

Identificación de metabolitos secundarios de plantas como posibles agentes antivirales contra el virus del dengue teniendo como diana farmacológica la proteína NS2B/NS3pro

Yilber Niyer Cárdenas Flórez

Trabajo de grado para optar el título de Químico

Directora

Stelia Carolina Méndez Sánchez

Doctora en Bioquímica

Grupo de investigación en bioquímica y microbiología

Codirector

Luis Carlos Vesga Gamboa

Doctor en Química

Grupo de investigación en bioquímica y microbiología

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2023

Dedicatoria

A mi madre.

Por amor y sus grandes esfuerzos para lograr lo que hoy soy.

A mi hermana Mary.

Por su amor y apoyo incondicional.

Agradecimientos

A Residencias Universitarias, por ser mi segundo hogar y ayudarme a cumplir el sueño de ser profesional.

A la profesora Stelia Carolina Méndez Sánchez, por compartir sus conocimientos desinteresadamente.

A Luis Carlos Vezga, por su tiempo, paciencia, dedicación y apoyo en cada uno de las etapas de este proyecto de investigación.

A Andrea Otero, por su valiosa amistad y compañía.

A mi familia, por siempre creer en mí y motivarme a luchar por mis logros, sobre todo a mi mamá por su gran apoyo incondicional y por ser esa gran fuente de inspiración.

A mis primas Margarita Albino y Amparo Albino, por su gran apoyo en los momentos más difíciles.

A Alejandra Olarte, por todo su cariño y su gran apoyo emocional, por ser parte de mi vida.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción.....	12
1. Marco de referencia y antecedentes	13
1.1. Estructura del virón	15
1.2. Proteínas No Estructurales (NS).....	17
1.4. Metabolitos secundarios de plantas como fuente de fármacos antivirales.....	25
1.6. Diseño de fármacos asistido por computadora.....	27
1.6.1. Acoplamiento molecular.	29
1.6.2. Dinámica molecular	32
2.5.4. Energía libre de unión.	36
2. Objetivos... ..	38
2.1. Objetivo general	38
2.2. Objetivos específicos.....	38
3. Metodología	38
3.1. Preparación de la base de datos.....	39
3.2. Predicción de las propiedades ADMET.	40
3.3. Preparación de la proteína y ligandos.	41

3.4. Screening Virtual.....	41
3.5. Predicción de la energía libre de unión.	42
3.6. Simulaciones de Dinámica Molecular (DM).	43
3.6. Imágenes.....	45
4. Resultados y discusión	46
4.1. Base de datos.....	46
4.2. Predicción de propiedades ADME y Docking Molecular.....	47
4.2. Dinámica molecular	55
4. Conclusiones.	59
Recomendaciones.....	59
Divulgación de resultados	60
Agradecimientos.....	63
Referencias Bibliográficas	64
Apéndices.....	95

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Propiedades farmacológicas de los metabolitos secundarios seleccionados después del docking molecular XP.....	48
Tabla 2. Resultados para el promedio de la energía de unión para los metabolitos durante los 200 ns de simulación. Réplica 1 (R1) y réplica 2 (R2).....	58

Lista de Figuras.

	Pág.
Figure 1: Poliproteína viral y los sitios de hidrólisis realizados por proteasas.	15
Figure 2: Estructura del virón maduro del DENV. Imagen adaptada de Zhang et al., 2021	16
Figure 3: Estructura cristalina de la NS2B/NS3pro (PDB ID: 3U1I, resolución: 2,30 Å) .	21
Figure 4. Nomenclatura Schechter y Berger para sustratos y enzimas	24
Figure 5. Potencial de Lenard-Jones para la interacción de dos átomos.....	35
Figure 6. Esquema metodológico para el desarrollo de los objetivos planteados	39
Figure 7. Sistema generado para la dinámica molecular NS2B/NS3pro-Ligando.....	45
Figure 8. Interface de la base de datos de metabolitos secundarios de plantas	47
Figure 9. Resultados del docking molecular.	51
Figure 10. RMSD y RMSF obtenidos durante los 200 ns de simulación	57

Lista de appendices

	Pág.
Apéndices A. RMSF de los residuos de la NS2B durante la simulación de DM.....	95
Apéndices B. RMSF de los residuos de la NS3pro durante la simulación de DM.....	96
Apéndices C. RMSD obtenidos para los metabolitos durante la simulación de DM.....	97
Apéndices D. Interacciones de los metabolitos con el complejo proteico predichas por el docking molecular	98

Resumen.

Título: Identificación de metabolitos secundarios de plantas como posibles agentes antivirales contra el virus del dengue teniendo como diana farmacológica la proteína NS2B/NS3pro.*

Autores: Yilber N. Cárdenas-Florez, Luis C. Vesga, Stelia C. Méndez-Sánchez.**

Palabras clave: Virus del dengue, Metabolito secundario, Pelargonidina 3-arabinósido, complejo proteico NS2B/NS3pro

El dengue es una enfermedad tropical causado por la infección del virus del dengue (DENV). Se estima que anualmente se producen cerca de 390 millones de infecciones. A pesar de los esfuerzos para el desarrollo de compuestos antivirales contra el DENV, aún no existe un tratamiento antiviral o vacuna efectiva. Una de las dianas farmacológicas establecidas para el desarrollo de fármacos es el complejo proteico NS2B/NS3pro debido a su rol importante durante el proceso del ciclo viral. En la presente investigación, empleamos técnicas computacionales, tales como docking molecular y dinámica molecular, con el fin de evaluar la estabilidad de metabolitos secundarios de plantas al interaccionar con el complejo proteico NS2B/NS3pro para postularlos como posibles inhibidores. A partir de lo anterior, se determinó que la pelargonidina 3-arabinósido presenta interacciones tipo puente de hidrógeno con residuos de la triada catalítica His-51, Asp-75 y Ser-135, al igual que residuos claves para el procesamiento y reconcomiendo del sustrato tales como la Gly-133 y Gly-153. Adicionalmente, este compuesto logra tener una estabilidad en el sitio predicho por el docking molecular a lo largo de 200 ns de simulación. Lo anterior, junto con sus propiedades ADMET predichas y estudios de biodisponibilidad de sus derivados, se puede sugerir a la pelargonidina 3-arabinósido como compuesto que contribuye a la posible inhibición del complejo proteico NS2B/NS3pro.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Director: Dr. Stelia Carolina Méndez Sánchez. Codirector: Dr. Luis Carlos Vesga

Abstract

Title: Identification of plant's secondary metabolites as potential antiviral agents against dengue virus targeting the NS2BNS3pro protein complex.*

Authors: Yilber N. Cárdenas-Florez, Luis C. Vesga, Stelia C. Méndez-Sánchez.**

Keywords: Dengue virus, secondary metabolite, Pelargonidin 3-arabinoside, NS2B/NS3pro protein complex.

