



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS  
MOLECULAR**

**Identificación de inhibidores de la replicación de DENV-2  
mediante acoplamiento molecular de fármacos  
aprobados por la FDA, dirigidos contra la proteasa NS3**

**TESIS**

Que presenta:

**LILIANA GONZÁLEZ SIERRA**

Para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS  
MOLECULAR**

Directora de Tesis:

**DRA. ROSA MARÍA DEL ÁNGEL NÚÑEZ DE CÁCERES**

## **CRÉDITOS A LAS INSTITUCIONES**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca brindada **No. 1002050** para la realización de este proyecto, el cuál fue realizado en el laboratorio 8 de Virología del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), bajo la tutoría de la Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres y la asesoría de la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano y el Dr. José Luis Rosales Encina; todos ellos profesores investigadores del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular.

### **Tutor:**

Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres

### **Asesores:**

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

Dr. José Luis Rosales Encina

*Dedicada a mis padres Luz y Adrián, los pilares de mi vida ❤️.*

## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco a Dios por acompañarme en cada paso que doy e iluminar mi mente. También por haber puesto en mi camino personas que han sido mi soporte y compañía durante este período.*

*Le doy gracias a mis padres Luz y Adrián, las personas más valiosas e importantes en mi vida, a quienes les debo todo, gracias por su apoyo incondicional y por ser mi mayor inspiración para conseguir todas mis metas. A pesar de la distancia son quienes procuran mi bienestar.*

*A mis hermanos Isabel y Adrián por su apoyo incondicional. A Nathita, mi mascota fiel, quien siempre me escucha y me acompaña. También me gustaría agradecer a mi familia en general porque siempre han confiado en mí.*

*Gracias a la Dra. Rosa María del Ángel, por darme la oportunidad de estar en su laboratorio, por su apoyo y por proporcionarme los recursos y herramientas necesarias para este proyecto.*

*Gracias a mis asesores, Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano y Dr. José Luis Rosales Encina, por el tiempo invertido en la revisión de este trabajo, por sus opiniones y sus correcciones para mejorar este escrito.*

*Gracias a las personas que conforman el laboratorio 8, por su apoyo y consejos. En especial a Luis, Noe, Ari y Fernando por apoyarme en todo momento durante mi estancia en el laboratorio.*

*Agradezco a todos mis amigos sin excepción, ustedes son los seres de luz que se han cruzado en mi camino para darme fuerza en los peores momentos, se merecen lo mejor de la vida. Así como ustedes están orgullosos de mí, yo lo estoy de ustedes.*

*Por todo lo que significa concluir este trabajo, sinceramente mi mayor reconocimiento y gratitud para todos ustedes ❤️.*

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	11
<b>1.1 Generalidades de dengue</b> .....	11
<b>1.2 Diagnóstico y tratamiento</b> .....	12
<b>1.3 Biología de DENV</b> .....	12
1.3.1 Estructura .....	12
1.3.2 Ciclo viral .....	13
<b>1.4 Proteína NS3 de DENV</b> .....	15
1.4.1 Proteasa NS2B-NS3 de DENV .....	15
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	17
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	21
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	22
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	22
<b>VI. DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	23
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	23
<b>7.1 Análisis <i>in silico</i> de la proteína NS3</b> .....	23
7.1.1 Búsqueda y selección de fármacos.....	23
7.1.2 Estructura de las proteínas NS3 y NS5 de DENV 1-4 .....	24
7.1.3 Alineamiento de secuencias.....	24
7.1.4 Acoplamiento molecular focalizado y ciego de fármacos contra NS3 y NS5 de DENV (1-4).....	24
<b>7.2 Línea celular y cepa viral</b> .....	25
<b>7.3 Ensayo de viabilidad celular</b> .....	26
<b>7.4 Ensayo de rendimiento viral</b> .....	26
<b>7.5 Análisis estadístico</b> .....	27
<b>VIII. RESULTADOS</b> .....	29
<b>IX. DISCUSIÓN</b> .....	50
<b>X. CONCLUSIONES</b> .....	55
<b>XI. PERSPECTIVAS</b> .....	55
<b>REFERENCIAS</b> .....	56
<b>ANEXO</b> .....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo viral de DENV .....	14
Figura 2. Representación esquemática del genoma flaviviral, poliproteína y partición de dominio funcional a lo largo del gen NS2B-NS3.....	16
Figura 3. Predicción de la estructura terciaria de la proteína NS3 de DENV-2 cepa Tailandia.....	29
Figura 4. Validación del modelo 3D de NS3 de DENV-2.....	30
Figura 5. Alineamiento múltiple de las secuencias del dominio de proteasa de NS3 de diferentes virus del género <i>Flaviviridae</i> .....	31
Figura 6. Acoplamiento focalizado de los candidatos a inhibidores de la proteasa NS3 de DENV-2. ....	32
Figura 7. Interacciones entre los fármacos glibenclamida, irinotecán y simvastatina con NS3pro de DENV-2.....	34
Figura 8. Predicción de la estructura terciaria de la proteína NS3 de DENV-1 y DENV-3.	37
Figura 9. Validación del modelo 3D de NS3 de DENV-1 y DENV-3. ....	38
Figura 10. Predicción de la estructura terciaria de la proteína NS3 de DENV-4.....	39
Figura 11. Predicción de la estructura terciaria de la proteína NS5 de DENV-2 y DENV-3. ....	40
Figura 12. Predicción de la estructura terciaria de la proteína NS5 de DENV-1 y DENV-4. ....	41
Figura 13. Validación del modelo 3D de NS5 de DENV-1 y DENV-4. ....	42
Figura 14. Efecto de glibenclamida, irinotecán y simvastatina sobre la viabilidad celular en la línea Huh-7. ....	44
Figura 15. Efecto de glibenclamida, simvastatina e irinotecán sobre la progenie viral de DENV-2 en células Huh-7. ....	46
Figura 16. Efecto de glibenclamida, simvastatina e irinotecán sobre la progenie viral de DENV-2 en células Huh-7 en porcentaje.....	47
Figura 17. Concentración citotóxica ( $CC_{50}$ ), concentración inhibitoria ( $IC_{50}$ ) e índice de selectividad (IS) de glibenclamida, simvastatina e irinotecán en células Huh-7 infectadas con DENV-2.....	48

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estudios clínicos sobre la terapéutica del dengue .....	17
Tabla 2. Inhibidores de la proteasa NS3 viral de DENV .....	18
Tabla 4. Actividad farmacológica de glibenclamida, irinotecán y simvastatina .....	33
Tabla 5. Posibles usos terapéuticos para glibenclamida .....	35
Tabla 6. Posibles usos terapéuticos para simvastatina .....	35
Tabla 7. Acoplamiento focalizado de DENV-1, DENV-3 y DENV-4 .....	39
Tabla 8. Acoplamiento ciego para los cuatro serotipos de DENV.....	39
Tabla 9. Acoplamiento ciego de NS5 para los cuatro serotipos de DENV .....	43
Tabla 10. Índice de selectividad de glibenclamida y simvastatina .....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS

**CC<sub>50</sub>**: Concentración citotóxica  
**CL**: Concentraciones límites  
**DC**: Células dendríticas  
**DC-SIGN**: Molécula de adhesión de las células dendríticas  
**DENV**: Virus dengue  
**DMEM**: Medio avanzado de Eagle modificado de Dulbecco  
**DS**: Desviación estándar  
**ELISA**: Enzimoimmunoanálisis de adsorción  
**FDA**: Administración de Medicamentos y Alimentos  
**HMGCR**: Enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa  
**IC<sub>50</sub>**: Concentración inhibitoria media máxima  
**IS**: Índice de selectividad  
**JEV**: Virus de la encefalitis japonesa  
**MOI**: Multiplicidad de infección  
**MTasa**: Metiltransferasa  
**MTT**: Ensayo de reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol  
**NPC**: Complejo del poro nuclear  
**NS3pro**: Proteasa NS3  
**NTPasa**: Actividad de nucleósido 5'-trifosfatasa  
**PDB**: Protein Data Bank  
**PLIP**: Protein-Ligand Interaction Profiler  
**RC**: Complejo de replicación  
**RdRp**: ARN polimerasa dependiente de ARN  
**RE**: Retículo endoplásmico  
**RTPasa**: Actividad de ARN 5'-trifosfatasa  
**RT-PCR**: Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa  
**SBVS**: Virtual screening basado en estructuras  
**SFB**: Suero fetal bovino  
**SN-38**: 7-etil-10-hidroxicamptotecina  
**Sur1**: Receptor 1 de sulfonilurea  
**TGN**: Red trans-Golgi  
**UFF**: Unidades formadoras de focos  
**WNV**: Virus del Nilo Occidental  
**YFV**: Virus de la fiebre amarilla  
**ZIKV**: Virus Zika

## RESUMEN

Durante los últimos años, el dengue se ha convertido en una de las infecciones virales transmitidas por mosquitos que crecen más rápidamente en el mundo, y se estima que aproximadamente la mitad de la población mundial está en riesgo de contraer la infección. Actualmente, no existe un tratamiento específico contra la infección por el virus dengue (DENV); sin embargo, en los últimos años se han buscado inhibidores específicos de componentes virales, como la proteasa viral NS3, que se considera un excelente objetivo para el diseño de antivirales, debido a sus funciones cruciales en la replicación viral y en el procesamiento de la poliproteína. No obstante, el proceso de desarrollo de un nuevo fármaco es costoso y largo, por lo tanto, se ha optado por emplear otras estrategias, como utilizar fármacos ya autorizados por la FDA y evaluar si pudieran tener otro papel terapéutico.

En este estudio, se identificaron tres fármacos aprobados por la FDA mediante acoplamiento molecular, que es un método que permite encontrar nuevos candidatos a fármacos de forma más rápida y rentable. Los fármacos seleccionados corresponden a glibenclamida, irinotecán y simvastatina que presentaron una alta afinidad hacia el dominio de proteasa de la proteína NS3 de DENV-2. Los ensayos de MTT mostraron que ninguno de los tres fármacos reduce de manera significativa la viabilidad de las células Huh-7. Finalmente, para conocer su efecto durante la infección por DENV-2 se cuantificó la progenie viral mediante ensayos de focos. Particularmente, el tratamiento con glibenclamida y simvastatina mostro una reducción estadísticamente significativa de la progenie viral a partir de las concentraciones 5 y 1  $\mu\text{M}$  respectivamente; además, presentaron valores altos del índice de selectividad (24.13 y 134.05 respectivamente). Estos datos sugieren que ambos fármacos podrían ser candidatos potenciales para el tratamiento de la infección por DENV.

## ABSTRACT

In recent years, dengue has become one of the fastest growing mosquito-borne viral infections in the world, and it is estimated that approximately half of the world's population is at risk of contracting the infection. Currently, there is no specific treatment against dengue virus infection (DENV); However, in recent years, specific inhibitors of viral components have been sought, such as the viral NS3 protease, which is considered an excellent target for antiviral design, due to its crucial functions in viral replication and polyprotein processing. However, the process of developing a new drug is expensive and long, therefore, it has been chosen to use other strategies, such as drugs already authorized by the FDA, and to evaluate whether they may have another therapeutic role.

In this study, three FDA-approved drugs were identified using molecular docking, which is a method that allows finding new drug candidates more quickly and cost-effectively. The selected drugs correspond to glibenclamide, irinotecan and simvastatin that showed a high affinity towards the protease domain of the DENV-2 NS3 protein. The MTT trials showed that none of the three drugs significantly reduced the viability of Huh-7 cells. Finally, in order to know its effect during DENV-2 infection, the viral progeny was quantified by means of spot tests. In particular, treatment with glibenclamide and simvastatin showed a statistically significant reduction in viral progeny from concentrations of 5 and 1  $\mu$ M respectively; In addition, it presented high values of the selectivity index (24.13 and 134.05 respectively). These data suggested that both drugs could be potential candidates for the treatment of DENV infection.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Generalidades de dengue

En la actualidad, el dengue es una de las enfermedades tropicales desatendidas más importantes en el mundo. La expansión de poblaciones urbanas, el crecimiento del turismo, el comercio mundial, el calentamiento global y la escasez de programas de control de mosquitos han ocasionado un aumento en la distribución e incidencia de la infección por el virus del dengue (DENV), principalmente en los países en desarrollo y subdesarrollados, donde la red de vigilancia de las enfermedades infecciosas es limitada (Wilder-Smith et al., 2019). DENV, es el arbovirus más prevalente en el mundo y agrupa cuatro serotipos DENV 1-4 estrechamente relacionados, pero antigénicamente distintos, ya que solo el 60-75% de sus aminoácidos son conservados entre ellos. La infección por cualquiera de los cuatro serotipos da lugar a una variedad de manifestaciones clínicas, que determinan la gravedad y el curso de la misma (Barrows et al., 2018; Diamond & Pierson, 2015).

DENV, es transmitido por mosquitos hembras del género *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti* y en menor grado *Aedes albopictus* (Salles et al., 2018; Uno & Ross, 2018). Se estima que en el mundo 3600 millones de personas están en riesgo de infectarse, con una tasa de infección anual de 390 millones de nuevas infecciones y una mortalidad de 21,000 personas. Además, se calcula que 96 millones de pacientes serán sintomáticos, de los cuales 2 millones cursarán con dengue hemorrágico y síndrome de choque por dengue (Y.-W. Huang et al., 2018; Murugesan & Manoharan, 2020).

Respecto, a la clasificación de la enfermedad, la Organización Mundial de la Salud en el 2009 estableció que el dengue se clasifica clínicamente como dengue con o sin signos de alarma o dengue grave. Aunque la mayoría de las personas con infección por DENV permanecen asintomáticas o desarrollan solo síntomas muy leves, aproximadamente el 25% experimenta una enfermedad febril inespecífica que se caracteriza por fiebre y la presencia de otros dos o más síntomas, como dolor de cabeza, erupción cutánea, dolor ocular o retro-orbital y mialgia. Una

pequeña proporción de estos pacientes desarrollan complicaciones clínicamente relevantes como dengue grave cuando experimentan una o más de las siguientes condiciones: (1) extravasación de plasma que puede conducir a choque por dengue o acumulación de líquidos, con insuficiencia respiratoria, (2) hemorragia grave o (3) deterioro de órganos grave (Guzman et al., 2016; C.-Y. Lin et al., 2013).

## **1.2 Diagnóstico y tratamiento**

El diagnóstico clínico del dengue es complicado, debido a la similitud de los síntomas con otras enfermedades no relacionadas. Debido a esto, se requiere la confirmación por parte de pruebas de laboratorio.

Existen métodos serológicos y técnicas genómicas disponibles que permiten realizar el diagnóstico, entre ellos, se encuentran: el aislamiento del virus en cultivo celular, detección de ARN viral mediante la técnica de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en tiempo real, detección de antígenos virales como NS1 mediante ELISA o pruebas rápidas, detección de anticuerpos IgM e IgG e incluso detección combinada de antígeno / anticuerpo (Guzman et al., 2016; Murugesan & Manoharan, 2020; Tang & Ooi, 2012; Wilder-Smith et al., 2019).

Como no existe un tratamiento específico para el dengue, los pacientes reciben tratamientos de soporte, como el suministro de líquidos si hay signos de deshidratación, de suero si existe fuga plasmática y de analgésicos y antipiréticos, como paracetamol, para controlar algunos síntomas como la fiebre alta (Guzmán et al., 2016).

## **1.3 Biología de DENV**

### **1.3.1 Estructura**

DENV pertenece al género *Flavivirus* y a la familia *Flaviviridae*, que también incluye otros virus de importancia clínica como el virus de la fiebre amarilla (YFV), virus Zika (ZIKV), virus de la encefalitis japonesa (JEV) y el virus del Nilo Occidental (Nitsche

et al., 2014). El virión de DENV mide aproximadamente 50 nm de diámetro. Su genoma es una molécula de ARN monocatenario de sentido positivo que contiene un Cap de tipo I en su extremo 5' y carece de una cola de poli A (Barrows et al., 2018).

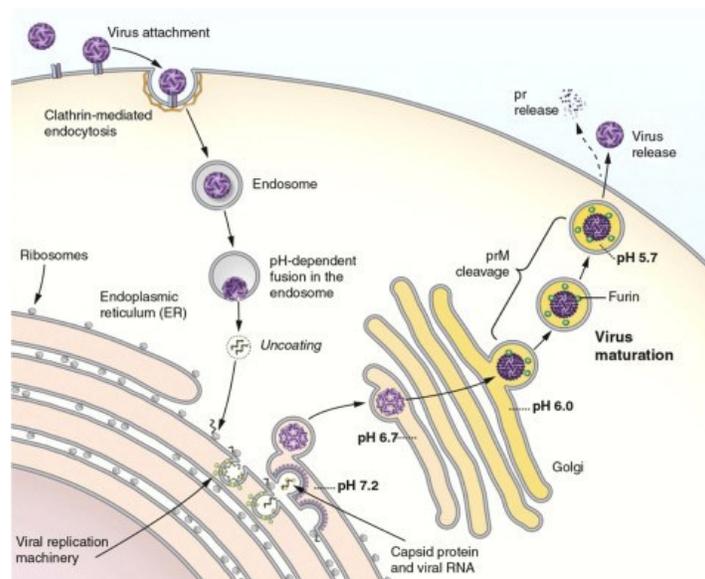
La longitud del ARN es de aproximadamente 11 kb y presenta un único marco de lectura abierto que codifica a una sola poliproteína que es procesada por la proteasa viral NS3 y proteasas celulares, para dar lugar a tres proteínas estructurales (Cápside (C), premembrana (prM) y la proteína de envoltura (E), que forman la partícula viral y siete proteínas no estructurales (NS) (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5) que participan en la replicación viral, el ensamblaje del virión y la evasión de la respuesta inmune del hospedero (Y.-W. Huang et al., 2018; Kuhn et al., 2002; Uno & Ross, 2018).

### **1.3.2 Ciclo viral**

El ciclo viral del DENV ocurre en dos hospederos, el humano y el mosquito; durante la infección en el humano, DENV tiene un tropismo celular variado, como las células dendríticas (DC), endoteliales, fibroblastos, queratinocitos, macrófagos, mastocitos y monocitos (Blight et al., 2019; Uno & Ross, 2018). No se ha identificado hasta el momento un receptor específico para DENV. Sin embargo, diversos estudios han reportado diferentes candidatos como receptores tanto en mamíferos como en el mosquito vector. En el caso particular de los mamíferos se encuentran como candidatos a los glicosaminoglicanos como el heparán sulfato y las lectinas, la molécula de adhesión de las células dendríticas (DC-SIGN), el receptor de manosa de macrófagos, el receptor de lipopolisacárido CD14 y proteínas inducidas por estrés, como las proteínas de choque térmico 70 y 90 y la chaperonina del retículo endoplásmico (RE) GRP78 (Cruz-Oliveira et al., 2015).

Una vez que la proteína E de DENV se une al receptor de la célula del hospedero el virus entra a través de endocitosis mediada por receptores y dependiente de clatrina. Después, de la internalización, el endosoma libera el ARN genómico viral debido al cambio conformacional que sufre la proteína E a consecuencia del pH bajo

de los endosomas, que induce la fusión de la membrana viral con la membrana endosomal. El ARN viral liberado al citoplasma al ser de sentido positivo, funciona directamente como un ARNm, que puede traducirse inmediatamente por la maquinaria celular en una poliproteína, que será escindida autocatalíticamente en proteínas estructurales y no estructurales mediante el reclutamiento de la proteasa NS2B / NS3 viral y proteasas del hospedero. La síntesis de las proteínas virales ocurre en el RE y muchas de ellas quedan insertas en la membrana de este organelo. Posteriormente, la replicación del ARN del genoma viral ocurre en los complejos de replicación (RCs) que contiene proteínas virales, ARN viral y factores de la célula hospedera. El ensamblaje del virus se lleva a cabo en la superficie del RE, cuando las proteínas estructurales y el ARN recién sintetizado geman en el lumen del RE. Las partículas virales y subvirales inmaduras, no infecciosas se transportan a través de la red trans-Golgi (TGN). Las partículas del virión inmaduro son escindidas por la proteasa furina del hospedero, dando como resultado partículas infecciosas maduras. Las partículas subvirales también son escindidas por furina. Los viriones maduros y las partículas subvirales se liberan posteriormente por exocitosis y pueden infectar otra célula del hospedero (Figura 1) (Y.-W. Huang et al., 2018; Kato & Hishiki, 2016; Mukhopadhyay et al., 2005; Uno & Ross, 2018).



