mutante, entre estos se destacan, ARG704, ARG711, ARG783, ARG785, VAL703, ARG875, LYS702, SER707, ARG80, la mayoría de estos residuos han tenido también un valor favorable de energía libre de unión, sin embargo, a pesar de que no se observaron altos porcentajes de interacción en los sitios de posición en donde se encuentran las mutantes, estudios anteriores han validado que las mutaciones de la RT afectan a la proteína.

Con respecto a los resultados mostrados en la (Gráfica 6), en donde se observa la interacción de los residuos de la RT WT, reveló interacciones en los residuos ARG358, ARG448, ARG78, ASN81, LYS451, MET357 y TYR501. Teniendo en cuenta estos residuos de la proteína WT con los residuos de la proteína mutante, se puede evidenciar que

interaccionaron diferentes residuos en cada proteína, esta diferencia sugiere que las mutaciones presentes en la RT mutante pueden influir en la naturaleza y la intensidad de estas interacciones.

Las implicaciones biológicas de los aminoácidos arginina, asparagina, lisina, metionina y tirosina en las proteínas RT mutantes y WT se pueden entender examinando sus propiedades específicas, debido a que, pueden tener diferentes efectos sobre la estructura y función de la proteína.

La arginina, como aminoácido básico, puede participar en interacciones iónicas y enlaces de hidrógeno, afectando potencialmente la estabilidad de la proteína y las interacciones con otras moléculas (Arion et al., 1998), por lo que desempeña un papel importante en las interacciones proteína-proteína, la unión al ADN y la catálisis enzimática (Roy y Linial, 2007). En las proteínas RT mutante y WT, la presencia de arginina puede contribuir a su capacidad de interactuar con otras proteínas o ácidos nucleicos, afectando potencialmente su función y estabilidad. La asparagina, al ser un aminoácido polar alifático, puede contribuir a la solubilidad de la proteína y las capacidades de unión al hidrógeno (Operario et al., 2006). A menudo se encuentra en sitios activos de las proteínas y están involucradas en el plegamiento y la estabilidad de estas (Roy y Linial, 2007).

La lisina, también puede participar en interacciones iónicas y enlaces de hidrógeno, lo que podría influir en la estabilidad e interacciones de la proteína (Arion et al., 1998), además, también está involucrada en interacciones proteína-proteína, unión al ADN y modificaciones postraduccionales como la acetilación y la metilación (Roy y Linial, 2007). En las proteínas RT mutante y WT, la lisina puede desempeñar un papel en la estabilidad, las interacciones y la regulación de las proteínas a través de modificaciones postraduccionales. La metionina y la tirosina, al ser aminoácidos hidrofóbicos, pueden contribuir al plegamiento y la estabilidad de la proteína al participar en interacciones hidrofóbicas (Dunn et al., 2013). Estos aminoácidos

pueden influir en la estabilidad, solubilidad, plegamiento e interacciones de la proteína con otras moléculas.

Por otro lado, se puede evidenciar que tipos de interacciones se realizaban en los aminoácidos, entre esas estaban las interacciones hidrofóbicas, contactos de van der Waals, interacciones tipo pi-stacking y enlaces donadores y aceptores de puentes de hidrógeno (Gráfica 8 y 9).

La mayor presencia de interacciones en la RT mutante fueron la Aniónica, contactos de van der Waals, y enlaces donadores y aceptores de puentes de hidrógeno, estos tipos de interacciones podrían estar relacionadas con su capacidad para adquirir resistencia a los medicamentos. Estas interacciones pueden fortalecer la estabilidad de la proteína o influir en su capacidad para unirse a inhibidores de la transcriptasa inversa, lo que podría conferir una ventaja a la mutante en términos de resistencia a los tratamientos antirretrovirales, en contraste, la RT WT, al no mostrar estas mismas interacciones en la misma medida, podría ser más susceptible a la inhibición por los medicamentos, lo que podría explicar su falta de resistencia.

Varios estudios han abordado este tema y han proporcionado información sobre cómo las mutaciones en la RT pueden afectar la función y la interacción con los inhibidores de la transcriptasa inversa, tales como “Quantum Chemical Study of Molecular Recognition between Etravirine/Rilpivirine and the HIV-1 Reverse Transcriptase del autor Alqahtani et al. (2017). Esto sugiere que los residuos podrían desempeñar un papel importante en la interacción proteína-ADN y posiblemente contribuir a la replicación viral y la resistencia a los medicamentos.

Teniendo en cuenta los resultados de otros estudios, se puede validar que posiblemente los residuos de las proteínas pueden interactuar entre sí y tener un efecto sinérgico en la replicación viral y a la resistencia a los medicamentos, sin embargo, la dinámica que se realizó en este estudio tuvo un tiempo corto, por ende, se recomienda ampliar el tiempo de cálculo en

la simulación de dinámica molecular, ya que esto permitiría explorar con mayor profundidad posibles cambios conformacionales adicionales en el sistema estudiado. La extensión de este tiempo de simulación brindaría una oportunidad valiosa para identificar y comprender de manera exhaustiva las diferentes conformaciones que podrían ser relevantes en el contexto de la investigación.