Dengue is a tropical disease caused by dengue virus (DENV) infection. There are an estimated 390 million infections each year. Despite major efforts to develop anti-DENV compounds, there is still no antiviral treatment or effective vaccine. One of the main targets to develop new drugs is the NS2B/NS3pro complex due to its important role during the viral cycle. In this investigation, we used computational technics such as molecular docking and molecular dynamics simulations to test the stability of plant's secondary metabolites after the interaction with the NS2B/NS3pro protein complex to suggest it as a lead compound. Based on the above, we determine that pelargonidin 3-arabinoside shows strong interactions with catalytic triad residues His-51, Asp-75, and Ser-135 as well as key amino acid residues for the correct processing and recognition of substrates like Gly-133 and Gly-153. Additionally, this compound reaches stabilities on the site predicted by molecular docking through the 200 nm simulation. These results, as well as the predicted ADMET properties and previous bioavailability studies of its derivate, we can suggest pelargonidin 3-arabinoside as a compound that contributes to possible inhibition of the NS2B/NS3pro protein complex.

* Degree Work

** Faculty of Science. School of Chemistry. Director: Dr. Stelia Carolina Méndez Sánchez. Codirector: Dr. Luis Carlos Vesga

Introducción.

El virus del dengue (DENV) pertenece a la familia *Flaviviridae* y se clasifica dentro del género *Flavivirus*, el cual incluye patógenos letales como el virus de la fiebre amarilla, virus del Zika y virus del Nilo Occidental. Su principal vector es el mosquito *Aedes aegypti* por lo que las infecciones del DENV poseen mayor prevalencia en regiones tropicales y subtropicales donde el mosquito es endémico. Debido a esto, el DENV es considerado como una infección viral reemergente, transmitida por mosquitos, que posee las tasas de mortalidad y morbilidad más altas a nivel mundial, con una importante distribución geográfica e incidencia de la infección viral (Du et al., 2021; Higuera & Ramírez, 2019; Leonel et al., 2018)

El DENV se clasifica en cuatro serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) los cuales han aumentado de manera drástica su incidencia a nivel mundial. En 1970 solo nueve países habían sufrido epidemias causadas por el DENV, sin embargo, en la actualidad este virus está catalogado como endémico en más de 100 países distribuidos principalmente en regiones tropicales y subtropicales (Jing & Wang, 2019; World Health Organization, 2022). Se estima que cerca de 3.9 billones de personas actualmente viven regiones con alto riesgo de infección (Gutierrez-Barbosa et al., 2020). En Colombia para año epidemiológico 2022 se reportaron ante la OMS 69.497 casos de DENV con una mayor incidencia del DENV-1 (Gutierrez-Barbosa et al., 2020; Organización Panamericana de la Salud, 2023). A pesar de lo anterior, hasta el momento no se cuenta con un tratamiento efectivo y confiable por lo que se urge el desarrollo de fármacos antivirales para tratar la infección del DENV (J. S. Lee et al., 2018; Nivarthi et al., 2021; Tran et al., 2020; W. H. Wang et al.,

2020). Con el fin de combatir la problemática anterior, se han hecho esfuerzos para el desarrollo de fármacos antivirales contra el DENV tomando como diana farmacológica principalmente proteínas no estructurales (Kronenberger et al., 2021; Lim et al., 2020a). Este desarrollo de nuevos fármacos es un proceso muy complejo y costoso el cual requiere de años para la obtención del producto final. Con el fin de reducir los anteriores factores y acelerar el proceso para la obtención de fármacos, se ha dado uso de herramientas moleculares tales como docking molecular y dinámica moléculas.

En el presente estudio, se usó herramientas computacionales como Qikpro, docking molecular, Prime MM-GBSA y finalmente simulaciones de dinámica molecular para evaluar la estabilidad de los metabolitos secundarios de plantas en el complejo proteico NS2B/NS3pro. A partir de lo anterior, se logró la identificación de la pelargonidina 3-arabinósido como posible inhibidor del complejo proteico NS2B/NS3pro debido a sus interacciones, principalmente tipo puente de hidrógeno, con residuos relevantes para el procesamiento y reconocimiento del sustrato.

A continuación, se abordará un marco de referencia con el fin de comprender más a fondo la metodología usada en el presente trabajo, relevancia y función del complejo proteico NS2B/NS3pro y el rol de los metabolitos secundarios como fuente de fármacos.

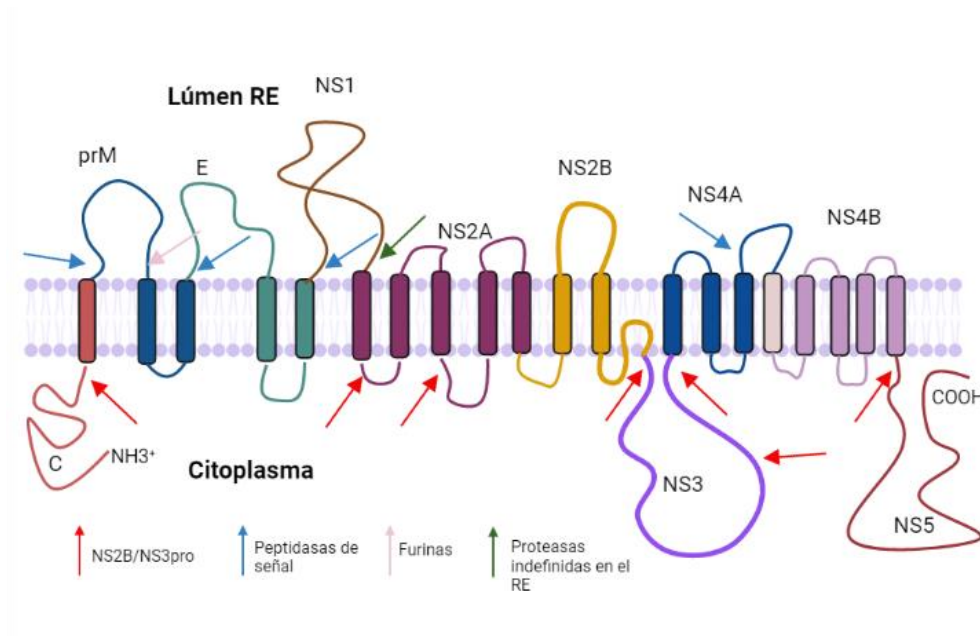
1. Marco de referencia y antecedentes

El DENV es miembro del género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*, el cual es transmitido principalmente por el mosquito *Aedes aegypti* (Leonel et al., 2018;