**Figura 1. Ciclo viral de DENV** (Murugesan & Manoharan, 2020).

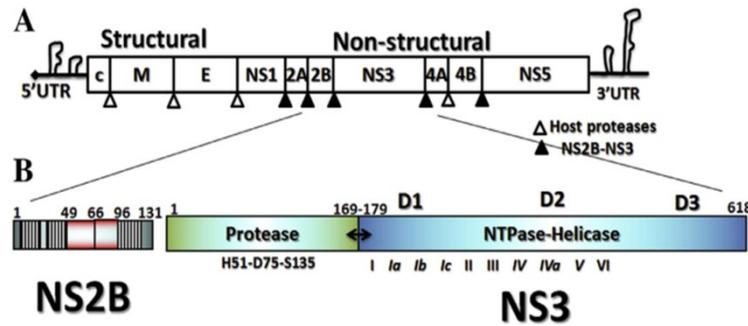
El conocimiento actual que existe sobre la estructura molecular y el ciclo viral de DENV ha permitido que la gran mayoría de las estrategias antivirales se centren en el bloqueo de pasos específicos de componentes clave del ciclo viral. Entre las principales estrategias de infección anti-DENV se encuentra interferir la replicación viral, por lo tanto, la proteasa NS3 de DENV constituye un objetivo farmacológico prometedor para una terapia antiviral eficaz.

#### **1.4 Proteína NS3 de DENV**

La proteína NS3 de DENV, es una proteína multifuncional que comparte en promedio un 77% de identidad de secuencia de aminoácidos con los cuatro serotipos de DENV, presenta un peso de 69 kDa y contiene dos dominios que poseen múltiples actividades enzimáticas (Swarbrick et al., 2017). Un dominio de serina proteasa (NS3pro) de tipo tripsina con la tríada catalítica H51, D75 y S135 (Assenberg et al., 2009). NS3pro se localiza en el extremo N-terminal de NS3, con una longitud de 180 aminoácidos. En el extremo C-terminal NS3 posee tres actividades enzimáticas diferentes: una actividad de helicasa, una actividad de nucleósido 5'-trifosfatasa (NTPasa) y una actividad de RTPasa (da Silva-Júnior & de Araújo-Júnior, 2019; Yusof et al., 2000).

##### **1.4.1 Proteasa NS2B-NS3 de DENV**

NS3pro requiere la unión con NS2B como cofactor para su actividad enzimática y su plegamiento correcto. NS2B es una proteína de membrana integral de 14 kDa que se encuentra río arriba de NS3pro y contiene tres dominios: una región hidrofílica central de 47 aminoácidos (que abarca los aminoácidos 49-96) que actúa como un cofactor de proteína esencial de NS3pro y dos segmentos transmembrana ubicados en los extremos N-terminal y C-terminal (Figura 2) (Lescar et al., 2008; Luo et al., 2015; Yusof et al., 2000).



**Figura 2. Representación esquemática del genoma flaviviral, poliproteína y partición de dominio funcional a lo largo del gen NS2B-NS3.** (A) Genoma y poliproteína de flavivirus. El genoma viral contiene un cap 5' y regiones no traducidas en los extremos 5' y 3'. Las poliproteínas son procesadas por la proteasa NS2B-NS3 indicada como flechas rellenas y las proteasas del hospedero por flechas sin rellenas. (B) La representación esquemática de los genes NS2B y NS3. La región del cofactor central de NS2B está en rojo, y las supuestas regiones asociadas a la membrana de NS2B se muestran como bloques (Luo et al., 2015).

El complejo NS2B-NS3 es el encargado del procesamiento proteolítico de la poliproteína viral en las uniones NS2A / NS2B, NS2B / NS3, NS3 / NS4A y NS4B / NS5, que es importante para la replicación viral y el ensamblaje del virión (Silva et al., 2019).

Además, en nuestro laboratorio se reportó que NS3pro de DENV y ZIKV alteran la integridad del complejo del poro nuclear (NPC) al procesar diferentes nucleoporinas (Nups), como Nup62, Nup98 y Nup153, componentes del NPC. Estas alteraciones podrían afectar el transporte núcleo-citoplasma, el cual es necesario para el importe de factores de transcripción relacionados con la activación de la respuesta inmune, hacia el núcleo, favoreciendo la replicación viral (De Jesús-González et al., 2020).

Palacios-Rápalo y colaboradores en el 2021 reportaron que durante la infección por DENV-2, NS3 se trasloca al núcleo del hospedero, lo que podría sugerir que su presencia en el núcleo juega un papel importante en la patogénesis de la infección. Por lo tanto, estos nuevos informes respaldan aún más la importancia que representa la proteína NS3 en diferentes etapas del ciclo viral de DENV, que la hacen un objetivo farmacológico antiviral prometedor.

## II. ANTECEDENTES

Hasta el momento, no existe un fármaco antiviral seguro y eficaz contra la infección por DENV, esta situación ha llevado a la búsqueda de fármacos antivirales derivados de productos naturales, péptidos sintéticos etc. Sin embargo, también se ha adoptado otro tipo de estrategias como utilizar fármacos ya autorizados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), que pudieran tener un uso profiláctico y/o terapéutico frente al dengue y cuya aprobación de uso podría ser inmediata.

En la Tabla 1, se describen diferentes fármacos que se han evaluado en pacientes con dengue, en ensayos clínicos de tipo aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo.

**Tabla 1. Estudios clínicos sobre la terapéutica del dengue**

Fármaco	Función	Resultados	Referencias
<b>Cloroquina</b>	Fármaco antipalúdico, derivado lisosomotrópico de 4-aminoquinolina. Interfiere con el mecanismo de entrada del virus al inhibir la fusión entre el virus y la membrana del huésped.	No hubo reducción de la duración de la viremia y la antigenemia NS1.	(Tricou et al., 2010)
<b>Prednisolona</b>	Fármaco corticosteroide con propiedades antiinflamatorias.	No se encontró asociación entre la asignación al tratamiento y cualquiera de los criterios de valoración clínicos, hematológicos o virológicos.	(Tam et al., 2012)
<b>Balapiravir</b>	Es un profármaco de un análogo de nucleósido (llamado R1479) y un inhibidor de la replicación del virus de la hepatitis C <i>in vivo</i> .	No se asoció con cambios mensurables en una variedad de criterios de valoración virológicos, clínicos o inmunológicos en pacientes que comenzaron el tratamiento dentro de las primeras 48 horas de su enfermedad.	(Nguyen et al., 2013)
<b>Celgosivir</b>	Profármaco 6-O butanoil producto natural de castanospermina. Ejerce actividad antiviral inhibiendo la enzima $\alpha$ -glucosidasa I asociada al RE.	No redujo significativamente la carga viral o la fiebre.  El ensayo no cumplió con los criterios de valoración principales de reducir la viremia o la fiebre.	(J. G. Low et al., 2014)  (Sung et al., 2016)
<b>Lovastatina</b>	Fármaco miembro de la familia de las estatinas también conocidas como inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-coa) reductasa, con propiedades reductoras de lípidos, incluidos efectos sobre la función endotelial.	No se encontró evidencia de un efecto beneficioso sobre ninguna de las manifestaciones clínicas o sobre la viremia del dengue.	(Whitehorn et al., 2016)

Actualmente, se encuentran en proceso dos ensayos clínicos de tipo aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo. El primero corresponde a un ensayo de fase II

/ III, sobre la eficacia y seguridad de la ivermectina ([NCT02045069](#)) en niños y pacientes adultos y el segundo corresponde a un ensayo de fase 4 utilizando como placebo ketotifeno ([NCT02673840](#)) en adultos con infección por dengue; sin embargo, aún queda por determinar su eficacia clínica a largo plazo.

Asimismo, en los últimos años también se han diseñado o sintetizado diversos tipos de inhibidores dirigidos específicamente a la proteasa viral NS3 de los diferentes serotipos de DENV. Ejemplo de ellos son los inhibidores basados en peptidil-aldehídos (Schüller et al., 2011); en arilcianoacrilamidas (Nitsche et al., 2011); en antraceno (Tomlinson & Watowich, 2011); en derivados de aminobenzamida (Aravapalli et al., 2012); en conotoxina que es un péptido neurotóxico producido por caracoles del género *Conus* (Xu et al., 2012); en análogos de dipéptidos de metionina-prolina (Zhou et al., 2013); en derivados de 8-hidroxiquinolina (Lai et al., 2013); en péptidos híbridos basados en 2,4-tiazolidindiona (Bastos Lima et al., 2015); que contienen bencil éteres de 4-hidroxifenilglicina (Behnam et al., 2015); en análogos de fenilalanina y fenilglicina (Weigel et al., 2015); en derivados de ácido bórico (Nitsche et al., 2017); y en péptidos cíclicos (Takagi et al., 2017; Xu et al., 2012). Sin embargo, son pocos los que han tenido un efecto sobre la actividad viral y entre ellos se encuentran los derivados de  $\alpha$ -cetoamidas (Steuer et al., 2011); péptidos híbridos de tiazolidinona (Nitsche et al., 2013); basados en imidazolidinonas y pirrolidinas bicíclicas fusionadas (Weng et al., 2017) y compuestos basados en prolina (Millies et al., 2019). En la Tabla 2 se describen otros ejemplos de inhibidores de proteasas con más detalle.

**Tabla 2. Inhibidores de la proteasa NS3 viral de DENV**

Inhibidores	Resultados	Referencias
<b>BP2109</b>	Tuvo un efecto inhibidor eficaz sobre el rendimiento viral contra los cuatro serotipos de DENV a una concentración no citotóxica de 8 $\mu$ M. Mostró un efecto inhibidor sobre la actividad de proteasa de DENV-2 a una concentración de 12 $\mu$ M.	(Yang et al., 2011)
<b>Protegrina-1</b>	Inhibió la proteasa de DENV-2 con una $IC_{50}$ de 11.7 $\mu$ M. Además redujo la replicación viral de manera significativa principalmente a las 24 horas.	(Rothan, Abdulrahman, et al., 2012)
<b>Retrociclina-1</b>	Inhibió la actividad de la proteasa recombinante con diferentes valores de $IC_{50}$ que dependió de la temperatura (28°C, 46.1 $\pm$ 1.7 $\mu$ M; 37 °C, 21.4 $\pm$ 1.6 $\mu$ M; 40°C, 14.1 $\pm$ 1.2 $\mu$ M) y redujo significativamente la replicación viral en células vero infectadas	(Rothan, Han, et al., 2012)

	con DENV-2 en el tratamiento simultáneo después de 48 horas (70 %) y 75 horas (85 %).	
<b>SK-12</b>	Inhibió eficazmente la proteasa viral y la replicación de todos los serotipos de DENV.	(Pambudi et al., 2013)
<b>Tiadiazolopirimidinona 1</b>	Mostró una actividad inhibidora contra la proteasa viral con una IC <sub>50</sub> de 6.09 µM.	(H et al., 2014)
<b>Antraquinona</b>	Inhibió eficazmente la actividad de la proteasa viral de DENV-2 y redujo el título viral en células HuH-7 a una concentración de 1 µM.	(Chu et al., 2015)
<b>Policresulen</b>	Resultó ser un potente inhibidor de la proteasa de DENV-2, con una IC <sub>50</sub> de 0.48 µg/mL en las células BHK-21 e inhibió la replicación viral.	(Wu et al., 2015)
<b>Flavonoides</b>	Agatisflavona fue el más activo con una IC <sub>50</sub> de 15.1 ± 2.2 y 17.5 ± 1.4 µM contra la proteasa de DENV-2 y DENV-3.	(de Sousa et al., 2015)
<b>Derivados de benzotiazol</b>	Mostraron IC <sub>50</sub> en un rango micromolar bajo para la proteasa viral. Además inhibieron significativamente la replicación viral de los serotipos de DENV 1, 2 y 3 a concentraciones submicromolares.	(Wu et al., 2015)

\*IC<sub>50</sub>: Concentración inhibitoria media máxima.

A pesar de estos avances, aún existe una serie de limitaciones que dificultan el uso de péptidos como fármacos terapéuticos; ejemplo de ello es su escasa estabilidad y biodisponibilidad, además, se ha reportado que los péptidos no modificados pueden degradarse rápidamente en el suero humano y como consecuencia pueden presentar actividades bajas *in vivo*. No obstante, se pueden aplicar diversas modificaciones químicas para manipular las propiedades fisicoquímicas de los péptidos, aumentando así la estabilidad y biodisponibilidad de estos (Bruno et al., 2013).

Sin embargo, los candidatos a fármacos aun no son aprobados para su uso como tratamiento en humanos, por lo tanto, aún existe la necesidad de encontrar un tratamiento eficaz contra dengue que pueda acortar la duración de la enfermedad, reducir la gravedad de los síntomas y prevenir el desarrollo de complicaciones graves como el síndrome de choque por dengue. Entre las características de un fármaco ideal contra dengue se encuentran el que sea activo contra los 4 serotipos de DENV, de bajo costo, facilidad de administración, considerando que existe una

gran carga de enfermedad en la población pediátrica y que además cuente con un excelente perfil de riesgo-beneficio.

El proceso de desarrollo de nuevos fármacos lleva mucho tiempo, es laborioso y costoso, ya que tiene que pasar por todas las fases del desarrollo desde su descubrimiento hasta el registro del fármaco. Por lo tanto, diversos grupos de investigadores han estado invirtiendo constantemente en el desarrollo de nuevos métodos para aumentar la eficiencia del proceso de descubrimiento de fármacos. En este contexto, el *virtual screening* basado en estructuras (SBVS) es una técnica *in silico* útil y prometedora para el diseño y búsqueda de fármacos. Además, se ha demostrado que el diseño de fármacos basado en estructura es más eficiente, ya que tiene como objetivo comprender la base molecular de una enfermedad y utilizar el conocimiento de la estructura tridimensional del objetivo biológico en el proceso. Asimismo, el uso de SBVS tiene como ventajas: una disminución en el tiempo y costo involucrados en el cribado de millones de moléculas; no es necesaria la existencia física de la molécula, por lo que se puede probar computacionalmente incluso antes de sintetizarla y finalmente existen varias herramientas disponibles para ayudar a SBVS (Maia et al., 2020).

Entre las técnicas de SBVS destaca el acoplamiento molecular, que se ha convertido en una herramienta esencial en el descubrimiento de fármacos debido a su bajo costo computacional. Esencialmente, el objetivo del acoplamiento molecular es proporcionar una predicción de la estructura del complejo proteína-ligando, el cual va seguido de una puntuación en SBVS para clasificar los compuestos con mejor afinidad, utilizando métodos de cálculo (Ferreira et al., 2015; Lionta et al., 2014; Meng et al., 2011).

Por lo tanto, buscar inhibidores de la proteasa NS3 a partir de medicamentos aprobados por la FDA, mediante estas estrategias bioinformáticas prometen una selección de medicamentos con un alto potencial para inhibir la replicación de DENV.

### III. JUSTIFICACIÓN

La infección por DENV ha resurgido como un importante problema de salud pública, además, es de las infecciones virales transmitidas por mosquitos que emergen más rápidamente en el mundo, generando un impacto socioeconómico significativo principalmente en los países subdesarrollados.

A pesar de los numerosos esfuerzos para identificar un compuesto antiviral seguro y eficaz, actualmente, no existe un fármaco específico aprobado contra DENV. Sin embargo, se han realizado diferentes estudios en busca de blancos antivirales y las proteasas virales han demostrado ser excelentes, debido a sus funciones en la replicación viral. Por lo tanto, los inhibidores de NS3pro son candidatos potenciales a fármacos para el tratamiento de la infección por DENV. No obstante, el proceso de investigación y desarrollo de un nuevo fármaco es costoso y largo, ya que implica diferentes fases, desde la identificación del compuesto, hasta la fase de aprobación y registro, además la tasa de éxito en muchas ocasiones resulta ser muy baja.

Como consecuencia de estas limitaciones, se ha optado por emplear otras estrategias, como utilizar fármacos pre-aprobados por la FDA y evaluar su papel terapéutico en otros padecimientos. Entre los métodos más utilizados actualmente para la búsqueda y el diseño de nuevos fármacos se encuentra el *virtual screening* basado en estructura que ha contribuido a la aparición de compuestos que se encuentran ya en el mercado.

Entre el diseño de fármacos basados en su estructura se encuentra el acoplamiento molecular que se considera también una herramienta clave en el diseño de fármacos, ya que ofrece nuevos candidatos de forma más rápida y rentable. Entonces, resulta interesante, identificar nuevos candidatos que inhiban la replicación viral de DENV-2 dirigidos a la NS3pro, basándonos en compuestos ya aprobados por la FDA utilizando herramientas bioinformáticas y validando su utilidad en un modelo de infección con DENV.

## IV. HIPÓTESIS

El análisis de candidatos inhibidores de la proteasa NS3 de DENV-2 mediante acoplamiento molecular nos permitirá identificar inhibidores de la replicación viral de DENV.

## V. OBJETIVOS

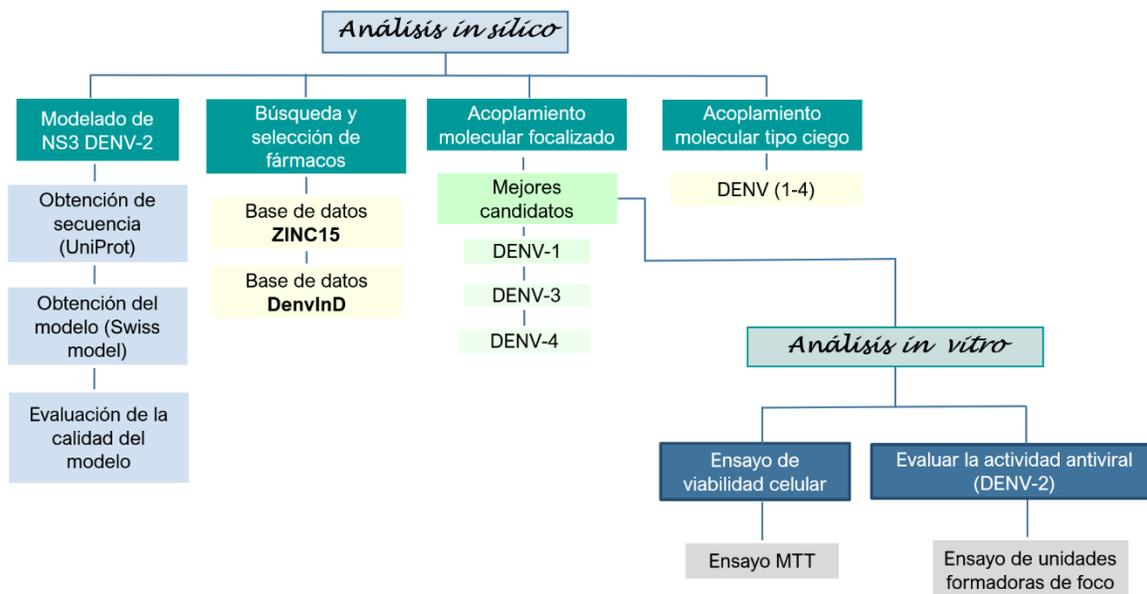
### Objetivo general

Identificar *in silico* inhibidores de la proteasa NS3 de DENV-2 a partir de compuestos aprobados por la FDA y probar su eficacia para reducir la replicación de DENV-2 en células Huh-7.

### Objetivos particulares

- Modelar por homología la proteína NS3 de DENV-2.
- Seleccionar los inhibidores con mejor afinidad hacia la proteasa NS3 de DENV-2 a partir de los resultados del acoplamiento molecular.
- Evaluar *in vitro* la actividad antiviral de los inhibidores seleccionados en células Huh-7.

## VI. DISEÑO EXPERIMENTAL



## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Análisis *in silico* de la proteína NS3

#### 7.1.1 Búsqueda y selección de fármacos

Para la búsqueda y selección de fármacos se utilizó la base de datos ZINC15, que contiene una colección curada de 230 millones de compuestos químicos. Entre estos, se filtraron aquellos aprobados por la FDA y de origen natural, y se descartaron las sustancias con poca actividad farmacológica. Posteriormente, los fármacos seleccionados fueron ingresados a la base de datos DenvInD (Dwivedi et al., 2020), que compila todos los inhibidores disponibles que pueden actuar como objetivos potenciales para el descubrimiento de fármacos contra DENV, esto con la finalidad de evitar seleccionar fármacos ya reportados como inhibidores.

### **7.1.2 Estructura de las proteínas NS3 y NS5 de DENV 1-4**

La estructura terciaria de la proteasa-helicasa NS3 de DENV-1, DENV-2 y DENV-3 y la estructura terciaria de la proteína NS5 de DENV-1 y DENV-4 fueron modeladas por homología con el servidor SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018).

Se utilizó la secuencia de la proteína NS3 y NS5 de DENV-1 cepa *Nauru/West Pac/1974* con número de acceso UniProtKB: P17763, NS3 de DENV-2 cepa *Thailand/16681/1984* con número de acceso UniProtKB: P29990 y NS3 de DENV-3 cepa *Philippines/H87/1956* con número de acceso UniProtKB: P27915. Mientras que para la estructura terciaria de la proteína NS5 de DENV-4 se utilizó la secuencia de la cepa *Singapore/8976/1995* con número de acceso UniProtKB: Q5UCB8.

La estructura terciaria de NS3 de DENV-4 (ID: 2VBC), NS5 de DENV-2 (5ZQK) y de DENV-3 (5CCV) se obtuvieron de la base de datos PDB.

Los archivos en formato PDB fueron analizados con el software UCSF CHIMERA (Pettersen et al., 2004) y los modelos fueron validados mediante el gráfico de Ramachandran y el servidor VERIFY3D (Bowie et al., 1991; Lüthy et al., 1992).