8. CONCLUSIÓN

En este estudio nos basamos en una amplia gama de enfoques bioinformáticos para proporcionar una visión de las interacciones entre las proteínas transcriptasa inversa (RT) mutante y de tipo salvaje junto con el DNA del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH) a través de dinámica molecular. Se utilizaron cálculos de energía libre de unión, Cálculo de desviación media cuadrática del desplazamiento (RMSD) y fluctuación media cuadrática del desplazamiento (RMSF) y Cálculo de interacciones, esto nos llevó a varios hallazgos que pueden explicar el impacto de estas mutaciones, debido a que, se pudo observar que los residuos de las mutaciones en comparación con la RT de tipo salvaje (WT) muestran que hubo un mayor número de interacción, por lo que, estos residuos podrían desempeñar un papel importante en la interacción proteína-ADN y posiblemente contribuir a la replicación viral y la resistencia a los medicamentos. Los hallazgos de este informe pueden proporcionar marcadores potenciales para un mayor diseño de nuevos inhibidores que sean menos susceptibles a la resistencia a los medicamentos. La combinación de los enfoques teóricos y experimentales proporcionaría una base sólida para validar y respaldar los resultados obtenidos, fortaleciendo así la confianza en las conclusiones de la investigación.

9. Referencias

1. Aat, N., Mohammad, T., Hasan, G. M., & Hassan, M. I. (2018). Advancements in docking and molecular dynamics simulations towards ligand-receptor interactions and structure-function relationships. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 18(20), 1755-1768. <https://doi.org/10.2174/1568026618666181025114157>
2. Alave, J., Paz, J., González, E., Campos, M., Rodríguez, M., Willig, J., & Echevarría, J. (2013). Factores asociados a falla virológica en pacientes infectados con VIH que reciben terapia anti-retroviral en un hospital público del Perú. *Revista Chilena de Infectología*, 30(1), 42–48. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182013000100006>
3. Alqahtani, S., Yang, H., & Hu, X. (2017). Quantum chemical study of molecular recognition between etravirine/rilpivirine and the HIV-1 reverse transcriptase. *Madridge Journal of Novel Drug Research*, 1(1), 25-34. <https://doi.org/10.18689/mjndr-1000105>
4. Amblard, F., Patel, D., Michailidis, E., Coats, S. J., Kasthuri, M., Biteau, N., Tber, Z., Ehteshami, M., & Schinazi, R. F. (2022). HIV nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 240, 114554.
5. Arion, D., Kaushik, N., McCormick, S., Borkow, G., & Parniak, M. (1998). Phenotypic mechanism of hiv-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (azt): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. *Biochemistry*, 37(45), 15908-15917. <https://doi.org/10.1021/bi981200e>
6. Bertoline, L. M. F., Lima, A. N., Krieger, J. E., & Teixeira, S. K. (2023). Before and After AlphaFold2: An Overview of protein Structure Prediction. *Frontiers in bioinformatics*, 3. <https://doi.org/10.3389/fbinf.2023.1120370>
7. Bignon, E., Grandemange, S., Dumont, E., & Monari, A. (2023). How SARS-CoV-2 Alters the Regulation of Gene Expression in Infected Cells. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 14(13), 3199–3207. https://doi.org/10.1021/ACS.JPCLETT.3C00582/SUPPL_FILE/JZ3C00582_SI_001.PDF
8. Bhakat, S., Martin, A. J. M., & Soliman, M. E. S. (2014). An integrated molecular dynamic, principal component analysis and residue interaction network approach reveals the impact of M184V mutation on HIV reverse transcriptase resistance to lamivudine. *Molecular BioSystems*, 10(8), 2215–2228. <https://doi.org/10.1039/C4MB00253A>