Mustafa et al., 2015). Estimaciones sugieren que anualmente existen 390 millones de infecciones, lo cual ha causado un significativo impacto en la economía y salud de más 100 países donde el virus es endémico (Gubler, 2011; Kularatne & Dalugama, 2022). Factores como el cambio climático, la expansión de la urbanización y el crecimiento de la población pueden inducir un aumento de las áreas endémicas del mosquito vector y, por ende, una mayor cantidad de infecciones a las estimadas (Gubler, 2011). Los casos de infección por DENV son acompañados con síntomas clínicos como fiebre alta, dolor de cabeza, dolor muscular, náuseas y vómito que pueden desarrollarse a condiciones más complejas como el síndrome de shock del dengue o fiebre hemorrágica del dengue (Halsey et al., 2012).

El DENV se divide en cuatro serotipos diferentes (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) los cuales consisten en un RNA de cadena positiva compuesto por una región no traducida en el extremo 5' seguido de un marco de lectura abierto y, finalmente, una última región no traducida en el extremo 3' (Leonel et al., 2018; Mustafa et al., 2015). Después de que este ARN es liberado en el citoplasma de la célula huésped, es traducido por ribosomas en el retículo endoplásmico (RE). Esto da como resultado una única poliproteína anclada en la membrana del RE que, mediante proteasas celulares y virales, es hidrolizada en tres proteínas estructurales: La proteína C (Cápside), prM (precursor de membrana), E (Envoltura); y siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (**Figura 1**)

Figure 1: Poliproteína viral y los sitios de hidrólisis realizados por proteasas.



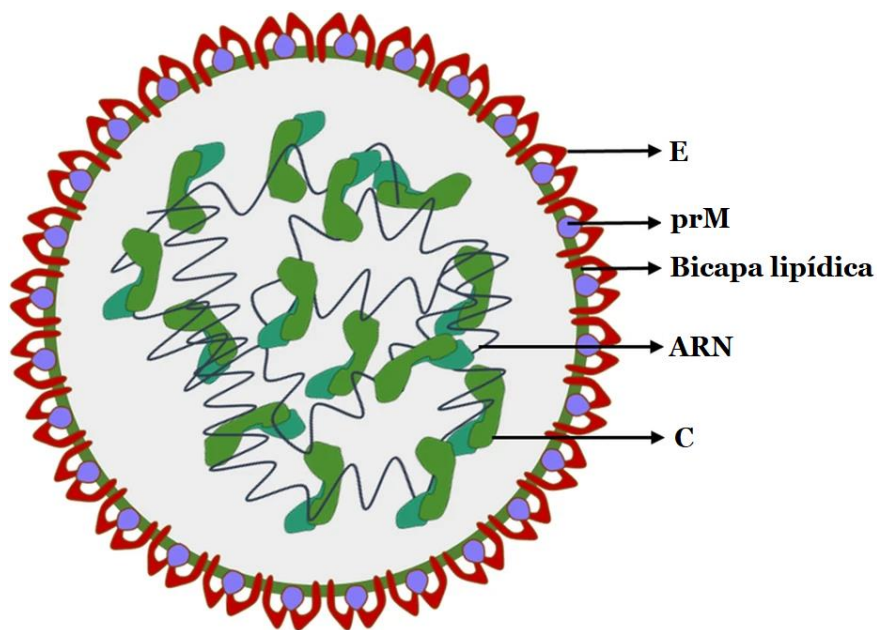
Nota. *Las flechas en rojo representan los sitios de hidrólisis realizados por el complejo proteico NS2B/NS3pro. Las flechas en azul, rosa pálido y verde son los sitios de escisión llevados a cabo por demás proteasas celulares. Adaptado de Meng et al., 2015

1.1. Estructura del virón

El virón del DENV posee una organización de las proteínas envolvente de una forma icosaédrica, con un núcleo esférico compuesto principalmente por las proteínas cápside (Rodenhuis-Zybert et al., 2010). Las proteína cápside se encuentran unidas al ARN viral que a su vez está rodeado por una bicapa lipídica derivada de la célula huésped (Rodenhuis-Zybert et al., 2010). En esta bicapa lipídica se encuentran

ancladas las proteínas M y E. La proteína M es un fragmento proteolítico, de aproximadamente 8kDa, que proviene de prM (proteína de precursor de membrana) (Rodenhuis-Zybert et al., 2010). Por otro lado, la proteína de E, con un tamaño de 53 kDa, está compuesto por tres dominios (DI, DII y DIII) organizados en homodímeros orientados de cabeza a cola en la superficie de la partícula viral (**Figura 2**) (Klein et al., 2013; Rodenhuis-Zybert et al., 2010).

Figure 2: *Estructura del virón maduro del DENV. Imagen adaptada de Zhang et al., 2021*



El RNA contenido dentro de la partícula viral contiene la información genética necesaria para la codificación tanto de las proteínas estructurales como las no estructurales las cuales cumplen funciones importantes durante el ciclo viral. por

ende, en el siguiente apartado se dará una descripción general de cada una de estas proteínas con un mayor énfasis en el complejo proteico de interés.

1.2. Proteínas No Estructurales (NS).

Las proteínas NS son expresadas en la célula huésped y no hacen parte de la estructura de la partícula viral, sin embargo, cumplen un rol muy importante en la replicación del ARN viral debido a que se organizan de tal forma que impulsan la formación orgánulos de replicación en la membrana del RE (Dey et al., 2021; Velandia & Castellanos, 2011). Por lo anterior, es necesario comprender la función de cada una de las proteínas NS

Proteína no estructural NS1: Es una glicoproteína de aproximadamente 48 kDa, altamente conservada en los *Flavivirus*, comparte una similitud de aproximadamente del 70% en la secuencia entre los cuatro serotipos del DENV (H.-R. Chen et al., 2018; Płaszczycza et al., 2019; Songprakhon et al., 2020). Esta proteína es expresada como monómero en la célula infecta, sin embargo, después de modificaciones post-traduccionales en el RE, una parte de estas se ancla en la superficie de la célula huésped como homodímero a través de diferentes vías; mientras que otra parte es constantemente secretada al espacio extracelular. Por ende, la proteína NS1 se destaca por ser un objetivo en el diagnóstico de la infección por DENV y su presencia en plasma sanguíneo se correlaciona con la severidad de la enfermedad (H.-R. Chen et al., 2018; Libraty et al., 2002; Paronavitane et al., 2014). Por otro lado, la proteína NS1 es requerida para la replicación de RNA y para el

ensamblaje del virus por lo que también ha sido estudiado como blanco terapéutico (Płaszczycza et al., 2019; Songprakhon et al., 2020).