### **7.1.3 Alineamiento de secuencias**

Se compararon las secuencias de la proteína NS3 de diferentes flavivirus (DENV, WNV y ZIKV) utilizando el servidor Clustal Omega, Multiple Sequence Alignment (Sievers et al., 2011).

### **7.1.4 Acoplamiento molecular focalizado y ciego de fármacos contra NS3 y NS5 de DENV (1-4)**

En primer lugar, se realizó el acoplamiento molecular de tipo focalizado para los 100 fármacos seleccionados dirigidos contra el dominio de proteasa de la proteína NS3 de DENV-2. Se utilizó la estructura cristalina de la proteína NS3 de DENV-2, la cual fue minimizada con el software PyMOL 2.4 y el editor de texto Kate Versión 20.04.1. Se eliminaron las moléculas de agua y otras moléculas asociadas en el archivo PDB. El acoplamiento molecular se realizó con el software Autodock4 y AutoGrid4

(Huey et al., 2007; Morris et al., 1998, 2009). Posteriormente, se eligieron los mejores modelos de interacción en función del  $\Delta G$  calculado más bajo.

La preparación de la estructura de NS3 de DENV-2, y los ligandos se realizó mediante el software AutoDockTools versión 1.5.6 (Morris et al., 1996). Los parámetros de la cuadrícula utilizados fueron 60 Å, 60 Å y 60 Å (X, Y y Z), el espaciado de la cuadrícula de 0.375 Å y la cuadrícula central (X, Y y Z) de 68.507, -3.250 y 51.986. Los parámetros del algoritmo genético fueron: número de series de GA 100, tamaño de población 50, número máximo de evaluaciones medianas 10000000, los demás valores se utilizaron por defecto.

Posteriormente, se seleccionaron tres fármacos, que corresponde a glibenclamida, irinotecán y simvastatina y se realizó el acoplamiento focalizado para los tres fármacos contra NS3pro de DENV-1, DENV-3 y DENV-4. En este contexto, los únicos datos que variaron fueron los valores de la cuadrícula central (X, Y y Z) para los tres serotipos. En el caso de DENV-1 fueron: 4.632, 13.041 y -13.838; DENV-3: -24.256, -0.084 y -10.011 y DENV-4: -24.323, -0.076, -9.993.

El acoplamiento ciego se realizó para los tres fármacos seleccionados contra las proteínas NS3 y NS5 de DENV 1-4, donde los valores que variaron fueron el parámetro de la cuadrícula que ahora correspondieron a 126 Å, 126 Å y 126 Å (X, Y y Z). El valor de la cuadrícula central también fue diferente para los 4 serotipos de DENV.

## **7.2 Línea celular y cepa viral**

En este trabajo se utilizó la línea celular de carcinoma hepatocelular humano Huh-7 la cual se cultivó en medio avanzado de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con glutamina 2 mM, suero bovino fetal (FBS) al 5%, fungizona (1 mL / L), penicilina ( $5 \times 10^4$  U / mL) y estreptomina (50  $\mu$ g / mL) a 37 °C y atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 5%.

El virus empleado para los ensayos de infección fue DENV-2 cepa Tailandia. El virus se propagó utilizando cerebros de ratones lactantes CD-1 (proporcionados por la Unidad de Protección y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL).

Como control se utilizaron extractos cerebrales de ratones lactantes CD-1 no infectados (Mock-infection). El título viral se calculó por ensayo de focos.

### **7.3 Ensayo de viabilidad celular**

La viabilidad celular se evaluó con el método MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol).

Las células Huh-7 se cultivaron en placas de 96 pozos hasta alcanzar una confluencia del 70-80 %. Posteriormente, se trataron durante 48 h a 37° C con el vehículo (DMSO) y los fármacos seleccionados a diferentes concentraciones. 1) Para glibenclamida fueron: 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 1000  $\mu$ M, 1500  $\mu$ M, 2000  $\mu$ M y 2500  $\mu$ M. 2) Para irinotecán fueron: 0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 300  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 1500  $\mu$ M y 2000  $\mu$ M y finalmente para simvastatina fueron: 0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 150  $\mu$ M, 200  $\mu$ M y 250  $\mu$ M. A continuación, se agregaron 14  $\mu$ L de MTT por pozo y se incubó por 3 h a 37°C según las indicaciones del proveedor. Finalmente, se retiró el MTT y se agregaron 100  $\mu$ L de DMSO por pozo. La lectura se realizó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm. Para quitar el fondo se leyó la placa a una longitud de onda de 620 nm y las absorbancias obtenidas se restaron a las absorbancias obtenidas con la longitud de onda de 550 nm.

### **7.4 Ensayo de rendimiento viral**

Las células Huh-7 se sembraron en placas de 24 pozos y cuando alcanzaron una confluencia entre el 70 y 80 %, se infectaron con DENV-2 a una multiplicidad de infección de 1 en medio Hanks con 1% de suero fetal bovino durante 2 horas a 37°. Posteriormente, se realizó el ensayo de inhibición, usando como vehículo, DMSO y los tres fármacos seleccionados, glibenclamida, irinotecán y simvastatina en medio DMEM durante 48 h a 37° C. Las concentraciones empleadas de glibenclamida fueron 1, 5, 10, 25, 50 y 100  $\mu$ M, para irinotecán fueron 0.1, 1, 5, 10, 15 y 25  $\mu$ M y finalmente para simvastatina fueron 0.1, 1, 2, 3, 5 y 10  $\mu$ M.

A continuación, se recolectaron los sobrenadantes de células tratadas y no tratadas con los fármacos infectadas con DENV-2 para determinar el rendimiento viral usando un ensayo de unidades formadoras de focos (UFF). Brevemente,  $1.5 \times 10^5$  células de la línea celular Huh-7 se sembraron en placas de poliestireno de 96 pocillos durante 24 h hasta tener una monocapa semiconfluente. El medio celular Huh-7 se reemplazó e incubó con 50  $\mu$ L de diluciones seriadas preparadas con 15  $\mu$ L de sobrenadantes de células tratadas o no tratadas infectadas con DENV-2, agregadas con 135  $\mu$ L de medio HANKS (volumen final 150  $\mu$ L) y se incubaron durante 2 h a 37 °C para permitir la absorción viral. Después del tiempo de incubación, se colocaron 100  $\mu$ L de medio de soporte (Medio MEM 2X con 0,8% de carboximetilcelulosa (CMC) añadida con 5% de FBS). Las placas con medio de soporte (CMC) se dejaron incubando durante 48 h a 37 °C bajo atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, evitando movimientos bruscos. Posteriormente, el medio completo se retiró y se lavó 3 veces con PBS 1X, para después fijar las células con paraformaldehído al 1% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Enseguida, se permeabilizaron las células con solución permeabilizadora (saponina 0.02%, SFB 1% en PBS 1X) durante 20 minutos y se incubó con el anticuerpo monoclonal primario anti-DENV 2H2, dirigido a las proteínas virales prM-E, durante 1:30 h a 37° C. A continuación, se lavó 3 veces con solución permeabilizadora y se colocó el anticuerpo secundario anti-ratón Alexa 488 (Life technologies) durante 1:15 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las placas se lavaron 3 veces con PBS 1X. Los focos se contaron en un microscopio de fluorescencia. El título viral se expresó como unidades formadoras de focos por mililitro (UFF/mL).

## **7.5 Análisis estadístico**

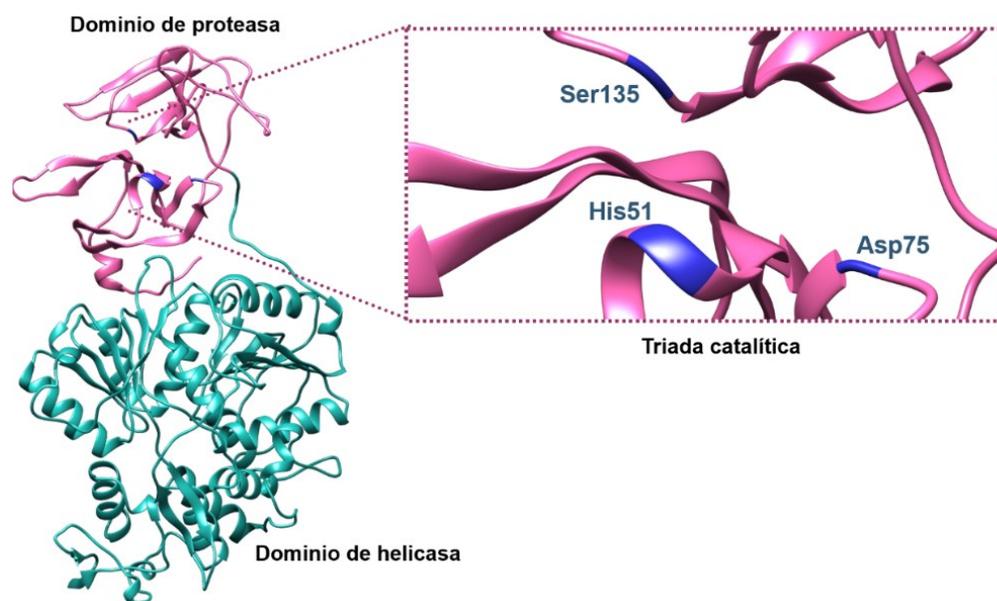
Para el análisis estadístico se utilizó el software Graph Pad Prism versión 8.0.2. Los datos numéricos se expresaron con el valor de la media y desviación estándar (SD). Para determinar diferencias entre las concentraciones utilizadas en los ensayos de viabilidad celular y los ensayos de focos de células tratadas y no tratadas con los fármacos se realizó un análisis de varianza (ANOVA de una vía) usando las pruebas de comparaciones múltiples de Dunnett. Los resultados fueron normalizados y

presentados en porcentajes considerando el 100% de las células infectadas sin tratar.

## VIII. RESULTADOS

### Predicción de la estructura terciaria de la proteína NS3 de DENV-2

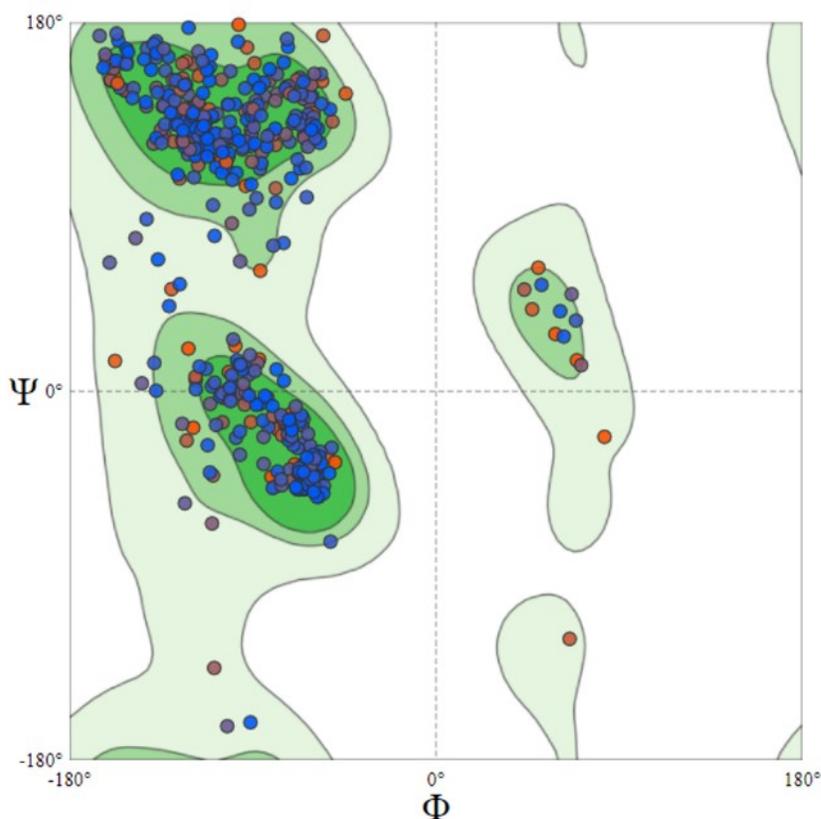
Se realizó la búsqueda de la estructura terciaria de la proteína NS3 de DENV-2 en la base de datos de Protein Data Bank (PDB). Sin embargo, no se ha reportado el cristal completo de dicha proteína, por lo cual su estructura se modeló por homología mediante el programa de Swiss model. Para la predicción se utilizó la secuencia de aminoácidos de la cepa *Thailand/16681/1984* con número de acceso UniProtKB: P29990. El programa predijo una estructura terciaria con un SeqID: del 76.86% (Figura 3).



**Figura 3. Predicción de la estructura terciaria de la proteína NS3 de DENV-2 cepa Tailandia.** Estructura predicha en el programa de Swiss model. Se observa el dominio de proteasa (color hot pink) y el dominio de helicasa (color light sea green). En el zoom se observa la triada catalítica característica del dominio de proteasa Ser 135, His 51 y Asp 75.

El modelo fue validado a través del gráfico de Ramachandran (Swiss model), donde se pudo detectar que el 95.11% de los residuos se encuentran en la región favorecida (Figura 4). Además, este modelo 3D fue validado por el servidor de verificación Verify3D que se encuentra en <https://saves.mbi.ucla.edu/?job=588036>,

el cual mostró que el 92.03% de los residuos de aminoácidos de la secuencia utilizada es compatible con el modelo 3D.



**Figura 4. Validación del modelo 3D de NS3 de DENV-2.** La parcela de Ramachandran del modelo 3D se obtuvo del programa Swiss model, donde se pudo detectar que el 95.11% de los residuos se encuentran en la región favorecida, el 3.58% en la región permitida y el 2.15% de los residuos en la región atípica.

Además, se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias del dominio de proteasa de NS3 de los cuatro serotipos de DENV y diferentes virus del género *Flaviviridae*, como el virus del Nilo Occidental (WNV) y el virus Zika (ZIKV) con la finalidad de evaluar si el sitio activo de la proteasa NS3 era conservado entre ellos. A este respecto, encontramos que el sitio activo de proteasa de NS3 se encuentra conservado en los diferentes virus utilizados para el análisis (Figura 5).

DENV-2	AGVLWDVPSPPPMGKAELEDGAYRIKQKQKILGYSQIGAGVYKEGTFHTMHWVTRGAVLMH	60
DENV-4	SGALWDVPSAAAQKATLTEGVYRIMQRGLFGKTVQVGVGIHMEGVFHTMHWVTRGVSICH	60
DENV-1	SGVLWDTPSPPEVERAVLDDGIYRILQRGLLGRSQVGVGVFQEGVFHTMHWVTRGAVLMY	60
DENV-3	SGVLWDVPSPPETQKAELEEGVYRIKQQGIFGKTVQVGVGVQKEGVFHTMHWVTRGAVLTH	60
ZIKV	SGALWDVPPAPKEVKKGETTDGVYRVMTTRLLGSTQVGVGMQEGVFHTMHWVTRKGSALRS	60
WNV	GGVLWDTPSPKKEYKKGDTTGVYRIMTRGLLGSYQAGAGVMVEGVFHTLWHTTKGAALMS	60
	.*.***.*:* :. * ** : : : * * *.* : **.***:*.*.*:* : :	
DENV-2	KGKRIEPSWADVKKDLISYGGGWKLEGEWKEGEEVQVLALEPGKNPRAVQTKPGLFKTNA	120
DENV-4	ESGRLEPSWADVRNDEMISYGGGWRLGDKWDKEEDVQVLAIEPGKNPKHVQTKPGLFKTLT	120
DENV-1	QGKRLEPSWASVKKDLISYGGGWRFQGSWNAGEEVQVIAVEPGKNPKNVQTAPGTFKTPPE	120
DENV-3	NGKRLEPNWASVKKDLISYGGGWRLSAQWQKGEVQVIAVEPGKNPKNFQTMPIGFQTTT	120
ZIKV	GEGRLDPYWGDKVQDLVSYCGPWKLDAAWDGHSEVQLLAVPPGERARNIQTLPGIFKTKD	120
WNV	GEGRLDPYWGSVKEVDRLCYGGPWKLQHKWNGQDEVQMIVVPEPGKNVKNVQTKPQVFKTPE	120
	*:* * .*.***:* :.* * ** : * . .***:* : **.* : .** ** * : *	
DENV-2	GTIGAVSLDFSPGTSGSPIIDKKKGVVGLYNGVVTTRSGAYVSAIAQTEKSIEDN-PEIE	179
DENV-4	GEIGAVTLDFKPGTSGSPIINRKGKVIIGLYNGVVTKSGDYVSAITQAERIGEPD-YEVD	179
DENV-1	GEVGAIALDFKPGTSGSPIVNREGKIVGLYNGVVTTSGETYVSAIAQAKASQEGPLPEIE	180
DENV-3	GEIGAIALDFKPGTSGSPIINREGKVVGLYNGVVTKNGGYVSGIAQTNAEPDGPTEPELE	180
ZIKV	GDIGAVALDYPAGTSGSPILDKCGRVIGLYNGVVIKNGSYVSAITQGRREEETPVCEFE	180
WNV	GEIGAVTLDFPTGTSGSPIVDKNGDVIGLYNGVIMPNGSYISAIVQGERMDEPIPAGEFE	180
	* :**:* : * :*****: .* * :.*.* . : : :	
DENV-2	D 180	
DENV-4	E 180	
DENV-1	- 180	
DENV-3	- 180	
ZIKV	- 180	
WNV	- 180	

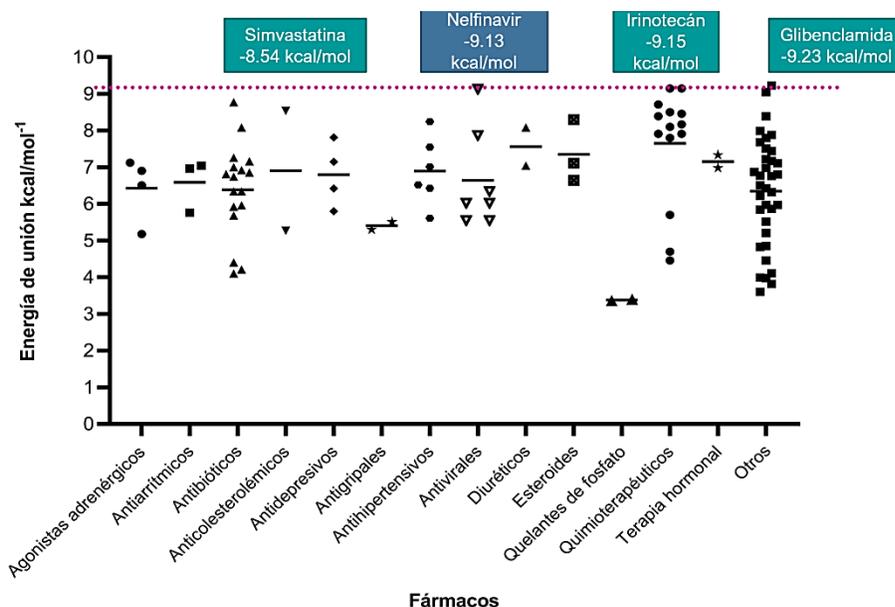
**Figura 5. Alineamiento múltiple de las secuencias del dominio de proteasa de NS3 de diferentes virus del género *Flaviviridae*.** Se observa en color amarillo que el sitio activo de la proteasa NS3 (His 51, Asp 75 y Ser 135) se encuentra conservado en los diferentes virus.

## Candidatos a inhibidores de NS3 DENV-2 y acoplamiento molecular de tipo focalizado

Se seleccionaron 100 fármacos de la base de datos de ZINC15, fueron ingresados a la base de datos DenvInd, para evitar seleccionar fármacos ya reportados como inhibidores. Sin embargo, ninguno de los fármacos seleccionados ha sido reportado (Anexo 1).

El acoplamiento molecular fue validado utilizando como referencia al fármaco nelfinavir, que de acuerdo con Bhakay y colaboradores en el 2015, se une a la triada catalítica Ser 135, His 51 y Asp 75 e inhibe en aproximadamente un 28% la replicación viral de DENV-2. Utilizando nuestras condiciones nelfinavir tuvo un valor de energía de unión de -9.13 kcal/mol con la proteína NS3 de DENV-2 y a partir de este resultado se utilizó a nelfinavir como punto de referencia para seleccionar

aquellos fármacos con mayor afinidad a la proteína NS3 de DENV-2, los cuales se indican en color azul en la Figura 6.



**Figura 6. Acoplamiento focalizado de los candidatos a inhibidores de la proteasa NS3 de DENV-2.** El gráfico representa los valores de energía de unión del acoplamiento de tipo focalizado para los 100 fármacos seleccionados. En color rojo, se observa a nelfinavir, el cual se utilizó como punto de referencia para seleccionar el resto de los fármacos a evaluar (color azul).

Con los criterios antes especificados, se seleccionaron 3 fármacos que fueron glibenclamide e irinotecán que presentan una energía de unión de -9.23 y -9.15 kcal/mol, respectivamente. Además, se seleccionó el fármaco simvastatina que presenta una energía de unión de -8.54 kcal/mol. Este último, se escogió ya que se ha visto que las estatinas, por ejemplo, la lovastatina puede afectar el ensamblaje viral de DENV-2 (Martínez-Gutierrez et al., 2011).