9. Cilento, M. E., Kirby, K. A., & Sarafianos, S. G. (2021). Avoiding drug resistance in HIV reverse transcriptase. *Chemical reviews*, 121(6), 3271-3296.
10. Das, K., & Arnold, E. (2013). HIV-1 reverse transcriptase and antiviral drug resistance. Part 1. *Current Opinion in Virology*, 3(2), 111–118. <https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2013.03.012>
11. Dunn, L., Boyer, P., Clark, P., & Hughes, S. (2013). Mutations in hiv-1 reverse transcriptase cause misfolding and miscleavage by the viral protease. *Virology*, 444(1-2), 241-249. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.06.017>
12. Grande, T. M. (2008). Determinantes moleculares implicados en la resistencia a análogos a timidina y en la fidelidad de copia de la retrotranscriptasa del virus de la inmunodeficiencia humana tipo (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Madrid).
13. Global HIV & AIDS statistics — Fact sheet | UNAIDS. (n.d.). Retrieved October 22, 2023, from <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
14. Goeta, B. (2002). Bioinformatics-sequence and genome analysis. *Briefings in Bioinformatics*, 3(1), 101-103. <https://doi.org/10.1093/bib/3.1.101>
15. Herschhorn, A., & Hizi, A. (2010). Retroviral reverse transcriptases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2010 67:16, 67(16), 2717–2747. <https://doi.org/10.1007/S00018-010-0346-2>
16. *HIV – Number of people (all ages) living with HIV*. (n.d.). Retrieved October 27, 2023, from <https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/estimated-number-of-people--living-with-hiv>
17. Iliina, T., LaBarge, K., Sarafianos, S. G., Ishima, R., & Parniak, M. A. (2012). Inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase—Associated Ribonuclease H Activity. *Biology* 2012, Vol. 1, Pages 521-541, 1(3), 521–541. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY1030521>
18. Kasaraneni, N., Leibowitz, J., & Berghman, L. R. (2017). Vector Engineering for Cell and Gene Therapy. <https://oaktrust.library.tamu.edu/handle/1969.1/165854>
19. Machado, J. E., & Alzate, J. A. (2008). Patterns of antiretroviral drug prescription in 997 Colombian patients. *Biomédica*, 28(1), 78-86.
20. Martínez Del Río, J., & Menéndez Arias, L. (n.d.). La actividad RNasa H de la retrotranscriptasa del VIH como diana terapéutica. 9, 202009–2020.

21. Matamoros, T., Barrioluengo, V., Abia, D., & Menéndez-Arias, L. (2013). Major groove binding track residues of the connection subdomain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase enhance cDNA synthesis at high temperatures. *Biochemistry*, 52(51), 9318–9328.
22. Menéndez-Arias, L. (2010). Molecular basis of human immunodeficiency virus drug resistance: an update. *Antiviral Research*, 85(1), 210–231.
23. Menzies, N. A., Berruti, A. A., Berzon, R., Filler, S., Ferris, R., Ellerbrock, T. V., & Blandford, J. M. (2011). The Cost of Providing Comprehensive HIV Treatment in PEPFAR-Supported Programs. *AIDS (London, England)*, 25(14), 1753. <https://doi.org/10.1097/QAD.0B013E3283463EEC>
24. Montana, J. F., Ferreira, G. R. O. N., Cunha, C. L. F., de Queiroz, A. A. R., Fernandes, W. A. A., Polaro, S. H. I., Gonçalves, L. H. T., Couto, D. C. C., Gir, E., Reis, R. K., Sorensen, W., & Botelho, E. P. (2021). The HIV epidemic in Colombia: spatial and temporal trends analysis. *BMC Public Health*, 21(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12889-021-10196-Y/FIGURES/4>
25. Moonsamy, S., Bhakat, S., Walker, R. C., & Soliman, M. E. S. (2016). Single Active Site Mutation Causes Serious Resistance of HIV Reverse Transcriptase to Lamivudine: Insight from Multiple Molecular Dynamics Simulations. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 74(1), 35–48. <https://doi.org/10.1007/S12013-015-0709-2/METRICS>
26. Operario, D., Balakrishnan, M., Bambara, R., & Kim, B. (2006). Reduced dntp interaction of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase promotes strand transfer. *Journal of Biological Chemistry*, 281(43), 32113-32121. <https://doi.org/10.1074/jbc.m604665200>
27. Ramírez Silva, L. H., & Vilchis Landeros, M. M. (2021). Aplicaciones de simulaciones de dinámica molecular en proteínas
28. Rezende, L., Curr, K., Ueno, T., Mitsuya, H., & Prasad, V. (1998). The impact of multidideoxynucleoside resistance-conferring mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase on polymerase fidelity and error specificity. *Journal of Virology*, 72(4), 2890-2895. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.4.2890-2895.1998>
29. Roy, J. and Linial, M. (2007). Role of the foamy virus pol cleavage site in viral replication. *Journal of Virology*, 81(10), 4956-4962. <https://doi.org/10.1128/jvi.00104-07>
30. Santoro, M. M., Perno, C. F., Daines, D. A., & Kingsley, D. H. (2013). HIV-1 Genetic Variability and Clinical Implications. 2013, 20. <https://doi.org/10.1155/2013/481314>

31. Tian, X., Chen, J., Wang, X., Xie, Y., Zhang, X., Han, D., Fu, H., Yin, W., & Wu, N. (2023). Global, regional, and national HIV/AIDS disease burden levels and trends in 1990–2019: A systematic analysis for the global burden of disease 2019 study. *Frontiers in Public Health*, 11. <https://doi.org/10.3389/FPUBH.2023.1068664/FULL>
32. Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D. Y., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Židek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., . . . Velankar, S. (2021). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D439-D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
33. Warren, K., Warrilow, D., Meredith, L., & Harrich, D. (2009). Reverse Transcriptase and Cellular Factors: Regulators of HIV-1 Reverse Transcription. *Viruses*, 1, 873–894. <https://doi.org/10.3390/v1030873>
34. Waterman, M. (1998). Introduction to computational biology: maps, sequences, and genomes. *Biometrics*, 54(1), 398. <https://doi.org/10.2307/2534039>.