Proteína no estructural 2A (NS2A): En los *Flavivirus*, la proteína no estructural NS2A es una proteína hidrófoba de aproximadamente de 22 kDa que contiene diversos dominios de transmembrana asociados al RE (Xie et al., 2013). Juega un rol importante en la replicación viral y ensamblaje del virón. Interacciona con las proteínas claves como la proteína no estructural 3 (NS3) y proteína no estructural 5 (NS5) mejorando así la replicación (Nemésio et al., 2014; Xie et al., 2019). Específicamente en el DENV, esta proteína atrapa RNA viral proveniente de la transcripción y proteínas estructurales dentro del sitio de ensamblaje, regula el procesamiento proteolítico de las proteínas C-prM y del ARN a través de la región 3'UTR dando como resultado la encapsidación del genoma viral (Xie et al., 2019).

Proteína no estructural 2B (NS2B): La proteína no estructural 2B es una proteína hidrofóbica transmembrana que actúa como cofactor del dominio proteasa de la proteína NS3 (NS3pro) para que esta lleve a cabo el reconocimiento y proteólisis de la poliproteína (Lin et al., 2017). Precisamente, la parte N-terminal que comprenden los residuos 49-97 son los responsables en la inducción del cambio conformacional para que el dominio proteasa de la NS3pro lleve a cabo su actividad catalítica debido a que adopta diferentes conformaciones en presencia o ausencia de inhibidor (Y. M. Kim et al., 2013).

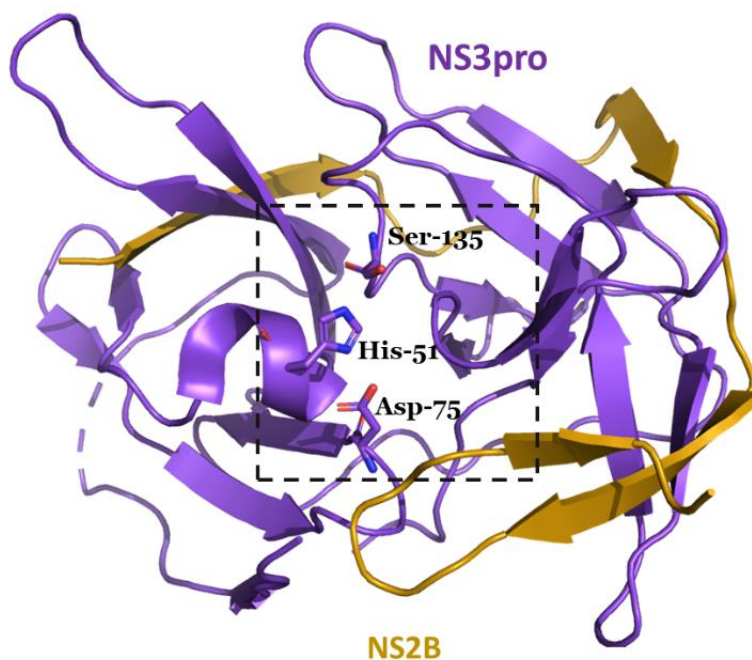
Proteínas no estructurales 4A (NS4A): Esta proteína hace parte del grupo de proteínas integrales de membrana del virus que, junto con las proteínas NS2A, NS2B y NS4B, conforman el complejo de replicación propio del virus. La NS4A ha demostrado que antagoniza la respuesta inmunitaria del huésped e induce autofagia. El procesamiento proteolítico de esta proteína es realizado por el complejo proteico NS2B/NS3pro (C. M. Lee et al., 2015).

Proteína no estructural 4B (NS4B): la proteína no estructural 4B es la proteína transmembrana asociada al RE más grande entre todas las proteínas (Van Den Elsen et al., 2021). Está compuesta por los cinco dominios de transmembrana denominados 1-5, respectivamente (Van Den Elsen et al., 2021; Y. Wang et al., 2022). El dominio 5 se ha propuesto que sufre cambios conformacionales y cambia su orientación pasando del lado citoplasmático al lumen del RE después del procesamiento proteolítico de la unión NS4B-NS5 (Y. Wang et al., 2022). Adicionalmente se ha propuesto que la proteína NS4B interacciona con diferentes proteínas tanto virales como propias de la célula huésped con el fin de conducir a la replicación y producción del virón (Dey et al., 2021).

Proteína no estructural 3 (NS3): La NS3 es una proteína multifuncional altamente conservada entre los *Flavivirus*, se encuentra dividida en los dominios helicasa (NS3h) y proteasa (NS3pro) los cuales llevan a cabo actividades importantes para la maduración y replicación (Nitsche et al., 2014). El dominio Helicasa (NS3h) se encuentra región C-terminal de la NS3, comprende los residuos aminoacídicos desde 168 hasta el 618 (Sarto et al., 2020). Este dominio se encuentra dividido en

tres subdominios (I, II y II) encargados de llevar a cabo las actividades de RNA helicasa además de las actividades de adenosin trifosfatasa (ATPasa) y RNA 5' trifosfatasa (RTPasa), esenciales para la replicación y transcripción del genoma (Leonel et al., 2018; Swarbrick et al., 2017). La actividad helicasa es la responsable de desenrollar el intermediario de la replicación, RNA bicatenario, en RNA de cadena positiva completamente maduro usando la energía química derivada de la hidrólisis del ATP que, a su vez, se realiza en los subdominios I y II (Lescar et al., 2008; Phoo et al., 2020; Swarbrick et al., 2017). Por otro lado, en la región N-terminal de la NS3 se encuentra el dominio proteasa, compuesto por 167 aminoácidos. Esta región es clasificada dentro de la familia de las quimotripsinas debido a que posee la clásica triada catalítica His-51, Asp-75 y Ser-135 en su sitio activo (**Figura 3**) (Lin et al., 2017). Está encargada de la hidrólisis de siete de los trece sitios de incisión de la poliproteína viral (**Figura 1**) importantes para la maduración del virus (Lin et al., 2016). Sin embargo, su actividad catalítica no la realiza por sí sola, se requiere para correcto funcionamiento y reconocimiento de sustrato la región hidrofóbica de la proteína NS2B como cofactor dando a lugar al complejo proteico activo NS2B/NS3pro (Lin et al., 2017).