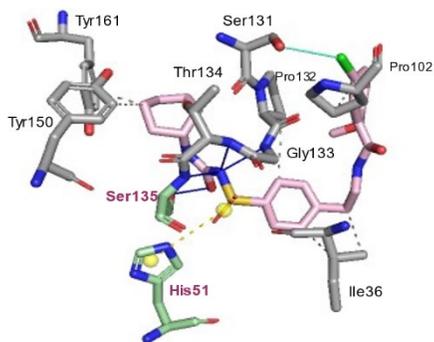
En la Tabla 4, se describe la actividad farmacológica que presentan los tres fármacos seleccionados y también a que componentes de la triada catalítica del dominio de proteasa de NS3 se unieron en el acoplamiento focalizado.

**Tabla 4. Actividad farmacológica de glibenclamida, irinotecán y simvastatina**

ID	Fármaco	Energía de unión kcal/mol	Triada catalítica	Actividad farmacológica	Referencias
ZINC537805	Glibenclamida	-9.23	His 51 Ser 135	Tratamiento para pacientes con diabetes mellitus.	(Ryu et al., 2014)
ZINC1612996	Irinotecán	-9.15	His 51	Tratamiento para pacientes con cáncer colorrectal, de páncreas y de pulmón.	(de Man et al., 2018)
ZINC3780893	Simvastatina	-8.54	Ser 135	Agente hipolipemiante que se usa para tratar la hipercolesterolemia y reducir el riesgo de enfermedad cardíaca.	(Al-Rasheed et al., 2017)

Cuando se produce la unión entre un ligando y el sitio activo de una proteína se establecen una serie de interacciones específicas que son las responsables de la estabilidad total del complejo. Para evaluar qué tipo de interacciones se pueden generar entre los 3 fármacos seleccionados y el dominio de proteasa de NS3 de DENV-2, se utilizó el software Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) (Salentin et al., 2015), que se observan en la Figura 7.

**Glibenclamida**



Tipo de interacciones

- ..... *Hydrophobic Interaction*
- *Hydrogen Bond*
- *Water Bridge*
- ..... *π-Stacking (parallel)*
- ..... *π-Stacking (perpendicular)*
- ..... *π-Cation Interaction*
- *Halogen Bond*
- ..... *Salt Bridge*
- ..... *Metal Complexation*

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	36A	ILE	3.78	5988	307
2	36A	ILE	3.57	5989	309
3	102A	PRO	3.92	5998	948
4	132A	PRO	3.74	5985	1215
5	150A	TYR	3.66	6012	1370
6	161A	TYR	3.41	6012	1466

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	133A	GLY	1.93	2.95	173.96	✓	✗	1218 [Nam]	6006 [Nox]
2	134A	THR	3.41	4.02	120.14	✓	✗	1223 [Nam]	6006 [Nox]
3	135A	SER	3.15	4.03	144.98	✓	✗	1232 [Nam]	6006 [Nox]
4	135A	SER	3.08	3.70	124.27	✓	✓	1237 [O3]	6008 [O3]

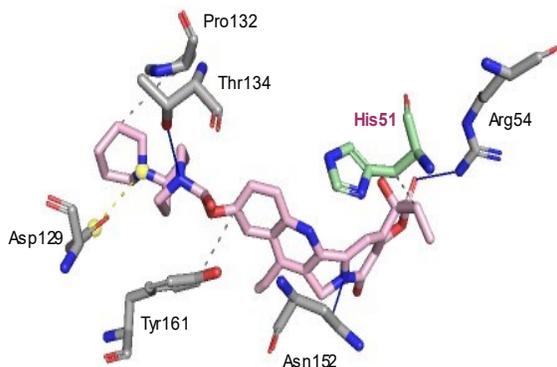
Halogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance	Donor Angle	Acceptor Angle	Donor Atom	Acceptor Atom
1	131A	SER	3.12	135.85	92.36	5999 [Cl]	1208 [O3]

Salt Bridges

Index	Residue	AA	Distance	Protein positive?	Ligand Group	Ligand Atoms
1	51A	HIS	4.84	✓	Carboxylate	6004, 6005

### Irinotecán



#### Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	51A	HIS	2.91	6024	450
2	132A	PRO	3.88	6018	1216
3	161A	TYR	3.86	5990	1465

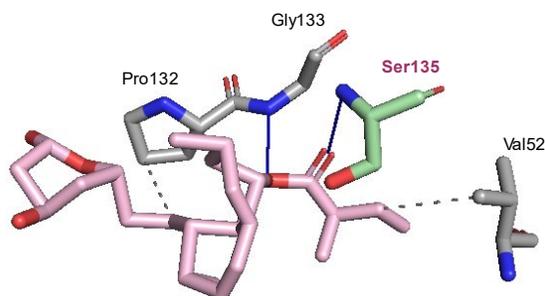
#### Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	54A	ARG	1.82	2.66	136.88	✓	✓	486 [Ng+]	6004 [O3]
2	134A	THR	3.66	4.02	105.64	✓	✓	1229 [O3]	6010 [Nox]
3	152A	ASN	2.80	3.46	122.56	✗	✓	5999 [N3]	1387 [O2]

#### Salt Bridges

Index	Residue	AA	Distance	Protein positive?	Ligand Group	Ligand Atoms
1	129A	ASP	3.59	✗	Tertamine	6016

### Simvastatina



#### Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	52A	VAL	3.77	6011	465
2	132A	PRO	3.71	5995	1216

#### Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	133A	GLY	1.77	2.75	160.81	✓	✗	1218 [Nam]	6005 [O3]
2	135A	SER	2.09	3.03	153.25	✓	✗	1232 [Nam]	6007 [O3]

**Figura 7. Interacciones entre los fármacos glibenclamida, irinotecán y simvastatina con NS3pro de DENV-2.** En las figuras se observan las posibles interacciones que pueden ocurrir entre los fármacos seleccionados y el dominio de proteasa de NS3 de DENV-2. Los fármacos se encuentran en color rosa, mientras que, los residuos de aminoácidos que forman parte de la triada catalítica (His 51, Asp 75 y Ser 135) se muestran en color verde, el resto de los residuos se observan en color gris.

Además, se investigó que otros posibles efectos terapéuticos se han reportado para los tres fármacos seleccionados. En el caso del irinotecán se ha propuesto a este fármaco como una nueva opción terapéutica para el lupus eritematoso sistémico humano (Keil et al., 2016).

Para glibenclamida y simvastatina se han propuesto diferentes usos terapéuticos que se describen en la Tabla 5 y 6.

**Tabla 5. Posibles usos terapéuticos para glibenclamida**

Efecto	Tipo de estudio	Referencias
<b>Antiparasitario</b>		
<i>Echinococcus granulosus</i>	<i>In vitro</i>	(Loos et al., 2017)
<i>Leishmania donovani</i>	<i>In vitro</i>	(Rub et al., 2019)
<b>Antitumoral</b>		
Cáncer de mama	<i>In vivo</i>	(Cocca et al., 2005)
	<i>In vitro</i>	(Núñez et al., 2013)
	<i>In vitro e in vivo</i>	(Rong et al., 2013)
Carcinoma hepatocelular	<i>In vitro</i>	(Yan et al., 2017)
<b>Tejido cerebral</b>		
Accidente cerebrovascular isquémico	Pacientes	(Sheth et al., 2014)
	<i>In vivo</i>	(Nakayama et al., 2018)
	Pacientes	(K. Huang et al., 2019)
Edema cerebral severo	Pacientes	(Pergakis et al., 2019)
Encefalomiелitis autoinmune experimental murino (Esclerosis múltiple)	<i>In vivo</i>	(Gerzanich et al., 2017)
<b>Otros</b>		
Lesión aguda traumática de la médula espinal	Pacientes	(Minnema et al., 2019)
Antiinflamatorio en infecciones por <i>Burkholderia pseudomallei</i>	Pacientes	(Koh et al., 2011)
	<i>In vivo</i>	(Koh et al., 2013)
Inhibidor potencial de las colagenasas	<i>In vitro</i>	(Bodiga et al., 2014)
Cicatrización de heridas	<i>In vitro e in vivo</i>	(Y.-W. Lin et al., 2018)

**Tabla 6. Posibles usos terapéuticos para simvastatina**

Efectos	Tipo de estudio	Referencias
<b>Antitumoral</b>		
Cáncer de tiroides anaplásico humano	<i>In vitro</i>	(Chen et al., 2017)
Carcinoma hepatocelular	<i>In vitro e in vivo</i>	(S.-T. Wang et al., 2017)
Cáncer de mama	<i>In vitro</i>	(Bai et al., 2019)
Tumor óseo de células gigantes	<i>In vitro</i>	(Lau et al., 2020)
<b>Antiviral</b>		
Virus de Epstein-Barr	<i>In vitro e in vivo</i>	(Katano et al., 2004)
VIH-1	<i>In vitro</i>	(András et al., 2010)
Influenza A	<i>In vitro</i>	(MEHRBOD et al., 2014)
Hepatitis C	<i>In vitro</i>	(del Campo et al., 2018)
<b>Antibacteriano</b>		
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>In vivo</i>	(Erkkilä et al., 2005)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>In vivo</i>	(Rosch et al., 2010)
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>In vitro e in vivo</i>	(Parihar et al., 2013)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>In vitro</i>	(Guerra-De-Blas et al., 2019)
<b>Otros</b>		
Alzheimer	<i>In vitro e in vivo</i>	(Roy et al., 2015)
Esclerosis múltiple	Pacientes	(Chan et al., 2017)
Terapia para el trabajo de parto prematuro	<i>In vitro e in vivo</i>	(Boyle et al., 2019)

Es de resaltar que una de las funciones adjudicadas para simvastatina es actuar como antiviral, lo que soporta la idea de que podría tener utilidad contra la infección por DENV.

Por otro lado, también se decidió evaluar por acoplamiento ciego (DENV 1-4) y focalizado (DENV-1, 3 y 4), si los tres fármacos seleccionados tenían la capacidad de unirse a componentes de la triada catalítica de NS3pro, con el fin de evaluar si esta afinidad del dominio de proteasa se conserva y podrían funcionar contra la infección de los cuatro serotipos de DENV.

Se realizó el mismo procedimiento de búsqueda sobre la estructura terciaria de la proteína NS3 para DENV-1, DENV-3 y DENV-4 en la base de datos PDB. Sin embargo, solo se encuentra reportada la estructura completa de NS3 para DENV-4.

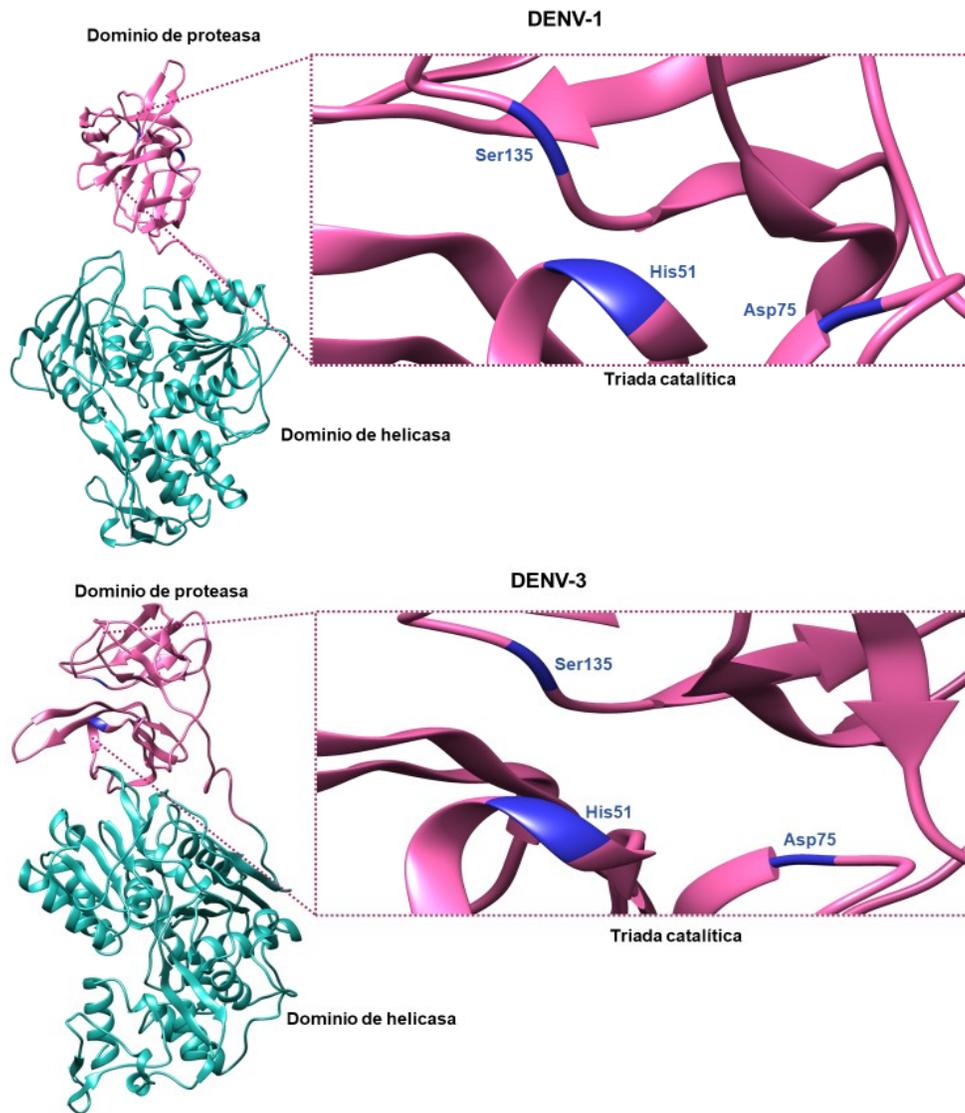
Por lo tanto, la estructura de NS3 de DENV-1 y DENV-3 fueron modeladas por homología mediante el servidor Swiss model. Para la predicción se utilizó la secuencia de aminoácidos de la cepa de DENV-1 *Nauru/West Pac/1974* con número de acceso UniProtKB: P17763, mientras que, para DENV-3 se utilizó la cepa *Philippines/H87/1956* con número de acceso UniProtKB: P27915.

El programa predijo una estructura terciaria con un SeqID: 75.89 % para DENV-1 y un SeqID: 79.22% para DENV-3, donde estos valores están dentro del rango de calidad del modelo 3D (Figura 8).

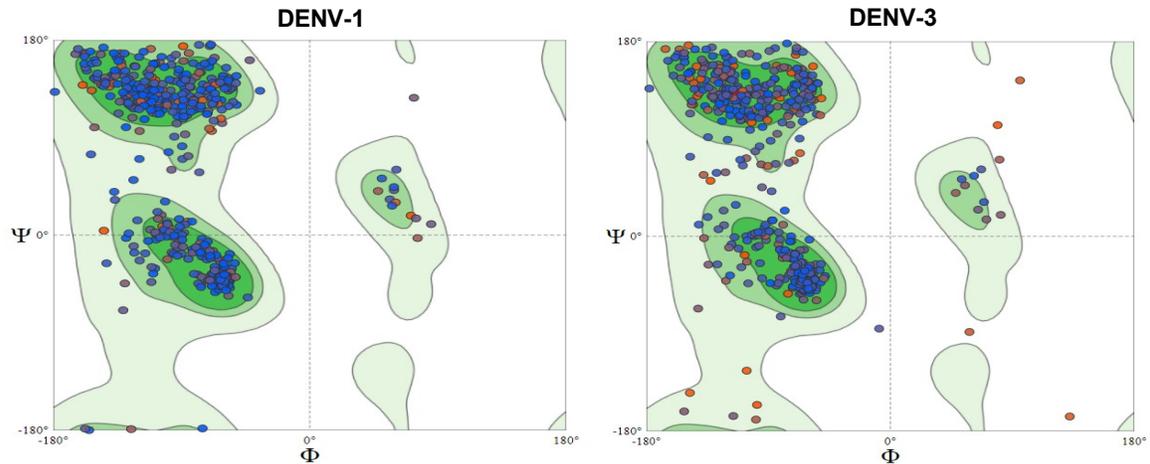
Los modelos para DENV-1, DENV-3 también fueron validados mediante el gráfico de Ramachandran (Swiss model), donde se pudo detectar que el 95.31% de los residuos se encuentran en la región favorecida para DENV-1 y el 91.49% para DENV-3 (Figura 9).

Los modelos también fueron validados por el servidor Verify3D dando como resultados que el 91.15% de los residuos de aminoácidos de la secuencia utilizada es compatible con el modelo 3D para DENV-1, mientras que, para DENV-3, el 87.19% de los residuos de aminoácidos de la secuencia es compatible con el modelo 3D.

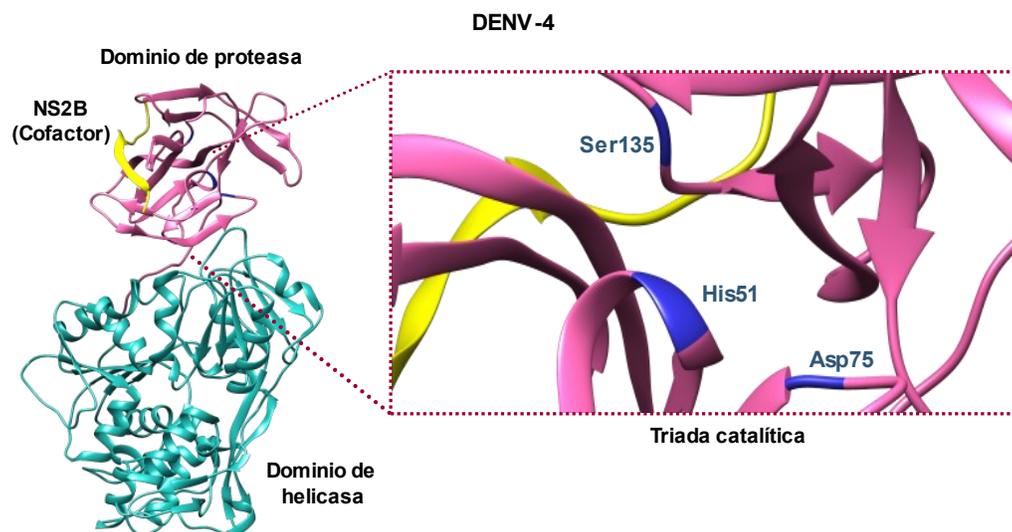
La estructura terciaria para DENV-4 reportada con el código de acceso 2VBC se observa en la Figura 10.



**Figura 8. Predicción de la estructura terciaria de la proteína NS3 de DENV-1 y DENV-3.** Estructura predicha en el programa Swiss model. Se observa el dominio de proteasa (color hot pink) y el dominio de helicasa (color light sea green). En el zoom se observa la triada catalítica característica del dominio de proteasa Ser 135, His 51 y Aps 75.



**Figura 9. Validación del modelo 3D de NS3 de DENV-1 y DENV-3.** La parcela de Ramachandran del modelo 3D se obtuvo del programa Swiss model, donde se pudo detectar que el 95.31% de los residuos se encuentran en la región favorecida, 3.85 % de los residuos en la región permitida y el 0.84 % de los residuos en la región atípica para DENV-1. Para DENV-3, el 91.49% de los residuos se encuentran en la región favorecida, el 7.34% de los residuos en la región permitida y el 1.17% en la región atípica.



**Figura 10. Predicción de la estructura terciaria de la proteína NS3 de DENV-4.** Estructuras obtenidas de la base de datos PDB. Se observa el dominio de proteasa (color hot pink), el cofactor NS2B (color amarillo) y el dominio de helicasa (color light sea green). En el zoom se observa la triada catalítica característica del dominio de proteasa Ser 135, His 51 y Asp 75.

Los resultados del acoplamiento focalizado de la proteína NS3 de DENV-1, DENV-3 y DENV-4, así como los componentes de la triada catalítica a los que se unen los fármacos se observan en la Tabla 7, los cuales se obtuvieron del software AutoDockTools y PLIP.

**Tabla 7. Acoplamiento focalizado de DENV-1, DENV-3 y DENV-4**

Fármacos	Serotipos	Energía de unión kcal/mol	Componentes de la triada catalítica
Glibenclamida	DENV-1	-9.14	His 51, Ser 135
	DENV-3	-7.66	His 51
	DENV-4	-7.87	His 51, Ser 135
Irinotecán	DENV-1	-9.17	His 51, Ser 135
	DENV-3	-8.48	His 51, Asp 75, Ser 135
	DENV-4	-9.13	His 51, Asp 75, Ser 135
Simvastatina	DENV-1	-7.52	His 51, Ser 135
	DENV-3	-6.92	Asp 75
	DENV-4	-7.26	His 51, Ser 135

Los resultados del acoplamiento ciego (DENV 1-4) se observan en la Tabla 8, en la cual podemos ver que los fármacos seleccionados tienen mejor afinidad hacia el dominio de helicasa de la proteína NS3 para los 4 serotipos de DENV.