Figure 3: Estructura cristalina de la NS2B/NS3pro (PDB ID: 3U1I, resolución: 2,30 Å)



Nota. *En amarillo se muestra la NS2B y en morado la NS3pro. Los residuos del sitio activo conformado por His-51, Asp-75 y Ser-135 se muestran en el recuadro punteado. El rojo representa los átomos de oxígeno mientras que el azul representa los átomos de Nitrógenos.

Proteína no estructural NS5: Esta proteína es la más larga, con aproximadamente 102 kDa, es altamente conservada entre los cuatro serotipos con una identidad en la secuencia de aminoácidos del 70% (Sahili & Lescar, 2017). Posee dos dominios los cuales llevan a cabo actividades enzimáticas importantes para la

replicación viral. El dominio de su lado N-terminal lleva a cabo las actividades metiltransferasa (MTasa). Por otro lado, en su lado C-terminal se encuentra el dominio RNA dependiente de RNA polimerasa (RdRp); importante para la síntesis del RNA viral (Sahili & Lescar, 2017).

Como se mencionó anteriormente, todas las proteínas NS cumplen una función muy importante en el ciclo viral, sin embargo, debido al propósito de la presente investigación sobre la determinación de metabolitos secundarios de plantas con potencial inhibitorio del complejo proteico NS2B/NS3pro, se realizará una revisión más detallada sobre la bioquímica de la diana farmacológica NS2B/NS3pro

1.3. Bioquímica del complejo proteico NS2B/NS3pro

El complejo proteico NS2B/NS3pro realiza la hidrólisis en siete de los trece sitios de escisión requeridos en la poliproteína viral, sin embargo, para ello requiere de una región hidrofílica de la proteína NS2B que actúa como cofactor (Nitsche et al., 2014). Para el complejo NS2B/NS3pro se han reportado dos conformaciones principales relacionadas con la posición relativa de la NS2B respecto a la NS3pro denominadas “cerrada” y “abierta”; estos cambios conformacionales se relaciona con la unión del ligando o sustrato a su sitio activo (Behnam & Klein, 2020). La conformación cerrada, donde el segmento C-terminal de la NS2B complementa la NS3pro cubriendo el sitio activo, es interpretada como una consecuencia de la unión del ligando o sustrato (Behnam & Klein, 2020; Kronenberger et al., 2021). Por otro lado, se tiene la conformación abierta, donde el cofactor NS2B no cubre el sitio activo

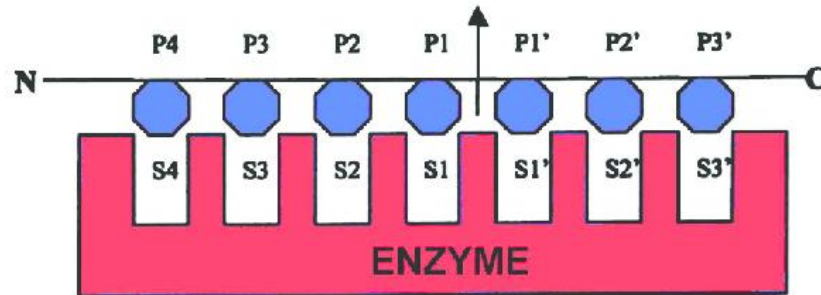
de la NS3pro lo cual está relacionado con la ausencia de ligando. Sin embargo, estudios de RMN han demostrado que en solución el complejo proteico NS2B/NS3pro se encuentra en constante cambio entre las dos conformaciones y otros intermediarios, con una mayor tendencia a la conformación cerrada incluso en estados con ausencia de inhibidor (Chen et al., 2014; Dang et al., 2022; Lim et al., 2020a). Se han logrado obtener estructuras cristalinas de la NS2B/NS3pro en estas dos conformaciones, por ejemplo, el inhibidor peptídico NDL (Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-h), el cual interacciona con el complejo proteico NS2B/NS3pro del DENV-3 (Código PDB: 3U1I) uniéndose covalentemente con el residuo Ser-135 dando como resultado la conformación cerrada (Noble et al., 2012).

En términos del mecanismo que lleva a cabo el complejo proteico NS2B/NS3pro para su actividad catalítica, la Ser-135 ataca al grupo carbonilo del sustrato peptídico mientras que la His-51, estabilizada por la interacción con Asp-75, acepta el hidrógeno de la Ser-135 dando como resultado una especie de oxoanión tetraédrico altamente reactivo (Lima & Seabra, 2016; Timiri et al., 2016). Lo anterior deja como producto la escisión y liberación del sustrato en dos fragmentos (Timiri et al., 2016).

Según nomenclatura de Scherchter y Berger, los residuos aminoacídicos en el sustrato se enumeran hacia afuera desde el sitio de hidrólisis (entre los residuos P'1-P1) como -P'2- P'1- P1-P2- (**Figura 4**) Mientras que los res residuos aminoacídicos en la proteína que ordenan los aminoácidos del sustrato son denominados como -S'2-S'1-S1-S2(Figura 4) (Song et al., 2011). En este sentido, el complejo protéico

NS2B/NS3pro tiene una preferencia por sustratos como Arg o Lys en los sitios P1 y P2 seguido por aminoácidos con una cadena corta como la Gly, Ser o Ala en los sitios P'1 (K. H. Lin et al., 2016). Algunos inhibidores peptídicos del complejo proteico NS2B/NS3pro que sustentan lo anterior son Bz-nKRR-H y Bz-nKRW-H, Ac-RTSKKR-NH₂, con un potencial inhibitorio (K_i) de 5.8 μ M, 6.0 μ M y 12 μ M, respectivamente en ensayos con DENV-2 (Nitsche et al., 2014).