**Tabla 8. Acoplamiento ciego para los cuatro serotipos de DENV**

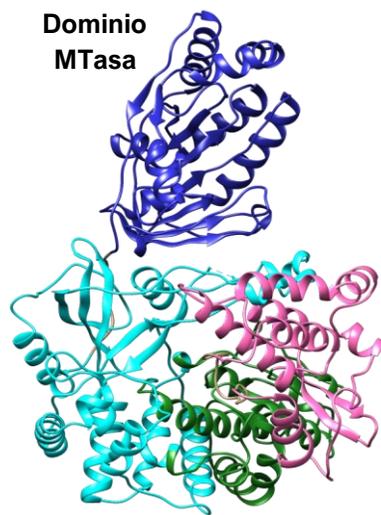
Fármacos	Serotipos	Energía de unión kcal/mol
Glibenclamida	DENV-1	-10.77
	DENV-2	-13.00
	DENV-3	-11.45
	DENV-4	-11.05
Irinotecán	DENV-1	-12.62
	DENV-2	-12.18
	DENV-3	-11.23
	DENV-4	-12.44
Simvastatina	DENV-1	-9.12
	DENV-2	-10.12
	DENV-3	-9.00
	DENV-4	-9.10

Además, con la finalidad de conocer si los tres fármacos pueden unirse a otras proteínas virales de DENV, se realizó un acoplamiento ciego dirigido hacia la

proteína NS5 de los cuatro serotipos de DENV, porque es otra de las proteínas con actividad enzimática que la hacen un objetivo terapéutico prometedor.

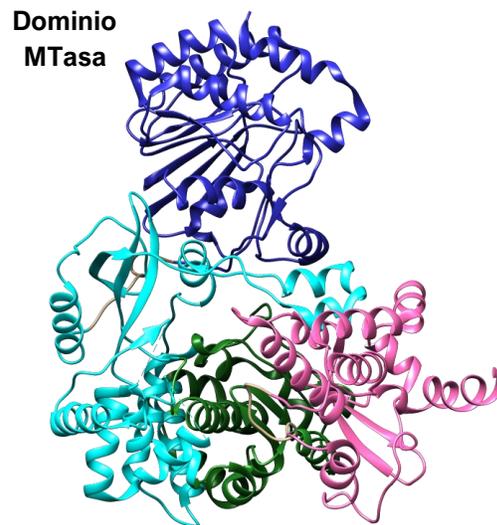
Por lo tanto, también se realizó la búsqueda de la estructura terciaria de la proteína NS5 para DENV-1, 2, 3 y 4 en la base de datos PDB. Sin embargo, solo se encontró reportada la estructura completa de NS5 para DENV-2 y DENV-3 reportadas con el código de acceso 5ZQK y 5CCV respectivamente (Figura 11).

**DENV-2 código de acceso 5ZQK**



**Dominio RdRp**

**DENV-3 código de acceso 5CCV**

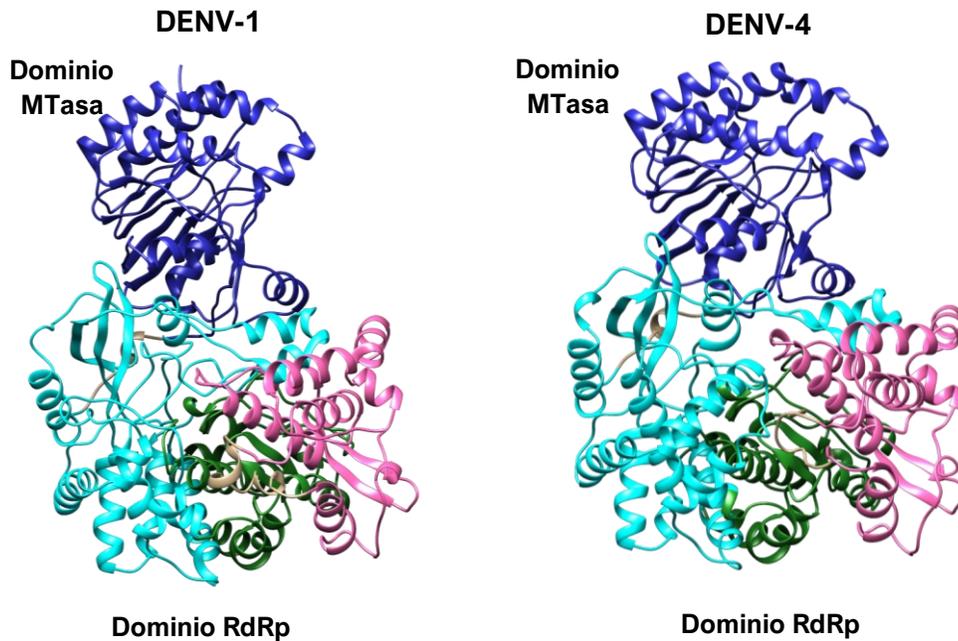


**Dominio RdRp**

**Figura 11. Predicción de la estructura terciaria de la proteína NS5 de DENV-2 y DENV-3.** Estructuras obtenidas de la base de datos PDB. Se observa el dominio metiltransferasa (MTasa) en color azul marino, el dominio ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) el cual está conformado por tres subdominios que corresponden a RdRp dedos en color azul cielo, RdRp palma en color verde y RdRp pulgar en color rosa.

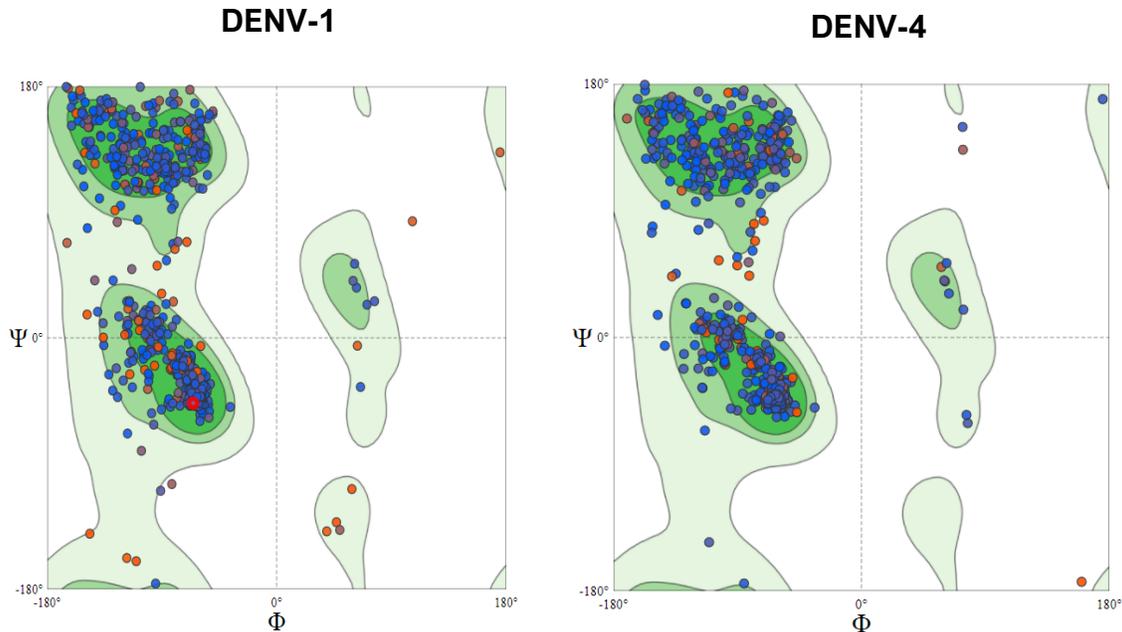
Por otra parte, las estructuras de NS5 de DENV-1 y DENV-4 fueron modeladas mediante el servidor Swiss model. Para la predicción se utilizó la secuencia de aminoácidos de la cepa de DENV-1 *Nauru/West Pac/1974* con número de acceso UniProtKB: P17763, mientras que, para DENV-4 se utilizó la cepa *Singapore/8976/1995* con número de acceso UniProtKB: Q5UCB8.

El programa predijo una estructura terciaria con un SeqID: 81.41% para DENV-1 y un SeqID: 77.26% para DENV-3, donde estos valores están dentro del rango de calidad del modelo 3D (Figura 12).



**Figura 12. Predicción de la estructura terciaria de la proteína NS5 de DENV-1 y DENV-4.** Estructura predicha en el programa Swiss model. Se observa el dominio metiltransferasa (MTasa) en color azul marino, el dominio ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) el cual está conformado por tres subdominios que corresponden a RdRp dedos en color azul cielo, RdRp palma en color verde y RdRp pulgar en color rosa.

Los modelos para DENV-1 y DENV-4 también fueron validados mediante el gráfico de Ramachandran (Swiss model), donde se pudo detectar que el 94.51% de los residuos se encuentran en la región favorecida para DENV-1 y el 96.33% para DENV-4 (Figura 13).



**Figura 13. Validación del modelo 3D de NS5 de DENV-1 y DENV-4.** La parcela de Ramachandran del modelo 3D se obtuvo del programa Swiss model, donde se pudo detectar que el 94.51% de los residuos se encuentran en la región favorecida, 4.8% de los residuos en la región permitida y el 0.69 % de los residuos en la región atípica para DENV-1. Para DENV-3, el 96.33% de los residuos se encuentran en la región favorecida, el 3.21% de los residuos en la región permitida y el 0.46% en la región atípica.

Los modelos también fueron validados por el servidor Verify3D dando como resultados que el 85.06% de los residuos de aminoácidos de la secuencia utilizada es compatible con el modelo 3D para DENV-1, mientras que, para DENV-4, el 88.79% de los residuos de aminoácidos de la secuencia es compatible con el modelo 3D.

Ahora bien, los resultados del acoplamiento ciego se observan en la Tabla 9 y cómo podemos ver en los resultados de acuerdo con la energía de unión con la que se unieron a la proteína NS5, podrían indicar que estos tres fármacos pueden ser afines a otras proteínas virales de DENV.

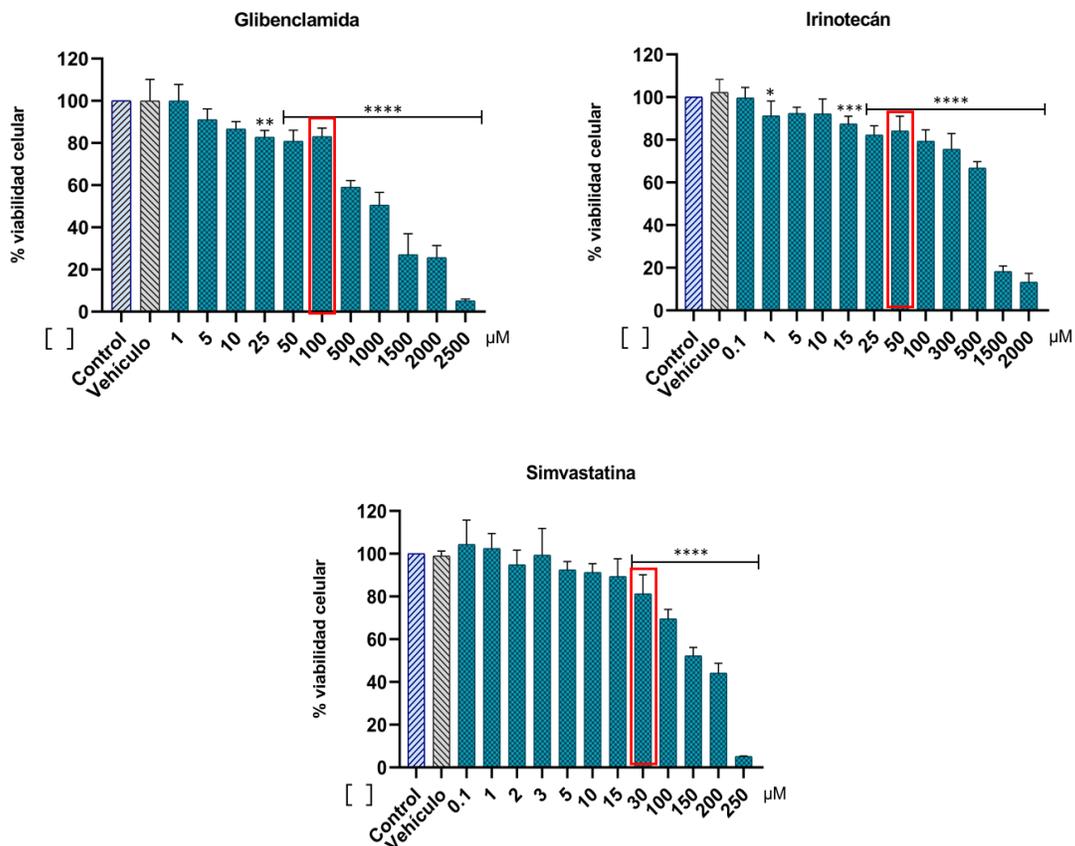
**Tabla 9. Acoplamiento ciego de NS5 para los cuatro serotipos de DENV**

<b>Fármacos</b>	<b>Serotipos</b>	<b>Energía de unión kcal/mol</b>
<b>Glibenclamida</b>	DENV-1	-11.54
	DENV-2	-12.45
	DENV-3	-10.2
	DENV-4	-11.56
<b>Irinotecán</b>	DENV-1	-12.11
	DENV-2	-12.72
	DENV-3	-11.26
	DENV-4	-12.09
<b>Simvastatina</b>	DENV-1	-8.38
	DENV-2	-10.06
	DENV-3	-10.7
	DENV-4	-8.9

Finalmente, estos resultados sugieren que los fármacos seleccionados pueden inhibir la infección con DENV al inhibir la actividad de la proteasa NS3 y de la replicasa NS5.

## Efecto del tratamiento con glibenclamida, irinotecán y simvastatina sobre la viabilidad celular en células Huh-7

Para poder analizar *in vitro* la capacidad de los fármacos seleccionados para inhibir la infección por DENV, se determinó la viabilidad de la línea celular Huh-7 tratadas con glibenclamida, irinotecán y simvastatina a diferentes concentraciones y se identificaron aquellas concentraciones que no comprometen la viabilidad. Para glibenclamida la concentración más alta fue de 100  $\mu\text{M}$ , para irinotecán fue de 50  $\mu\text{M}$  y para simvastatina fue de 30  $\mu\text{M}$  (Figura 14).



**Figura 14. Efecto de glibenclamida, irinotecán y simvastatina sobre la viabilidad celular en la línea Huh-7.** Las células Huh-7 se trataron con diferentes concentraciones de glibenclamida (1, 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1000, 1500, 2000, y 2500  $\mu\text{M}$  disueltos en DMSO); irinotecán (0.1, 1, 5, 10, 15, 25, 50, 100, 300, 500, 1500 y 2000  $\mu\text{M}$ ) y simvastatina (0.1, 1, 2, 3, 5, 10, 15, 30, 100, 150, 200 y 250  $\mu\text{M}$ ) durante 48 h. La viabilidad celular se determinó mediante ensayos MTT. Los recuadros rojos indican las concentraciones límites (CL) con viabilidad mayor al 80 %. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar del porcentaje de células viables normalizadas con respecto al control. \* $p=0.0332$ , \*\* $p=0.0021$ , \*\*\* $p=0.0002$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ .

## **Efecto del tratamiento con glibenclamida, irinotecán y simvastatina sobre la progenie viral en células Huh-7**

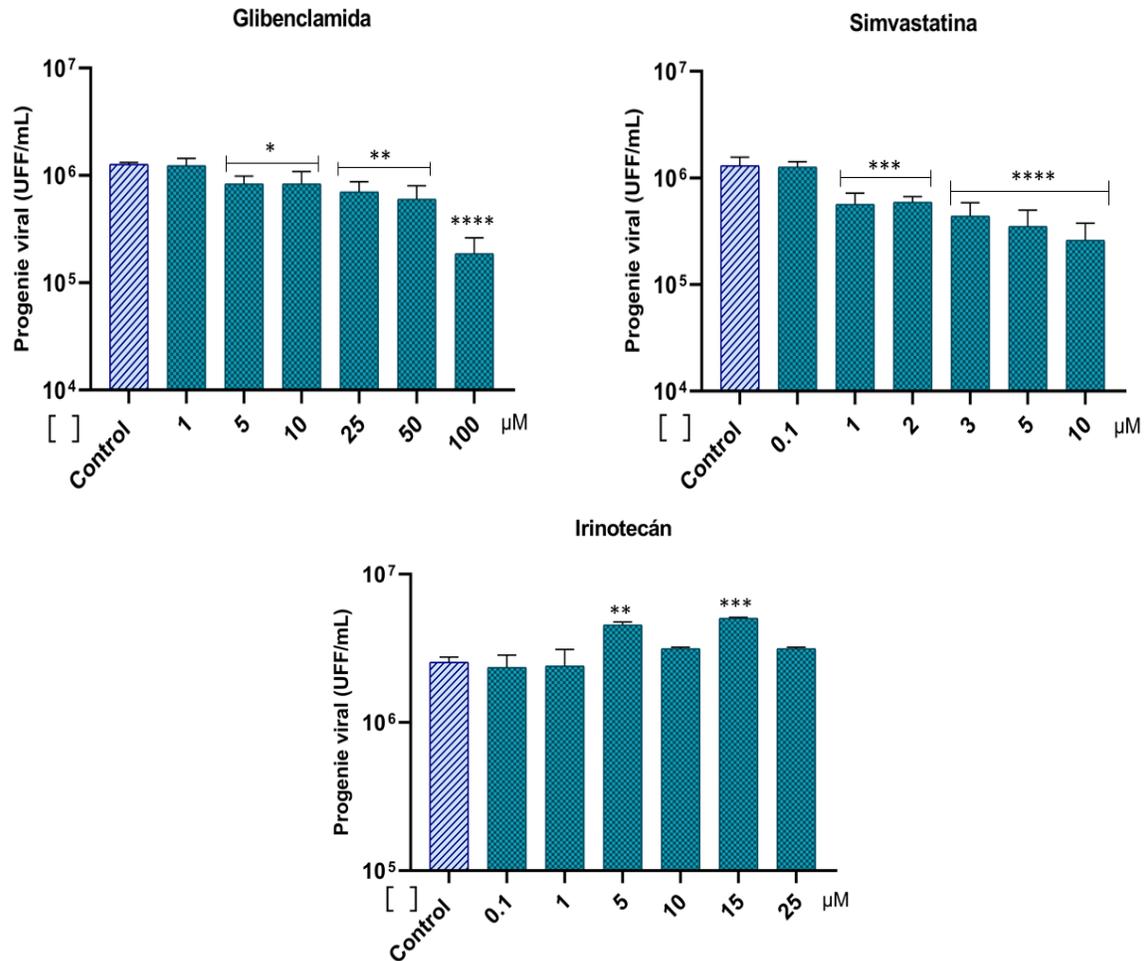
Una vez establecidas las concentraciones de cada fármaco que no afectan la viabilidad celular, analizamos su efecto en células Huh-7 infectadas con DENV-2 a una MOI de 1. Se seleccionaron las siguientes concentraciones de glibenclamida (1, 5, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ ), irinotecán (0.1, 1, 5, 10, 15, 25  $\mu\text{M}$ ) y simvastatina (0.1, 1, 2, 3, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ). Las células se incubaron durante 48 h, para evaluar su efecto sobre la producción de la progenie viral.

Interesantemente, los resultados de los ensayos de focos a partir de sobrenadantes de células infectadas y tratadas con glibenclamida y simvastatina mostraron que a partir de las concentraciones de 5 y 1  $\mu\text{M}$  respectivamente, empieza a haber una reducción estadísticamente significativa en la producción de la progenie viral 833333.33 UFF/mL y 566666.67 UFF/mL respectivamente, que es más pronunciada a las concentraciones de 100 y 10  $\mu\text{M}$ , 186666.67 UFF/mL y 260000 UFF/mL respectivamente (Figura 15).