Figure 4. Nomenclatura Schechter y Berger para sustratos y enzimas



Debido a la actividad enzimática durante el procesamiento de la poliproteína viral en sus entidades finales funcionales, el complejo proteico NS2B/NS3pro ha sido establecido como un target muy importante para el diseño de fármacos para tratar DENV (L. Lim et al., 2020b; Steuber et al., 2010; Timiri et al., 2016). Se han desarrollado diferentes enfoques con el fin de prevenir, controlar y tratar las infecciones producidas por el DENV. Estos enfoques van desde la prevención y protección contra los vectores transmisores hasta la búsqueda de nuevos compuestos anti-DENV. Una de las principales fuentes de moléculas con actividad biológica han sido las plantas y sus metabolitos secundarios.

1.4. Metabolitos secundarios de plantas como fuente de fármacos antivirales.

Las plantas son una fuente de moléculas bioactivas que han mostrado poseer efectos en la salud humana y animal convirtiéndose en una de las principales fuentes de fármacos (Bachar et al., 2021; Mendoza & Silva, 2018). Los compuestos fitoquímicos se han clasificado en metabolitos primarios y metabolitos secundarios dependiendo de la actividad biológica que llevan a cabo en las plantas (Velu et al., 2018). Por un lado, los metabolitos primarios son moléculas indispensables para los procesos biológicos como la glucólisis, el ciclo del ácido cítrico, fotosíntesis y procesos asociados. Incluye compuestos como azúcares, aminoácidos, ácidos tricarbónicos, proteínas, entre otros (Gorlenko et al., 2020). Por otro lado, los metabolitos secundarios son compuestos producidos en las células de las plantas a través de procesos metabólicos derivados de vías metabólicas primarias que no están involucrados directamente en el crecimiento, desarrollo o reproducción de la planta (Velu et al., 2018).

Las plantas y sus derivados a lo largo de la historia han demostrado ser una de las principales fuentes de agentes terapéuticos contra diferentes enfermedades infecciosas debido a que en su mayoría poseen bajos efectos secundarios (Gorlenko et al., 2020; Velu et al., 2018). Estudios *in vitro* de los extractos de plantas *Lippia alba*, *Oreganum vulgare* y *Artemisia vulgaris* han demostrado interferir en la replicación viral mediante una posible inactivación directa del virus (Gómez et al., 2013; Meneses et al., 2009). Se ha reportado que los aceites esenciales de las plantas

de *Lippia alba* y *Lippia citriodora* poseen actividad antiviral contra el DENV en estudios *in vitro*, posiblemente mediante la inactivación del virus antes del ingreso de la partícula viral huésped (Ocazonez et al., 2010). El Epigallocatequina-3-galato y la cianidina-3-rutinosida, compuestos fenólicos aislados de las plantas de té verde y *Morus alba*, respectivamente, además de poseer una actividad antioxidante, han demostrado ser efectivos como agentes antivirales contra la infección del virus de la hepatitis B y virus de la influenza A y B con una baja toxicidad en ensayos *in vitro* (Karamese et al., 2015; Kim et al., 2018). Recientemente, con la propagación descontrolada que tuvo el SARS-CoV-2 la cual exigía la pronta disposición en el mercado de agentes antivirales eficaces, muchos estudios se enfocaron en el uso de herramientas computacionales, como acoplamiento molecular y dinámica molecular, para la identificación de metabolitos secundarios con actividad antiviral.

Incluso en el DENV se han identificado compuestos de origen natural, con ayuda de técnicas computacionales, capaces de interferir en la actividad catalítica de proteínas estructurales e incluso demostrar actividad inhibitoria de la producción viral.

1.5. Inhibidores reportados del complejo proteico NS2B/NS3pro

Han sido reportados múltiples compuestos de origen natural con actividad antiviral contra el virus del dengue los cuales han pasado por estudios *in vitro* e *in vivo*, sin embargo, ninguno ha podido llegar a estudios clínicos (Saqallah et al., 2022). Por ejemplo, el kaempferol-3-O-rutinoside, un compuesto perteneciente a la familia

de flavonoides, a partir del uso de técnicas computacionales como docking molecular y dinámica molecular seguido de estudios experimentales se logró demostrar su potencial contra la infección del DENV mediante la posible interacción con el complejo proteico NS2B/NS3pro (Dwivedi et al., 2020). Otro de los compuestos de origen natural más estudiados como inhibidor de la NS3B/NS3pro es la curcumina; un estudio realizado por (Lim et al., 2020b) el cual incluye dinámica molecular, docking molecular guiado por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y finalmente estudios *in vitro*, demostraron que este compuesto inhibe la proteasa de manera no competitiva mediante la unión a un sitio alostérico. Bajo el mismo procedimiento anterior, se logró determinar la miricetina como un inhibidor de la NS2B/NS3pro también mediante una forma no competitiva al unirse a un sitio alostérico (A2) diferente al lugar de unión de la curcumina (Dang et al., 2022).

También se ha logrado la identificación de compuestos de origen sintético los cuales han demostrado una actividad inhibitoria de la proteasa viral a partir de estudios *in silico* seguidos de estudios *in vitro* demostrando buenos resultados. Tal es el caso del compuesto T5341917, el cual demostró tener una excelente biodisponibilidad en células BHK21 y células HUH7. Finalmente, demostró que este compuesto inhibe la producción del virus (L. Li et al., 2015).

Por lo anterior, el uso de técnicas computacionales para el descubrimiento de nuevas moléculas con actividad biológica ha sido establecido como uno de los primeros pasos.

1.6. Diseño de fármacos asistido por computadora.

El desarrollo de nuevos fármacos es un proceso complejo y costoso el cual puede ser dividido en diferentes pasos que incluyen la identificación de la diana terapéutica, descubrimiento y optimización de los fármacos líderes, estudios preclínicos y finalmente estudios clínicos (Cox et al., 2022; Schaduangrat et al., 2020). Este proceso toma un promedio de tiempo de 14 años en estar disponible en el mercado con un costo total estimado de 58.8 billones de dólares (Schaduangrat et al., 2020). Como una respuesta para reducir costos y optimizar el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos, desde inicios de 1980 surge el desarrollo de herramientas para el diseño de fármacos asistidos por computadoras (CADD-*computer-aided drug design*) (Cox et al., 2022).

CADD es un término usado para representar todas aquellas herramientas computacionales para el análisis, optimización y modelamiento de compuestos con actividad biológica (Ou-Yang et al., 2012). El CADD se puede categorizarse principalmente en: diseño de fármacos basado en el ligando (LBDD-*Ligand Base Drug Design*) y diseño de fármacos basado en su estructura (SBDD-*Structure base drug design*) (Aparoy et al., 2012; Schaduangrat et al., 2020). Por una parte, el LBDD es una aproximación indirecta para agilizar el desarrollo de compuestos que posean actividad farmacológica (Aparoy et al., 2012; Stanzione et al., 2021). El desarrollo de estos compuestos se basa en el estudio de las alteraciones de moléculas que interaccionan con el objetivo de interés con el fin de potencializar la actividad farmacológica o biológica (Veerasingam, 2022). Herramientas como las relaciones de actividad de estructuras cuantitativa (QSARS-*Cuantitative Structure-Activity Relationship*) y el modelamiento de farmacólogos son ampliamente usados en LBDD

(Aparoy et al., 2012). Por otro lado, SBDD es una de las herramientas más usadas para la identificación de nuevos fármacos el cual incluye el uso de estrategias computacionales como el acoplamiento molecular y cálculos de las energías de afinidad entre un receptor y un ligando (Aparoy et al., 2012). En este proyecto de investigación, se hará uso de herramientas computacionales para el diseño de fármacos basados en su estructura incluyendo acoplamiento molecular, cálculos de la energía de afinidad, predicciones de las propiedades ADMET y, finalmente, cálculos de dinámica molecular.

1.6.1. Acoplamiento molecular.

El acoplamiento molecular es una herramienta importante para la identificación de moléculas con actividad biológica. El proceso de acoplamiento molecular se basa en la predicción de la conformación, posición, orientación y la predicción de la unión de los ligandos o moléculas pequeñas dentro de una proteína u objetivo farmacológico con estructura tridimensional conocida, tomando como base algoritmos de acoplamiento (Kitchen et al., 2004; Saikia & Bordoloi, 2018). Adicionalmente, los algoritmos de acoplamiento son complementados con funciones de puntuación que llevan a cabo la predicción del modo y lugar de unión de un ligando en la proteína; predicción de la energía libre de unión; y finalmente, el screening virtual (J. Li et al., 2019). Existe diversos softwares empleados en la industria farmacéutica y biotecnológica para realizar acoplamiento molecular, algunos de los

más comunes son AutoDock, GOLD, y GLIDE (Friesner et al., 2004; Goodsell et al., 1990; Jones et al., 1997).

Glide se basa en la función de puntuación denominada ChemScore, la cual se describe en la **ecuación 1**. El término lipofílico, $C_{lipo} \sum f(r_{lr})$, es calculado para todo los átomos del ligando (l) y del receptor (r); el término de enlace de hidrógeno, $C_{hbond} \sum g(\Delta r)h(\Delta\alpha)$; se calcula para todas las posibilidades para formar enlaces de hidrógeno entre los átomos del ligando y del receptor; el término metálico, $\sum f(r_{lm})$, es calculado para todos los átomos aceptores y aceptor/donor en el ligando (l) y cualquier metal presente en el receptor (r); y finalmente el término $C_{rotb}H_{rot}$, identifica los enlaces rotables (Eldridge et al., 1997).

$$G_{unión} = C_o + C_{lipo} \sum f(r_{lr}) + C_{hbond} \sum g(\Delta r)h(\Delta\alpha) + C_{metal} \sum f(r_{lm}) + C_{rotb}H_{rot}$$

Ecuación 1. Función de puntuación definida por ChemScore.

Glide usa dos formas de puntuación modificadas y extendidas de ChemScore denominadas GlideScore SP (Standard precision) y GlideScore XP (Extra Precision). La primera usa una función de puntuación de baja precisión, la cual sólo se enfoca en la identificación de ligandos que tienen una tendencia a unirse a la proteína (Friesner et al., 2004). Por otro lado, GlideScore XP tiene en cuenta penalizaciones en las violaciones de principios fisicoquímicos, como por ejemplo, que los grupos polares

sean expuestos adecuadamente al solvente (Friesner et al., 2004). El término lipofílico es mantenido como en ChemScore; mientras los términos que describen los enlaces de hidrógeno (hbond) y la interacción ligando-metal, usan variaciones (Friesner et al., 2004). Adicionalmente, Glide tiene en cuenta las contribuciones de las energías de interacción entre el ligando y el receptor, tal como se muestra en la **ecuación 2** (Friesner et al., 2004).

XP GlideScore

$$\begin{aligned}
 &= C_{lipo-lipo} \sum f(r_{lr}) + C_{hbond-neut-neut} \sum g(\Delta r)h(\Delta\alpha) \\
 &+ C_{hbond-neut-charge} \sum g(\Delta r)h(\Delta\alpha) \\
 &+ C_{hbond-charged-charged} \sum g(\Delta r)h(\Delta\alpha) \\
 &+ C_{max-metal-ion} \sum f(r_{lm}) + C_{rotb}H_{rotb} \\
 &+ C_{polar-phob}V_{polar-phob} + C_{coul}E_{coul} + C_{vdw}E_{vdw} \\
 &+ \textit{solvation terms}
 \end{aligned}$$

Ecuación 2. Ecuación de puntuación modificada y extendida para GlideScore.

La habilidad que tiene el acoplamiento molecular para la predicción de compuestos que se unen a un receptor y el cálculo de su energía libre de unión es de

baja confianza, por ende, se complementa con otros métodos computacionales como la dinámica molecular (DM) y cálculos de la energía libre de unión más rigurosos (Santos et al., 2019). La DM, a diferencia del acoplamiento molecular, estima el efecto de las moléculas de agua y calcula con mayor precisión la energía de afinidad, sin embargo, requiere mayor costo computacional y tiempo que el acoplamiento molecular (Okimoto et al., 2009).

1.6.2. Dinámica molecular

Las simulaciones de DM en el ámbito del descubrimiento de fármacos pueden proporcionar una gran variedad de información para guiar el proceso de optimización de un ligando.

La dinámica molecular (DM), es definido como un procedimiento de simulación que describe la variación del movimiento de los átomos en una molécula en función del tiempo (Konteaty et al., 2011). Esta variación del movimiento se realiza bajo la influencia de un campo fuerza aplicada sobre cada átomo la cual es determinada mediante la solución la segunda ley de Newton (**ecuación 3**).