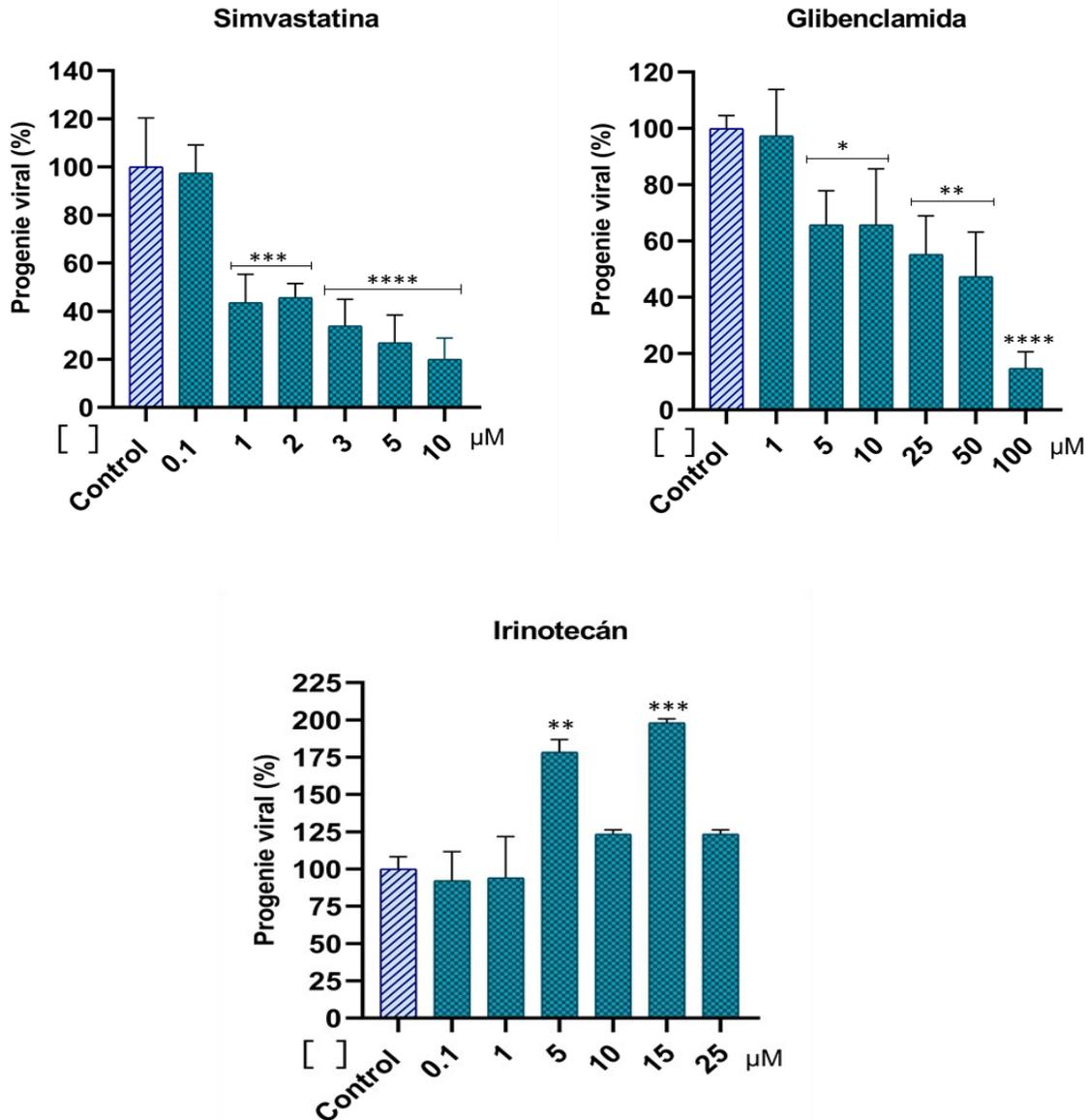
La progenie viral en valores de porcentaje se traduce en una reducción de hasta en un 86% para glibenclamida a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  y un 80 % en el caso de simvastatina a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  con respecto a sus controles. Estos resultados confirman el posible efecto antiviral de glibenclamida y simvastatina; pero no de irinotecán (Figura 16).

Para determinar el efecto de glibenclamida y simvastatina sobre la infección por DENV, se calculó el índice de selectividad (IS) para ambos fármacos basado en la relación  $CC_{50} / IC_{50}$ . Glibenclamida y simvastatina mostraron una  $CC_{50}$  de 605 y 125.5  $\mu\text{M}$  respectivamente, y para irinotecán fue de 568.5  $\mu\text{M}$ . Posteriormente, se calculó la  $IC_{50}$  para glibenclamida y simvastatina, los cuales inhibieron la infección de DENV-2 dependiente de la dosis con valores de  $IC_{50}$  de 25.07  $\mu\text{M}$  y 1.392  $\mu\text{M}$  respectivamente. La  $IC_{50}$  para el irinotecán no se calculó debido a que no se observó una reducción estadísticamente significativa en la producción de la progenie viral (Figura 17). Por lo tanto, los valores calculados del IS para glibenclamida y

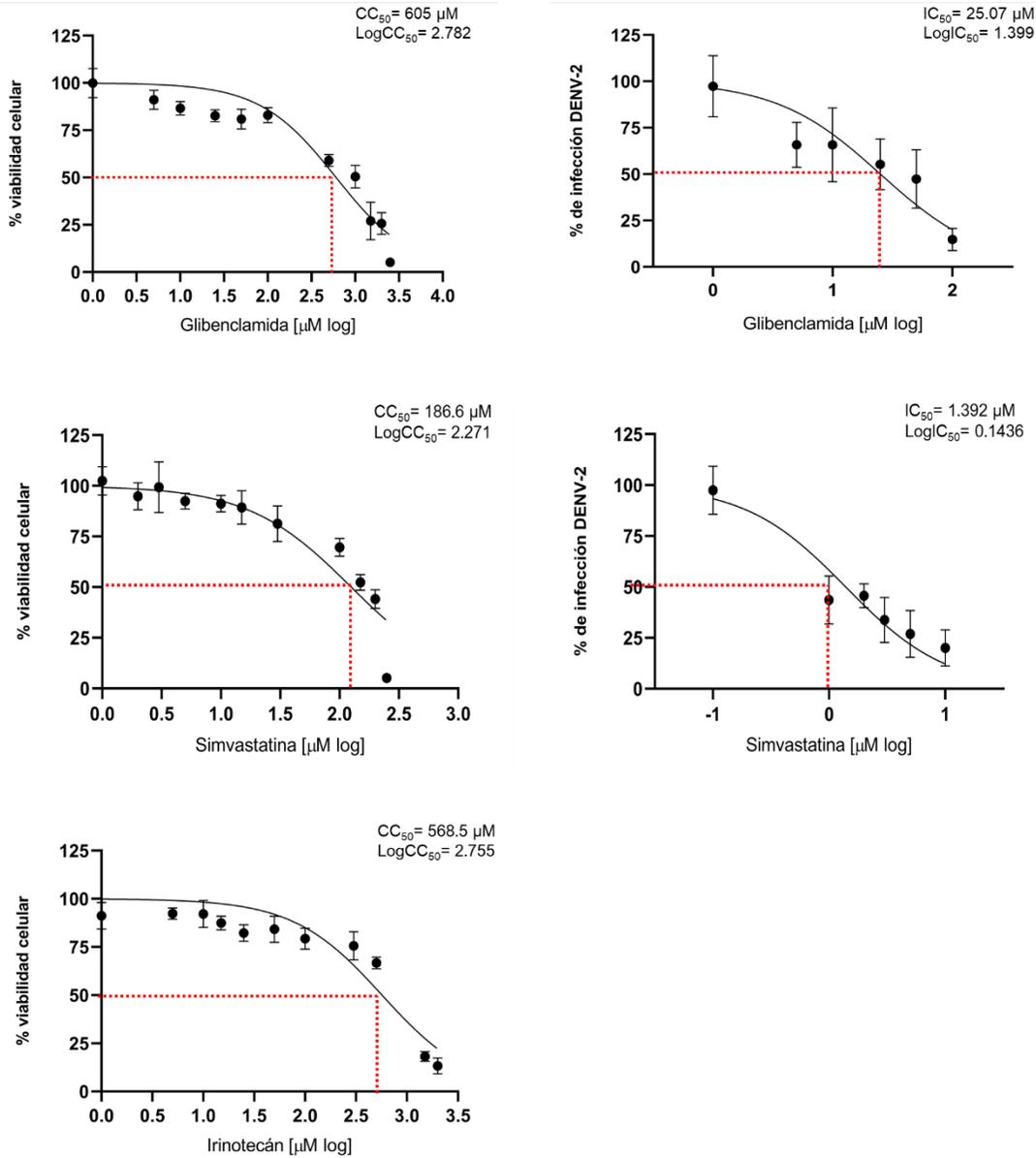
simvastatina fueron 24.13 y 134.05 respectivamente para las células Huh-7 (Tabla 10).



**Figura 15. Efecto de glibenclamida, simvastatina e irinotecán sobre la progenie viral de DENV-2 en células Huh-7.** El título viral se determinó por ensayos de focos, los resultados se expresaron en log de UFF/mL de tres ensayos independientes por duplicado. \* $p < 0.0332$ , \*\* $p = 0.0021$ , \*\*\* $p = 0.0002$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$ .



**Figura 16. Efecto de glibenclamida, simvastatina e irinotecán sobre la progenie viral de DENV-2 en células Huh-7 en porcentaje.** El título viral se determinó por ensayos de focos. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes por duplicado. Los resultados se normalizaron respecto al control. \* $p < 0.0332$ , \*\* $p = 0.0021$ , \*\*\* $p = 0.0002$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$ .



**Figura 17. Concentración citotóxica ( $CC_{50}$ ), concentración inhibitoria ( $IC_{50}$ ) e índice de selectividad (IS) de glibenclamida, simvastatina e irinotecán en células Huh-7 infectadas con DENV-2.** La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT a 48 h y mediante un análisis de regresión lineal se calculó la  $CC_{50}$ . El  $IC_{50}$  para glibenclamida y simvastatina se calculó en células Huh-7 infectadas con DENV-2 y el valor se estimó por un análisis de regresión lineal. Los resultados se representaron gráficamente con el software Graph Pad Prism versión 8.0.2.

**Tabla 10. Índice de selectividad de glibenclamida y simvastatina**

Fármacos	Línea celular	CC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	SI (CC <sub>50</sub> / IC <sub>50</sub> )
Glibenclamida	Huh-7	605	25.07	24.13
Simvastatina		186.6	1.392	134.05

Concentración citotóxica (CC<sub>50</sub>), concentración inhibitoria (IC<sub>50</sub>), índice de selectividad (SI).

Estos resultados nos indican que la IC<sub>50</sub> de ambos fármacos está por debajo de su CC<sub>50</sub>, es decir, tienen un efecto antiviral a concentraciones bajas y su efecto citotóxico es a concentraciones altas. Por lo tanto, se podría sugerir que ambos fármacos resultan eficientes y seguros frente a la infección por DENV, siendo el más prometedor simvastatina, al tener un IS más alto entre ambos.

## IX. DISCUSIÓN

La infección por dengue es un problema de salud, sumamente importante y creciente en todo el mundo. Actualmente, no se dispone de un tratamiento, ni de medicamentos, o vacunas efectivas para su control. Por lo tanto, sigue siendo necesario el desarrollo e identificación de nuevos fármacos como una alternativa de tratamiento antiviral. De manera convencional, el desarrollo de nuevos fármacos puede llevar varios años, en promedio de 12 a 16, agregando a esto el costo de su desarrollo, que requiere de 1 a 2 mil millones de dólares o más en algunos casos (García-Serradilla et al., 2019).

Por lo tanto, el reposicionamiento de fármacos se ha convertido en una estrategia eficaz que puede conducir a una aprobación menos costosa y más rápida encontrando un nuevo uso a fármacos que ya se encuentran aprobados para tratar otras enfermedades. La principal ventaja de esta estrategia es que la seguridad de los fármacos reposicionados ya ha sido bien establecida en humanos y otros modelos preclínicos, y ya han pasado por un número significativo de pruebas (García-Serradilla et al., 2019; Torres et al., 2019).

En los últimos años se han desarrollado numerosos programas computacionales para el reposicionamiento de fármacos, entre ellos, se encuentra el acoplamiento molecular, que se ha convertido en uno de los métodos *in silico* basado en estructuras, más popular y exitoso. Esta estrategia permite predecir la conformación en el sitio de unión de un fármaco al receptor objetivo y analizar su funcionalidad (Makhouri & Ghasemi, 2018).

El acoplamiento molecular es similar a un concepto de cerradura y llave, donde la llave que sería el fármaco o el ligando encuentra la orientación correcta para encajar en la cerradura que sería el objetivo o receptor. Por lo tanto, el acoplamiento molecular implica la predicción de la conformación del ligando con referencia a su posición y orientación dentro de los objetivos, junto con la evaluación de la afinidad de unión. Este enfoque ayuda a identificar interacciones novedosas que podrían ser

candidatas potenciales para el reposicionamiento de fármacos (Z. Y. Low et al., 2020; Pinzi & Rastelli, 2019).

En este estudio se exploraron 100 compuestos aprobados por la FDA disponibles en la base de datos ZINC15, y mediante acoplamiento molecular, se determinó su potencial de reutilización para la inhibición de la replicación de DENV-2 al dirigirse a la proteasa NS3, la cual se considera un objetivo terapéutico prometedor para el descubrimiento y diseño de fármacos antivirales. Esto debido a que NS3 tiene un papel importante en la replicación del genoma y en la síntesis de ARN viral; esto a través de la escisión de su poliproteína para dar lugar a las proteínas estructurales y no estructurales de DENV (Ahammad et al., 2019).

De los 100 fármacos analizados, se seleccionaron 3 candidatos como inhibidores potenciales de NS3pro de DENV-2, basándonos en su afinidad hacia el dominio de proteasa de NS3 de DENV-2, para explorar su efecto en un ensayo de infección; estos fármacos corresponden a glibenclamida, irinotecán y simvastatina, que tuvieron los siguientes valores de afinidad al sitio catalítico de la proteasa: -9.23, -9.15 y -8.54 kcal/mol, respectivamente.

Los posibles puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas que se predijeron entre los tres fármacos seleccionados y los residuos de aminoácidos de la triada catalítica (His 51, Asp 75 y Ser 135) de la proteasa NS3, podrían cambiar su conformación y alterar la función de la proteasa.

Por otra parte, un fármaco antiviral ideal para el dengue debe reducir significativamente la carga viral para prevenir la progresión de la enfermedad a dengue hemorrágico o síndrome de choque por dengue e inhibir los cuatro serotipos, ya que estos podrían co-circular en una misma área endémica. De acuerdo con nuestros resultados del acoplamiento molecular de tipo focalizado, se encontró que glibenclamida, irinotecán y simvastatina presentan una alta afinidad sobre la NS3pro de los cuatro serotipos.

Por otro lado, los resultados del acoplamiento ciego dirigido a las proteínas NS3 y NS5 de los cuatro serotipos de DENV, nos indicaron que en el caso de NS3, los

tres fármacos seleccionados mostraron una afinidad más alta hacia el dominio de helicasa, mientras que, para la proteína NS5, la afinidad de los fármacos fue más alta con respecto a NS3. NS5 también es considerado un objetivo terapéutico prometedor debido a su actividad enzimática de polimerasa dependiente de ARN. Faltaría por determinar el efecto antiviral de los fármacos seleccionados para los serotipos de DENV-1, DENV-3 y DENV-4 *in vitro* e identificar qué actividad enzimática de las proteínas NS3 y NS5 podría estarse inhibiendo, ya que los tres fármacos fueron altamente afines a ambas proteínas virales.

Ahora bien, para explorar si los resultados *in silico* son predictivos de la actividad antiviral contra DENV-2, se evaluó el efecto de los fármacos sobre la infección con DENV-2 *in vitro*. Como podemos observar en la Figura 16 tanto glibenclamida como simvastatina mostraron un efecto antiviral pronunciado sobre la producción de partículas virales de DENV-2 en células Huh-7. El efecto antiviral de glibenclamida tuvo un valor de  $CC_{50}$  de 605  $\mu$ M y un IS de 24.13 y disminuyó un 86 % la cantidad de progenie viral a la concentración más alta, mientras que, los valores de simvastatina fueron una  $CC_{50}$  de 186.6  $\mu$ M y un IS de 134.05, con una disminución del 80 % de la progenie viral a la concentración mayor. Sin embargo, queda por determinar si este efecto antiviral se debe a la pérdida de la actividad de la proteasa NS3 o bien, podría deberse, (sobre todo para el caso de la simvastatina), al mecanismo de acción general que presentan las estatinas, que es inhibir de manera reversible a la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa (HMGCR), involucrada en la biosíntesis del colesterol (Chia et al., 2018). En este sentido, en los últimos años se ha demostrado que el colesterol es fundamental durante la infección por flavivirus, ya que facilita la entrada viral, la formación de complejos replicativos, el ensamblaje, la salida y el control de la respuesta al interferón tipo I (Osuna-Ramos et al., 2018; Welsch et al., 2009).

Además, en nuestro laboratorio, se ha reportado que la infección por DENV estimula a las células huésped para aumentar la síntesis de colesterol intracelular regulando al alza la actividad enzimática de HMG-CoA reductasa (Soto-Acosta et al., 2017). Por lo tanto, si ocurre un bloqueo en la síntesis del colesterol debido al tratamiento

con simvastatina, es de esperarse que haya una disminución en la infección de DENV, como ha sido reportado en otros estudios *in vitro* (Bryan-Marrugo et al., 2016; Martínez-Gutierrez et al., 2011) e *in vivo* (Martinez-Gutierrez et al., 2014). Simvastatina, también ha mostrado tener un efecto antiviral contra otros virus entre ellos, el virus del de Epstein-Barr (Katano et al., 2004), VIH-1 (András et al., 2010), Influenza A (MEHRBOD et al., 2014), VHC (del Campo et al., 2018), y ZIKV (Españoles et al., 2019).

Un punto clave que hace aún más interesante la posible reutilización de simvastatina, es que, en general, las estatinas muestran un gran número de efectos pleiotrópicos (es decir, independientes del colesterol) que contribuyen a su eficacia como agentes terapéuticos y al presentar un amplio rango de acción, las estatinas presentan un gran potencial para ser reutilizadas para el tratamiento de otras enfermedades como se describen en la Tabla 6 para el caso específico de simvastatina.

Por otro lado, glibenclamida también es un fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, pertenece al grupo de las sulfonilureas y posee un efecto hipoglucemiante al estimular la liberación de insulina por las células beta del páncreas. Su mecanismo de acción consiste en inhibir al receptor 1 de sulfonilurea (Sur1) que está situado en la membrana de la célula beta, que junto con una unidad interna Kir 6.2, forman parte de los denominados canales dependientes de  $K^+$  ATP. Esta unión provoca un cierre de los citados canales, con despolarización de la membrana celular y la ulterior apertura de canales de  $Ca^{++}$  dependientes de voltaje, lo que favorece el tránsito intracelular de este ión hacia el citoplasma y la posterior exocitosis de insulina (Jha et al., 2018; Shuster et al., 2014; X. Wang et al., 2020). De acuerdo con la literatura consultada, hasta el momento no se ha reportado un posible efecto antiviral para glibenclamida, por consiguiente, queda por dilucidar el posible mecanismo por el cual glibenclamida indujo una reducción de la progenie viral de DENV-2 en hasta un 86 %, que como es el caso de simvastatina, podría ser debido a la pérdida de la actividad de NS3pro u otro.

Por último, irinotecán es un fármaco derivado de la camptotecina, y actualmente, se usa ampliamente en el tratamiento del cáncer colorectal, de páncreas y de pulmón y otros tumores sólidos. Actúa como un profármaco que se activa a 7-etil-10-hidroxicamptotecina (SN-38) por la carboxilesterasa 2 en la sangre y el hígado. SN-38 es un potente inhibidor de la ADN topoisomerasa I, una enzima esencial que controla los cambios estructurales del ADN al relajar su superenrollamiento y religar sus hebras escindidas durante su replicación y transcripción. SN-38 puede unirse al complejo ADN-topoisomerasa I para formar un complejo ternario estable que previene la religación de las cadenas de ADN e interfiere con la horquilla de replicación en movimiento, lo que induce la detención de la replicación y roturas letales del ADN de doble cadena y, en última instancia, la muerte celular (Bailly, 2019; Bao et al., 2019; de Man et al., 2018). Sin embargo, de acuerdo con los resultados irinotecán no tuvo un efecto antiviral frente a la infección por DENV-2 con las concentraciones empleadas (0.1, 1, 5, 10, 15 y 25  $\mu\text{M}$ ), a pesar de que en el análisis *in silico* presentó una afinidad de -9.15 kcal/mol a NS3, por lo tanto, quedaría por determinar si a concentraciones más altas, que no comprometan el 80 % de la viabilidad celular, pudiera tener un efecto antiviral.

Finalmente, el desarrollo de fármacos terapéuticos a partir de herramientas bioinformáticas como el acoplamiento molecular seguirá siendo importante, ya que desde su primer uso a mediados de la década de los 1970s (Pinzi & Rastelli, 2019), ha demostrado ser una herramienta importante para ayudar a comprender cómo los compuestos químicos interactúan con sus objetivos moleculares y para el descubrimiento y desarrollo de fármacos, además de que aún existen muchos fármacos que pudieran tener un efecto antiviral no solo frente al DENV, sino también, otras enfermedades virales de importancia clínica.

## X. CONCLUSIONES

El acoplamiento molecular de tipo focalizado nos permitió identificar tres fármacos: glibenclamida, irinotecán y simvastatina, afines al dominio de proteasa de NS3 de DENV-2.

Glibenclamida y simvastatina, fueron capaces de reducir significativamente la producción de la progenie viral. Siendo simvastatina el que presenta una toxicidad más baja ( $CC_{50} = 186.6$ ) y un índice de selectividad alto (134.05), que lo hacen un excelente candidato potencial para el tratamiento de la infección por DENV.

## XI. PERSPECTIVAS

- ❖ Determinar si hay una disminución de la replicación de genoma viral, mediante qRT-PCR en células tratadas y no tratadas con los fármacos.
- ❖ Determinar el porcentaje de células infectadas y los efectos en la distribución de proteínas virales tratadas con los fármacos.
- ❖ Comprobar si glibenclamida y simvastatina inhiben la actividad enzimática de NS3 o NS5.
- ❖ Explorar el efecto de la combinación de glibenclamida y simvastatina, considerando un posible efecto sinérgico que logre inhibir en un mayor porcentaje la infección viral.
- ❖ Evaluar el efecto de glibenclamida y simvastatina en un modelo *in vivo* de infección con DENV.
- ❖ Evaluar el efecto de glibenclamida y simvastatina en otros miembros de la familia *Flaviviridae*.

## REFERENCIAS

Ahammad, F., Tengku Abd Rashid, T. R., Mohamed, M., Tanbin, S., & Ahmad Fuad, F. A. (2019). Contemporary Strategies and Current Trends in Designing Antiviral Drugs against Dengue Fever via Targeting Host-Based Approaches. *Microorganisms*, 7(9), 296.

Al-Rasheed, N. M., Al-Rasheed, N. M., Hasan, I. H., Al-Amin, M. A., Al-Ajmi, H. N., Mohamad, R. A., & Mahmoud, A. M. (2017). Simvastatin Ameliorates Diabetic Cardiomyopathy by Attenuating Oxidative Stress and Inflammation in Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017.

András, I. E., Eum, S. Y., Huang, W., Zhong, Y., Hennig, B., & Toborek, M. (2010). HIV-1-INDUCED AMYLOID BETA ACCUMULATION IN BRAIN ENDOTHELIAL CELLS IS ATTENUATED BY SIMVASTATIN. *Molecular and cellular neurosciences*, 43(2), 232.

Aravapalli, S., Lai, H., Teramoto, T., Alliston, K. R., Lushington, G. H., Ferguson, E. L., Padmanabhan, R., & Groutas, W. C. (2012). Inhibitors of Dengue Virus and West Nile Virus Proteases Based on the Aminobenzamide Scaffold. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(13), 4140-4148.

Assenberg, R., Mastrangelo, E., Walter, T. S., Verma, A., Milani, M., Owens, R. J., Stuart, D. I., Grimes, J. M., & Mancini, E. J. (2009). Crystal Structure of a Novel Conformational State of the Flavivirus NS3 Protein: Implications for Polyprotein Processing and Viral Replication. *Journal of Virology*, 83(24), 12895-12906.

Bai, F., Yu, Z., Gao, X., Gong, J., Fan, L., & Liu, F. (2019). Simvastatin induces breast cancer cell death through oxidative stress up-regulating miR-140-5p. *Aging (Albany NY)*, 11(10), 3198-3219.

Bailly, C. (2019). Irinotecan: 25 years of cancer treatment. *Pharmacological Research*, 148, 104398.

Bao, X., Wu, J., Kim, S., LoRusso, P., & Li, J. (2019). Pharmacometabolomics Reveals Irinotecan Mechanism of Action in Cancer Patients. *Journal of clinical pharmacology*, 59(1), 20-34.

Barrows, N. J., Campos, R. K., Liao, K.-C., Prasanth, K. R., Soto-Acosta, R., Yeh, S.-C., Schott-Lerner, G., Pompon, J., Sessions, O. M., Bradrick, S. S., & Garcia-Blanco, M. A. (2018). Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chemical reviews*, 118(8), 4448-4482.

Bastos Lima, A., Behnam, M. A. M., El Sherif, Y., Nitsche, C., Vecchi, S. M., & Klein, C. D. (2015). Dual inhibitors of the dengue and West Nile virus NS2B-NS3 proteases: Synthesis, biological evaluation and docking studies of novel peptide-hybrids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(17), 5748-5755.

Behnam, M. A. M., Graf, D., Bartenschlager, R., Zlotos, D. P., & Klein, C. D. (2015). Discovery of Nanomolar Dengue and West Nile Virus Protease Inhibitors Containing a 4-Benzoyloxyphenylglycine Residue. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(23), 9354-9370.

Bhakat, S., Delang, L., Kaptein, S., Neyts, J., Leyssen, P., & Jayaprakash, V. (2015). Reaching beyond HIV/HCV: Nelfinavir as a potential starting point for broad-spectrum protease inhibitors against dengue and chikungunya virus. *RSC Advances*, 5(104), 85938-85949.

Blight, J., Alves, E., & Reyes-Sandoval, A. (2019). Considering Genomic and Immunological Correlates of Protection for a Dengue Intervention. *Vaccines*, 7(4).

Bodiga, V. L., Eda, S. R., Chavali, S., Revur, N. N., Zhang, A., Thokala, S., & Bodiga, S. (2014). In vitro biological evaluation of glyburide as potential inhibitor of collagenases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 187-192.

- Bowie, J. U., Lüthy, R., & Eisenberg, D. (1991). A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science (New York, N.Y.)*, 253(5016), 164-170.
- Boyle, A. K., Rinaldi, S. F., Rossi, A. G., Saunders, P. T. K., & Norman, J. E. (2019). Repurposing simvastatin as a therapy for preterm labor: Evidence from preclinical models. *The FASEB Journal*, 33(2), 2743-2758.
- Bruno, B. J., Miller, G. D., & Lim, C. S. (2013). Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery. *Therapeutic delivery*, 4(11), 1443-1467.
- Bryan-Marrugo, O. L., Arellanos-Soto, D., Rojas-Martinez, A., Barrera-Saldaña, H., Ramos-Jimenez, J., Vidaltamayo, R., & Rivas-Estilla, A. M. (2016). The anti-dengue virus properties of statins may be associated with alterations in the cellular antiviral profile expression. *Molecular Medicine Reports*, 14(3), 2155-2163.
- Chan, D., Binks, S., Nicholas, J. M., Frost, C., Cardoso, M. J., Ourselin, S., Wilkie, D., Nicholas, R., & Chataway, J. (2017). Effect of high-dose simvastatin on cognitive, neuropsychiatric, and health-related quality-of-life measures in secondary progressive multiple sclerosis: Secondary analyses from the MS-STAT randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet. Neurology*, 16(8), 591-600.
- Chen, M.-C., Tsai, Y.-C., Tseng, J.-H., Liou, J.-J., Horng, S., Wen, H.-C., Fan, Y.-C., Zhong, W.-B., & Hsu, S.-P. (2017). Simvastatin Inhibits Cell Proliferation and Migration in Human Anaplastic Thyroid Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12).
- Chia, P. Y., Htun, H. L., Ling, W. P., Leo, Y. S., Yeo, T. W., & Lye, D. C. B. (2018). Hyperlipidemia, statin use and dengue severity. *Scientific Reports*, 8, 17147.
- Chu, J. J. H., Lee, R. C. H., Ang, M. J. Y., Wang, W.-L., Lim, H. A., Wee, J. L. K., Joy, J., Hill, J., & Brian Chia, C. S. (2015). Antiviral activities of 15 dengue NS2B-NS3 protease inhibitors using a human cell-based viral quantification assay. *Antiviral Research*, 118, 68-74.
- Cocca, C., Martín, G., Núñez, M., Gutiérrez, A., Cricco, G., Mohamad, N., Medina, V., Croci, M., Crescenti, E., Rivera, E., & Bergoc, R. (2005). Effect of glibenclamide on N-nitroso-N-methylurea-induced mammary tumors in diabetic and nondiabetic rats. *Oncology Research*, 15(6), 301-311.
- Cruz-Oliveira, C., Freire, J. M., Conceição, T. M., Higa, L. M., Castanho, M. A. R. B., & Da Poian, A. T. (2015). Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(2), 155-170.
- da Silva-Júnior, E. F., & de Araújo-Júnior, J. X. (2019). Peptide derivatives as inhibitors of NS2B-NS3 protease from Dengue, West Nile, and Zika flaviviruses. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 27(18), 3963-3978.
- De Jesús-González, L. A., Cervantes-Salazar, M., Reyes-Ruiz, J. M., Osuna-Ramos, J. F., Farfán-Morales, C. N., Palacios-Rápalo, S. N., Pérez-Olais, J. H., Cordero-Rivera, C. D., Hurtado-Monzón, A. M., Ruíz-Jiménez, F., Gutiérrez-Escolano, A. L., & del Ángel, R. M. (2020). The Nuclear Pore Complex: A Target for NS3 Protease of Dengue and Zika Viruses. *Viruses*, 12(6), 583.
- de Man, F. M., Goey, A. K. L., van Schaik, R. H. N., Mathijssen, R. H. J., & Bins, S. (2018). Individualization of Irinotecan Treatment: A Review of Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Pharmacogenetics. *Clinical Pharmacokinetics*, 57(10), 1229-1254.
- de Sousa, L. R. F., Wu, H., Nebo, L., Fernandes, J. B., da Silva, M. F. das G. F., Kiefer, W., Kanitz, M., Bodem, J., Diederich, W. E., Schirmeister, T., & Vieira, P. C. (2015). Flavonoids as noncompetitive inhibitors of Dengue virus NS2B-NS3 protease: Inhibition kinetics and docking studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(3), 466-470.

- del Campo, J. A., García-Valdecasas, M., Gil-Gómez, A., Rojas, Á., Gallego, P., Ampuero, J., Gallego-Durán, R., Pastor, H., Grande, L., Padillo, F. J., Muntané, J., & Romero-Gómez, M. (2018). Simvastatin and metformin inhibit cell growth in hepatitis C virus infected cells via mTOR increasing PTEN and autophagy. *PLoS ONE*, *13*(1).
- Diamond, M. S., & Pierson, T. C. (2015). Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and its Implications for Disease Control. *Cell*, *162*(3), 488-492.
- Dwivedi, V. D., Arya, A., Yadav, P., Kumar, R., Kumar, V., & Raghava, G. P. S. (2020). DenvInD: Dengue virus inhibitors database for clinical and molecular research. *Briefings in Bioinformatics*, bbaa098.
- Erkkilä, L., Jauhiainen, M., Laitinen, K., Haasio, K., Tirola, T., Saikku, P., & Leinonen, M. (2005). Effect of Simvastatin, an Established Lipid-Lowering Drug, on Pulmonary Chlamydia pneumoniae Infection in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(9), 3959-3962.
- Español, E., Nam, J.-H., Song, E.-J., Song, D., Lee, C.-K., & Kim, J.-K. (2019). Lipophilic statins inhibit Zika virus production in Vero cells. *Scientific Reports*, *9*, 11461.
- Ferreira, L. G., dos Santos, R. N., Oliva, G., & Andricopulo, A. D. (2015). Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules*, *20*(7), 13384-13421.
- García-Serradilla, M., Risco, C., & Pacheco, B. (2019). Drug repurposing for new, efficient, broad spectrum antivirals. *Virus Research*, *264*, 22-31.
- Gerzanich, V., Makar, T. K., Guda, P. R., Kwon, M. S., Stokum, J. A., Woo, S. K., Ivanova, S., Ivanov, A., Mehta, R. I., Morris, A. B., Bryan, J., Bever, C. T., & Marc Simard, J. (2017). Salutary effects of glibenclamide during the chronic phase of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroinflammation*, *14*.
- Guerra-De-Blas, P. D. C., Bobadilla-Del-Valle, M., Sada-Ovalle, I., Estrada-García, I., Torres-González, P., López-Saavedra, A., Guzmán-Beltrán, S., Ponce-de-León, A., & Sifuentes-Osornio, J. (2019). Simvastatin Enhances the Immune Response Against Mycobacterium tuberculosis. *Frontiers in Microbiology*, *10*.
- Guzman, M. G., Gubler, D. J., Izquierdo, A., Martinez, E., & Halstead, S. B. (2016). Dengue infection. *Nature Reviews Disease Primers*, *2*(1), 1-25.
- H, L., R, W., Y, S., Y, Y., J, C., X, L., X, S., & H, L. (2014, noviembre 15). *Identification of novel thiadiazoloacrylamide analogues as inhibitors of dengue-2 virus NS2B/NS3 protease*. Bioorganic & medicinal chemistry; Bioorg Med Chem.
- Huang, K., Hu, Y., Wu, Y., Ji, Z., Wang, S., Lin, Z., Xu, J., & Pan, S. (2019). Exploratory analysis of oral glibenclamide in acute ischemic stroke. *Acta Neurologica Scandinavica*, *140*(3), 212-218.
- Huang, Y.-W., Lee, C.-T., Wang, T.-C., Kao, Y.-C., Yang, C.-H., Lin, Y.-M., & Huang, K.-S. (2018). The Development of Peptide-based Antimicrobial Agents against Dengue Virus. *Current Protein & Peptide Science*, *19*(10), 998-1010.
- Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J., & Goodsell, D. S. (2007). A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *Journal of Computational Chemistry*, *28*(6), 1145-1152.
- Jha, R. M., Molyneaux, B. J., Jackson, T. C., Wallisch, J. S., Park, S.-Y., Poloyac, S., Vagni, V. A., Janesko-Feldman, K. L., Hoshitsuki, K., Minnigh, M. B., & Kochanek, P. M. (2018). Glibenclamide Produces Region-Dependent Effects on Cerebral Edema in a Combined Injury Model of Traumatic Brain Injury and Hemorrhagic Shock in Mice. *Journal of Neurotrauma*, *35*(17), 2125-2135.

- Katano, H., Pesnicak, L., & Cohen, J. I. (2004). Simvastatin induces apoptosis of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed lymphoblastoid cell lines and delays development of EBV lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(14), 4960-4965.
- Kato, F., & Hishiki, T. (2016). Dengue Virus Reporter Replicon is a Valuable Tool for Antiviral Drug Discovery and Analysis of Virus Replication Mechanisms. *Viruses*, *8*(5).
- Keil, A., Hall, S. R., Körner, M., Herrmann, M., Schmid, R. A., & Frese, S. (2016). Suppression of lupus nephritis and skin lesions in MRL/lpr mice by administration of the topoisomerase I inhibitor irinotecan. *Arthritis Research & Therapy*, *18*.
- Koh, G. C. K. W., Maude, R. R., Schreiber, M. F., Limmathurotsakul, D., Wiersinga, W. J., Wuthiekanun, V., Lee, S. J., Mahavanakul, W., Chaowagul, W., Chierakul, W., White, N. J., van der Poll, T., Day, N. P. J., Dougan, G., & Peacock, S. J. (2011). Glyburide Is Anti-inflammatory and Associated with Reduced Mortality in Melioidosis. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *52*(6), 717-725.
- Koh, G. C. K. W., Weehuizen, T. A., Breitbach, K., Krause, K., de Jong, H. K., Kager, L. M., Hoogendijk, A. J., Bast, A., Peacock, S. J., van der Poll, T., Steinmetz, I., & Wiersinga, W. J. (2013). Glyburide Reduces Bacterial Dissemination in a Mouse Model of Melioidosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *7*(10).
- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C. T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P. R., Strauss, E. G., Baker, T. S., & Strauss, J. H. (2002). Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. *Cell*, *108*(5), 717-725.
- Lai, H., Prasad, G. S., & Padmanabhan, R. (2013). Characterization of 8-hydroxyquinoline derivatives containing aminobenzothiazole as inhibitors of dengue virus type 2 protease in vitro. *Antiviral research*, *97*(1), 74-80.
- Lau, C. P. Y., Fung, C. S. H., Wong, K. C., Wang, Y.-H., Huang, L., Tsui, S. K. W., Lee, O. K., & Kumta, S. M. (2020). Simvastatin Possesses Antitumor and Differentiation-Promoting Properties That Affect Stromal Cells in Giant Cell Tumor of Bone. *Journal of Orthopaedic Research*, *38*(2), 297-310.
- Lescar, J., Luo, D., Xu, T., Sampath, A., Lim, S. P., Canard, B., & Vasudevan, S. G. (2008). Towards the design of antiviral inhibitors against flaviviruses: The case for the multifunctional NS3 protein from Dengue virus as a target. *Antiviral Research*, *80*(2), 94-101.
- Lin, C.-Y., Huang, C.-H., & Chen, Y.-H. (2013). Classification of dengue: The clinical use of World Health Organization 2009 guideline. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi*, *112*(2), 61-63.
- Lin, Y.-W., Liu, P.-S., Pook, K. A., & Wei, L.-N. (2018). Glyburide and retinoic acid synergize to promote wound healing by anti-inflammation and RIP140 degradation. *Scientific Reports*, *8*.
- Lionta, E., Spyrou, G., Vassilatis, D. K., & Cournia, Z. (2014). Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: Principles, Applications and Recent Advances. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *14*(16), 1923-1938.
- Loos, J. A., Churio, M. S., & Cumino, A. C. (2017). Anthelmintic activity of glibenclamide on secondary cystic echinococcosis in mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(11).
- Low, J. G., Sung, C., Wijaya, L., Wei, Y., Rathore, A. P. S., Watanabe, S., Tan, B. H., Toh, L., Chua, L. T., Hou, Y., Chow, A., Howe, S., Chan, W. K., Tan, K. H., Chung, J. S., Cherng, B. P., Lye, D. C., Tambayah, P. A., Ng, L. C., ... Vasudevan, S. G. (2014). Efficacy and safety of celgosivir in patients

with dengue fever (CELADEN): A phase 1b, randomised, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept trial. *The Lancet. Infectious Diseases*, 14(8), 706-715.

Low, Z. Y., Farouk, I. A., & Lal, S. K. (2020). Drug Repositioning: New Approaches and Future Prospects for Life-Debilitating Diseases and the COVID-19 Pandemic Outbreak. *Viruses*, 12(9), 1058.

Luo, D., Vasudevan, S. G., & Lescar, J. (2015). The flavivirus NS2B–NS3 protease–helicase as a target for antiviral drug development. *Antiviral Research*, 118, 148-158.

Lüthy, R., Bowie, J. U., & Eisenberg, D. (1992). Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, 356(6364), 83-85.

Maia, E. H. B., Assis, L. C., de Oliveira, T. A., da Silva, A. M., & Taranto, A. G. (2020). Structure-Based Virtual Screening: From Classical to Artificial Intelligence. *Frontiers in Chemistry*, 8.

Makhouri, F. R., & Ghasemi, J. B. (2018). In Silico Studies in Drug Research Against Neurodegenerative Diseases. *Current Neuropharmacology*, 16(6), 664-725.

Martínez-Gutiérrez, M., Castellanos, J. E., & Gallego-Gómez, J. C. (2011). Statins reduce dengue virus production via decreased virion assembly. *Intervirology*, 54(4), 202-216.

Martínez-Gutiérrez, M., Correa-Londoño, L. A., Castellanos, J. E., Gallego-Gómez, J. C., & Osorio, J. E. (2014). Lovastatin Delays Infection and Increases Survival Rates in AG129 Mice Infected with Dengue Virus Serotype 2. *PLoS ONE*, 9(2).

MEHRBOD, P., HAIR-BEJO, M., IBRAHIM, T. A. T., OMAR, A. R., EL ZOWALATY, M., AJDARI, Z., & IDERIS, A. (2014). Simvastatin modulates cellular components in influenza A virus-infected cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 34(1), 61-73.

Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design*, 7(2), 146-157.

Millies, B., von Hammerstein, F., Gellert, A., Hammerschmidt, S., Barthels, F., Göppel, U., Immerheiser, M., Elgner, F., Jung, N., Basic, M., Kersten, C., Kiefer, W., Bodem, J., Hildt, E., Windbergs, M., Hellmich, U. A., & Schirmeister, T. (2019). Proline-Based Allosteric Inhibitors of Zika and Dengue Virus NS2B/NS3 Proteases. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(24), 11359-11382.

Minnema, A. J., Mehta, A., Boling, W. W., Schwab, J., Simard, J. M., & Farhadi, H. F. (2019). SCING—Spinal Cord Injury Neuroprotection with Glyburide: A pilot, open-label, multicentre, prospective evaluation of oral glyburide in patients with acute traumatic spinal cord injury in the USA. *BMJ Open*, 9(10).

Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., & Olson, A. J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, 19(14), 1639-1662.

Morris, G. M., Goodsell, D. S., Huey, R., & Olson, A. J. (1996). Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: Parallel applications of AutoDock 2.4. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 10(4), 293-304.

Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of computational chemistry*, 30(16), 2785-2791.

Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1), 13-22.

- Murugesan, A., & Manoharan, M. (2020). Dengue Virus. *Emerging and Reemerging Viral Pathogens*, 281-359.
- Nakayama, S., Taguchi, N., Isaka, Y., Nakamura, T., & Tanaka, M. (2018). Glibenclamide and Therapeutic Hypothermia Have Comparable Effect on Attenuating Global Cerebral Edema Following Experimental Cardiac Arrest. *Neurocritical Care*, 29(1), 119-127.
- Nguyen, N. M., Tran, C. N. B., Phung, L. K., Duong, K. T. H., Huynh, H. le A., Farrar, J., Nguyen, Q. T. H., Tran, H. T., Nguyen, C. V. V., Merson, L., Hoang, L. T., Hibberd, M. L., Aw, P. P. K., Wilm, A., Nagarajan, N., Nguyen, D. T., Pham, M. P., Nguyen, T. T., Javanbakht, H., ... Simmons, C. P. (2013). A Randomized, Double-Blind Placebo Controlled Trial of Balapiravir, a Polymerase Inhibitor, in Adult Dengue Patients. *The Journal of Infectious Diseases*, 207(9), 1442-1450.
- Nitsche, C., Holloway, S., Schirmeister, T., & Klein, C. D. (2014). Biochemistry and medicinal chemistry of the dengue virus protease. *Chemical Reviews*, 114(22), 11348-11381.
- Nitsche, C., Schreier, V. N., Behnam, M. A. M., Kumar, A., Bartenschlager, R., & Klein, C. D. (2013). Thiazolidinone-peptide hybrids as dengue virus protease inhibitors with antiviral activity in cell culture. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(21), 8389-8403.
- Nitsche, C., Steuer, C., & Klein, C. D. (2011). Arylcianoacrylamides as inhibitors of the Dengue and West Nile virus proteases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(24), 7318-7337.
- Nitsche, C., Zhang, L., Weigel, L. F., Schilz, J., Graf, D., Bartenschlager, R., Hilgenfeld, R., & Klein, C. D. (2017). Peptide-Boronic Acid Inhibitors of Flaviviral Proteases: Medicinal Chemistry and Structural Biology. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(1), 511-516.
- Núñez, M., Medina, V., Cricco, G., Croci, M., Cocca, C., Rivera, E., Bergoc, R., & Martín, G. (2013). Glibenclamide inhibits cell growth by inducing G0/G1 arrest in the human breast cancer cell line MDA-MB-231. *BMC Pharmacology & Toxicology*, 14, 6.
- Osuna-Ramos, J. F., Reyes-Ruiz, J. M., & del Ángel, R. M. (2018). The Role of Host Cholesterol During Flavivirus Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 388.
- Palacios-Rápalo, S. N., De Jesús-González, L. A., Reyes-Ruiz, J. M., Osuna-Ramos, J. F., Farfan-Morales, C. N., Gutiérrez-Escolano, A. L., & Del Ángel, R. M. (2021). Nuclear localization of non-structural protein 3 (NS3) during dengue virus infection. *Archives of Virology*.
- Pambudi, S., Kawashita, N., Phanthanawiboon, S., Omokoko, M. D., Masrinoul, P., Yamashita, A., Limkittikul, K., Yasunaga, T., Takagi, T., Ikuta, K., & Kurosu, T. (2013). A small compound targeting the interaction between nonstructural proteins 2B and 3 inhibits dengue virus replication. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 440(3), 393-398.
- Parihar, S. P., Guler, R., Lang, D. M., Suzuki, H., Marais, A. D., & Brombacher, F. (2013). Simvastatin Enhances Protection against *Listeria monocytogenes* Infection in Mice by Counteracting *Listeria*-Induced Phagosomal Escape. *PLoS ONE*, 8(9).
- Pergakis, M., Badjatia, N., Chaturvedi, S., Cronin, C. A., Kimberly, W. T., Sheth, K. N., & Simard, J. M. (2019). BII093 (IV glibenclamide): An investigational compound for the prevention and treatment of severe cerebral edema. *Expert opinion on investigational drugs*, 28(12), 1031-1040.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605-1612.
- Pinzi, L., & Rastelli, G. (2019). Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18).

- Rong, Z., Li, L., Fei, F., Luo, L., & Qu, Y. (2013). Combined treatment of glibenclamide and CoCl<sub>2</sub> decreases MMP9 expression and inhibits growth in highly metastatic breast cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 32(1), 32.
- Rosch, J. W., Boyd, A. R., Hinojosa, E., Pestina, T., Hu, Y., Persons, D. A., Orihuela, C. J., & Tuomanen, E. I. (2010). Statins protect against fulminant pneumococcal infection and cytolysin toxicity in a mouse model of sickle cell disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(2), 627-635.
- Rothan, H. A., Abdulrahman, A. Y., Sasikumer, P. G., Othman, S., Abd Rahman, N., & Yusof, R. (2012, octubre 2). *Protegrin-1 Inhibits Dengue NS2B-NS3 Serine Protease and Viral Replication in MK2 Cells* [Research Article]. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*; Hindawi.
- Rothan, H. A., Han, H. C., Ramasamy, T. S., Othman, S., Rahman, N. A., & Yusof, R. (2012). Inhibition of dengue NS2B-NS3 protease and viral replication in Vero cells by recombinant retrocyclin-1. *BMC Infectious Diseases*, 12, 314.
- Roy, A., Jana, M., Kundu, M., Corbett, G. T., Rangaswamy, S. B., Mishra, R. K., Luan, C.-H., Gonzalez, F. J., & Pahan, K. (2015). HMG-CoA Reductase Inhibitors Bind to PPAR $\alpha$  to Upregulate Neurotrophin Expression in the Brain and Improve Memory in Mice. *Cell metabolism*, 22(2), 253-265.
- Rub, A., Shaker, K., Kashif, M., Arish, M., Dukhyil, A. A. B., Alshehri, B. M., Alaidarous, M. A., Banawas, S., & Amir, K. (2019). Repurposing Glyburide as Antileishmanial Agent to Fight Against Leishmaniasis. *Protein and Peptide Letters*, 26(5), 371-376.
- Ryu, R. J., Hays, K. E., & Hebert, M. F. (2014). Gestational diabetes mellitus management with oral hypoglycemic agents. *Seminars in Perinatology*, 38(8), 508-515.
- Salentin, S., Schreiber, S., Haupt, V. J., Adasme, M. F., & Schroeder, M. (2015). PLIP: Fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W443-W447.
- Salles, T. S., da Encarnação Sá-Guimarães, T., de Alvarenga, E. S. L., Guimarães-Ribeiro, V., de Meneses, M. D. F., de Castro-Salles, P. F., dos Santos, C. R., do Amaral Melo, A. C., Soares, M. R., Ferreira, D. F., & Moreira, M. F. (2018). History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: A review. *Parasites & Vectors*, 11.
- Schüller, A., Yin, Z., Brian Chia, C. S., Doan, D. N. P., Kim, H.-K., Shang, L., Loh, T. P., Hill, J., & Vasudevan, S. G. (2011). Tripeptide inhibitors of dengue and West Nile virus NS2B-NS3 protease. *Antiviral Research*, 92(1), 96-101.
- Sheth, K. N., Kimberly, W. T., Elm, J. J., Kent, T. A., Mandava, P., Yoo, A. J., Thomalla, G., Campbell, B., Donnan, G. A., Davis, S. M., Albers, G. W., Jacobson, S., Simard, J. M., & Stern, B. J. (2014). Pilot Study of Intravenous Glyburide in Patients With a Large Ischemic Stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 45(1), 281-283.
- Shuster, D. L., Risler, L. J., Liang, C.-K. J., Rice, K. M., Shen, D. D., Hebert, M. F., Thummel, K. E., & Mao, Q. (2014). Maternal-Fetal Disposition of Glyburide in Pregnant Mice Is Dependent on Gestational Age. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 350(2), 425-434.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7(1), 539.
- Silva, E. M., Conde, J. N., Allonso, D., Ventura, G. T., Coelho, D. R., Carneiro, P. H., Silva, M. L., Paes, M. V., Rabelo, K., Weissmuller, G., Bisch, P. M., & Mohana-Borges, R. (2019). Dengue virus

nonstructural 3 protein interacts directly with human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and reduces its glycolytic activity. *Scientific Reports*, 9.

Soto-Acosta, R., Bautista-Carbajal, P., Cervantes-Salazar, M., Angel-Ambrocio, A. H., & del Angel, R. M. (2017). DENV up-regulates the HMG-CoA reductase activity through the impairment of AMPK phosphorylation: A potential antiviral target. *PLoS Pathogens*, 13(4), e1006257.

Steuer, C., Gege, C., Fischl, W., Heinonen, K. H., Bartenschlager, R., & Klein, C. D. (2011). Synthesis and biological evaluation of  $\alpha$ -ketoamides as inhibitors of the Dengue virus protease with antiviral activity in cell-culture. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(13), 4067-4074.

Sung, C., Wei, Y., Watanabe, S., Lee, H. S., Khoo, Y. M., Fan, L., Rathore, A. P. S., Chan, K. W.-K., Choy, M. M., Kamaraj, U. S., Sessions, O. M., Aw, P., de Sessions, P. F., Lee, B., Connolly, J. E., Hibberd, M. L., Vijaykrishna, D., Wijaya, L., Ooi, E. E., ... Vasudevan, S. G. (2016). Extended Evaluation of Virological, Immunological and Pharmacokinetic Endpoints of CELADEN: A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Celgosivir in Dengue Fever Patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(8).

Swarbrick, C. M. D., Basavannacharya, C., Chan, K. W. K., Chan, S.-A., Singh, D., Wei, N., Phoo, W. W., Luo, D., Lescar, J., & Vasudevan, S. G. (2017). NS3 helicase from dengue virus specifically recognizes viral RNA sequence to ensure optimal replication. *Nucleic Acids Research*, 45(22), 12904-12920.

Takagi, Y., Matsui, K., Nobori, H., Maeda, H., Sato, A., Kurosu, T., Orba, Y., Sawa, H., Hattori, K., Higashino, K., Numata, Y., & Yoshida, Y. (2017). Discovery of novel cyclic peptide inhibitors of dengue virus NS2B-NS3 protease with antiviral activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(15), 3586-3590.

Tam, D. T. H., Ngoc, T. V., Tien, N. T. H., Kieu, N. T. T., Thuy, T. T. T., Thanh, L. T. C., Tam, C. T., Truong, N. T., Dung, N. T., Qui, P. T., Hien, T. T., Farrar, J. J., Simmons, C. P., Wolbers, M., & Wills, B. A. (2012). Effects of Short-Course Oral Corticosteroid Therapy in Early Dengue Infection in Vietnamese Patients: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 55(9), 1216-1224.

Tang, K. F., & Ooi, E. E. (2012). Diagnosis of dengue: An update. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 10(8), 895-907.

Tomlinson, S. M., & Watowich, S. J. (2011). Anthracene-based Inhibitors of Dengue Virus NS2B-NS3 Protease. *Antiviral research*, 89(2), 127-135.

Torres, P. H. M., Sodero, A. C. R., Jofily, P., & Silva-Jr, F. P. (2019). Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4574.

Tricou, V., Minh, N. N., Van, T. P., Lee, S. J., Farrar, J., Wills, B., Tran, H. T., & Simmons, C. P. (2010). A Randomized Controlled Trial of Chloroquine for the Treatment of Dengue in Vietnamese Adults. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(8).

Uno, N., & Ross, T. M. (2018). Dengue virus and the host innate immune response. *Emerging Microbes & Infections*, 7.

Wang, S.-T., Ho, H. J., Lin, J.-T., Shieh, J.-J., & Wu, C.-Y. (2017). Simvastatin-induced cell cycle arrest through inhibition of STAT3/SKP2 axis and activation of AMPK to promote p27 and p21 accumulation in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death & Disease*, 8(2), e2626.

Wang, X., Chang, Y., He, Y., Lyu, C., Li, H., Zhu, J., Liu, K., Hu, Y., Huang, K., & Pan, S. (2020). Glimperide and glibenclamide have comparable efficacy in treating acute ischemic stroke in mice. *Neuropharmacology*, 162, 107845.

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296-W303.

Weigel, L. F., Nitsche, C., Graf, D., Bartenschlager, R., & Klein, C. D. (2015). Phenylalanine and Phenylglycine Analogues as Arginine Mimetics in Dengue Protease Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(19), 7719-7733.

Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K. E., Walther, P., Fuller, S. D., Antony, C., Krijnse-Locker, J., & Bartenschlager, R. (2009). Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host & Microbe*, 5(4), 365-375.

Weng, Z., Shao, X., Graf, D., Wang, C., Klein, C. D., Wang, J., & Zhou, G.-C. (2017). Identification of fused bicyclic derivatives of pyrrolidine and imidazolidinone as dengue virus-2 NS2B-NS3 protease inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 125, 751-759.

Whitehorn, J., Nguyen, C. V. V., Khanh, L. P., Kien, D. T. H., Quyen, N. T. H., Tran, N. T. T., Hang, N. T., Truong, N. T., Hue Tai, L. T., Cam Huong, N. T., Nhon, V. T., Van Tram, T., Farrar, J., Wolbers, M., Simmons, C. P., & Wills, B. (2016). Lovastatin for the Treatment of Adult Patients With Dengue: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 62(4), 468-476.

Wilder-Smith, A., Ooi, E.-E., Horstick, O., & Wills, B. (2019). Dengue. *The Lancet*, 393(10169), 350-363.

Wu, D., Mao, F., Ye, Y., Li, J., Xu, C., Luo, X., Chen, J., & Shen, X. (2015). Policlesulen, a novel NS2B/NS3 protease inhibitor, effectively inhibits the replication of DENV2 virus in BHK-21 cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36(9), 1126-1136.

Wu, H., Bock, S., Snitko, M., Berger, T., Weidner, T., Holloway, S., Kanitz, M., Diederich, W. E., Steuber, H., Walter, C., Hofmann, D., Weißbrich, B., Spannaus, R., Acosta, E. G., Bartenschlager, R., Engels, B., Schirmeister, T., & Bodem, J. (2015). Novel Dengue Virus NS2B/NS3 Protease Inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(2), 1100-1109.

Xu, S., Li, H., Shao, X., Fan, C., Ericksen, B., Liu, J., Chi, C., & Wang, C. (2012). Critical effect of peptide cyclization on the potency of peptide inhibitors against Dengue virus NS2B-NS3 protease. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(15), 6881-6887.

Yan, B., Peng, Z., Xing, X., & Du, C. (2017). Glibenclamide induces apoptosis by activating reactive oxygen species dependent JNK pathway in hepatocellular carcinoma cells. *Bioscience Reports*, 37(5).

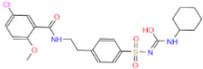
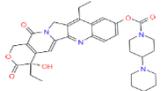
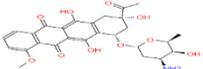
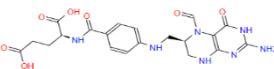
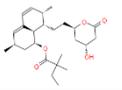
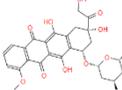
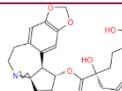
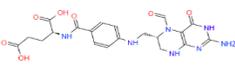
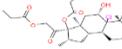
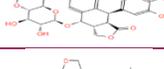
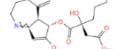
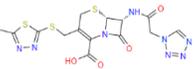
Yang, C.-C., Hsieh, Y.-C., Lee, S.-J., Wu, S.-H., Liao, C.-L., Tsao, C.-H., Chao, Y.-S., Chern, J.-H., Wu, C.-P., & Yueh, A. (2011). Novel Dengue Virus-Specific NS2B/NS3 Protease Inhibitor, BP2109, Discovered by a High-Throughput Screening Assay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(1), 229-238.

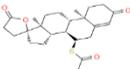
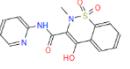
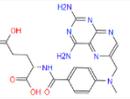
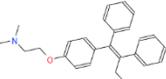
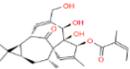
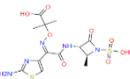
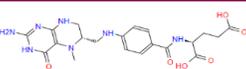
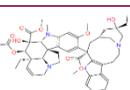
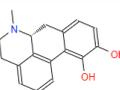
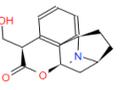
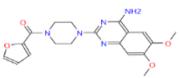
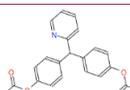
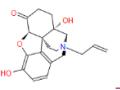
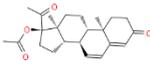
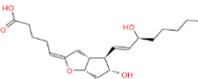
Yusof, R., Clum, S., Wetzel, M., Murthy, H. M. K., & Padmanabhan, R. (2000). Purified NS2B/NS3 Serine Protease of Dengue Virus Type 2 Exhibits Cofactor NS2B Dependence for Cleavage of Substrates with Dibasic Amino Acids in Vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 275(14), 9963-9969.

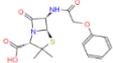
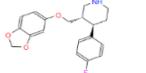
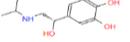
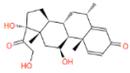
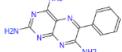
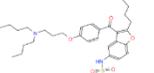
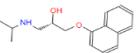
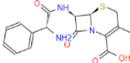
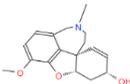
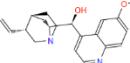
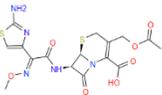
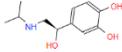
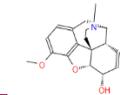
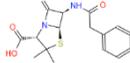
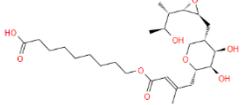
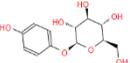
Zhou, G.-C., Weng, Z., Shao, X., Liu, F., Nie, X., Liu, J., Wang, D., Wang, C., & Guo, K. (2013). Discovery and SAR studies of methionine-proline anilides as dengue virus NS2B-NS3 protease inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(24), 6549-6554.

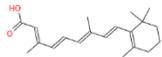
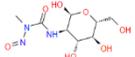
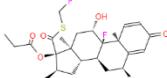
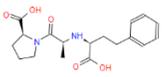
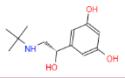
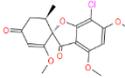
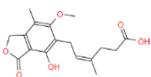
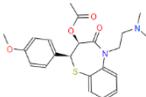
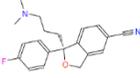
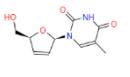
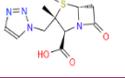
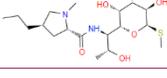
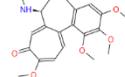
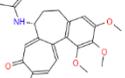
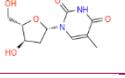
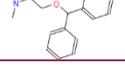
## ANEXO

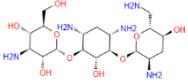
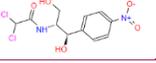
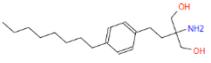
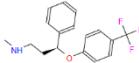
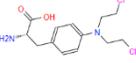
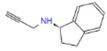
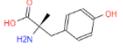
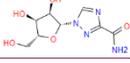
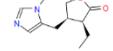
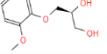
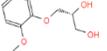
Tabla 3. Acoplamiento focalizado de los candidatos a inhibidores de la proteasa NS3 de DENV-2

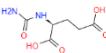
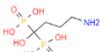
ID del fármaco	Estructura química	Energía de unión kcal/mol
ZINC537805		-9.23
ZINC1612996		-9.15
ZINC3917708		-9.15
ZINC9212428		-9.05
ZINC85534336		-8.77
ZINC26011099		-8.71
ZINC3780893		-8.54
ZINC3918087		-8.5
ZINC43450324		-8.46
ZINC85432549		-8.39
ZINC9212427		-8.39
ZINC3938744		-8.3
ZINC3938746		-8.24
ZINC3938684		-8.17
ZINC43450326		-8.1
ZINC3830405		-8.08

ZINC3861599		-8.08
ZINC51133897		-7.99
ZINC1529323		-7.91
ZINC1530689		-7.91
ZINC100037855		-7.88
ZINC3830264		-7.87
ZINC2005305		-7.81
ZINC85432544		-7.8
ZINC9073		-7.8
ZINC100009278		-7.68
ZINC95616601		-7.55
ZINC3830321		-7.51
ZINC389747		-7.44
ZINC3881640		-7.33
ZINC85537026		-7.26
ZINC1883067		-7.22
ZINC3813078		-7.17

ZINC3831282		-7.16
ZINC527386		-7.15
ZINC56653		-7.12
ZINC3795819		-7.11
ZINC3875560		-7.11
ZINC120286		-7.04
ZINC49933061		-7.04
ZINC56556		-7.01
ZINC3830500		-7
ZINC3812897		-6.98
ZINC491073		-6.98
ZINC3831405		-6.96
ZINC4468780		-6.92
ZINC56652		-6.9
ZINC3806721		-6.87
ZINC3871701		-6.85
ZINC4102194		-6.81
ZINC518554		-6.8

ZINC3792789		-6.77
ZINC34157		-6.76
ZINC3977737		-6.74
ZINC3920027		-6.64
ZINC3812851		-6.52
ZINC2281		-6.51
ZINC622123		-6.51
ZINC1758		-6.43
ZINC621893		-6.43
ZINC3800706		-6.42
ZINC137884		-6.34
ZINC3787060		-6.34
ZINC3982483		-6.34
ZINC621853		-6.32
ZINC607790		-6.22
ZINC2159		-6.02
ZINC20244		-5.97

ZINC897244		-5.97
ZINC8214692		-5.96
ZINC113382		-5.92
ZINC1542002		-5.87
ZINC967597		-5.84
ZINC1530637		-5.8
ZINC20255		-5.76
ZINC1673		-5.7
ZINC19875504		-5.68
ZINC693		-5.61
ZINC1035331		-5.55
ZINC75008		-5.52
ZINC394284		-5.51
ZINC353		-5.3
ZINC1795		-5.27
ZINC6226		-5.21
ZINC20259		-5.18
ZINC74836		-4.85
ZINC599985		-4.83
ZINC4658290		-4.7
ZINC3008621		-4.46
ZINC38212689		-4.46

ZINC2005		-4.4
ZINC34676245		-4.21
ZINC1530283		-4.11
ZINC1530427		-4.1
ZINC114124		-3.99
ZINC3801919		-3.98
ZINC114127		-3.82
ZINC1532728		-3.6
ZINC2016052		-3.4
ZINC1487602		-3.36