Estas ecuaciones se resuelven en pequeñas variaciones de tiempo con el fin de calcular las fuerzas que actúan sobre cada partícula con el fin de determinar sus nuevas posiciones y velocidades en función del tiempo, haciendo posible determinar el comportamiento de las partículas a nivel atómico así mismo logrando la conversión de la información a términos macroscópicos (De Vivo et al., 2016).

$$m_i \ddot{\vec{r}}_i = F_i$$

Ecuación 3. Segunda ley de Newton con aplicaciones en cálculos de DM

En la **ecuación 3**, m_i representa las masas de N partículas, \vec{r}_i la posición de las partículas en función del tiempo y F_i representa la fuerza en cada una de las partículas en función de cada una de las posiciones de las mismas (Tuckerman & Martyna, 2000).

1.6.3. Campos de fuerza.

Tanto en las simulaciones de DM como en los sistemas biológicos los átomos no se encuentran aislados entre sí, sino que están sujetos a fuerzas interatómicas e intermoleculares denominados campos de fuerzas. Los campos de fuerza son una serie de ecuaciones matemáticas usadas en cálculos de la mecánica molecular (MM) el cual especifica la energía potencial de un sistema en función de las coordenadas atómicas con el fin de reproducir aspectos del comportamiento molecular como el estiramiento de los enlaces, flexión de ángulos, torsión de diedros y ángulos impropios (Monticelli & Tieleman, 2013).

Los campos de fuerza pueden variar, existen diversos software para los cálculos de los campos de fuerza dependiendo del sistema de estudio, siendo más usados en el estudio de DM en biomoléculas los campos de fuerza AMBER, CHARMM, GROMOS y OPLS-AA (Bowers et al., 2006; Brooks et al., 2009; Case

et al., 2005; González, 2011; Jorgensen et al., 1996). Sin embargo, Todos estos campos de fuerza expresan la energía potencial de un sistema químico como la suma de interacciones enlazantes y no enlazantes (**ecuación 4**)

$$E_{potencial} = \sum E_{enlazantes} + \sum E_{no-enlazantes}$$

Ecuación 4. Energía potencial total

Donde el término $\sum E_{enlazantes}$ es la suma de diferentes términos enlazantes que dependen de la estructura del enlace covalente en las moléculas. Algunas de estas incluyen términos de la longitud de enlace, ángulo de enlace y ángulos diedro (ecuación 5). Por otro lado, el término $\sum E_{no-enlazantes}$ los cuales está relacionados a aquellas interacciones no covalentes entra átomos como interacciones electrostáticas e interacciones de van der Waals (Ecuación 5.a) descritas mediante el potencial de Coulomb (ecuación 5.b) y potencial de Lennard-Jones (ecuación 5.c), respectivamente.

$$\sum E_{no-enlazantes} = \sum E_{Coulomb} + \sum E_{LJ} \quad (A)$$

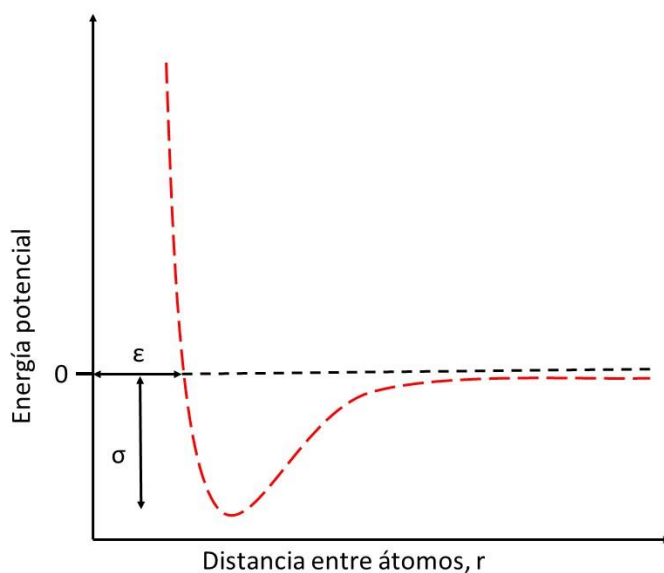
$$\sum E_{Coulomb} = k \cdot \frac{q_1 \cdot q_2}{r} \quad (B)$$

$$\sum E_{LJ} = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (C)$$

Ecuación 5. Componentes del término no-enlazante de la energía potencial

Tanto en las **ecuaciones 5B y 5C**, r se relaciona con la distancia de separación entre las dos partículas; q_1 y q_2 se refiere a las cargas de las partículas que interaccionan y k es la constante de Coulomb. Por otro otra parte, en la **ecuación c** el término σ representa la distancia entre las partículas donde el potencial cambia de signo y ϵ denota la profundidad del pozo de potencial (**Figura 3**) (X. Wang et al., 2020)

Figure 5. *Potencial de Lenard-Jones para la interacción de dos átomos.*



Actualmente existen múltiples programas para realizar simulaciones de DM debido a sus aplicaciones en el campo del descubrimiento de nuevos fármacos ya que reduce costos y tiempo. Hay programas tanto de uso libre como pago, donde los más usados para sistemas biológicos son: AMBER, DESMOND, CHARMM y

GROMACS (Bowers et al., 2006; Brooks et al., 2009; Case et al., 2005; Páll et al., 2015).

Tanto los cálculos de acoplamiento molecular como los de dinámica molecular, son acompañados de cálculos de la energía libre de unión con el fin de determinar la afinidad de las interacciones y la eficacia de los ligandos.

2.5.4 *Energía libre de unión.*

En el proceso de desarrollo de fármacos mediante herramientas de CADD es importante encontrar compuestos que se unan de una manera estable al receptor, por ende, se han desarrollado aproximaciones para la predicción de la energía libre de unión entre un ligando y un receptor (E. Wang et al., 2019). Los métodos computacionales más conocidos para la determinación de la energía libre de unión en sistemas biológicos son la mecánica molecular Poisson-Boltzmann/área de superficie (MM/PBSA- *Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface area*) y la mecánica molecular generalizada-Born/área de superficie (MM/GBSA- *Molecular Mechanics Generalized-Born Surface area*) (Hou et al., 2011; E. Wang et al., 2019).

En la aproximación MM/PBSA y MM/GBSA, la energía libre del ligando (L) unido a un receptor (R) da como resultado el complejo (RL), es descompuesta en las contribuciones de diferentes interacciones en el complejo (**ecuación 6A**)

$$\Delta G_{unión} = G_{RL} - G_R - G_L \quad (A)$$

$$\Delta G_{unión} = \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{MM} + \Delta G_{sol} - T\Delta S \quad (B)$$

$$\Delta E_{MM} \approx \Delta E_{interna} + \Delta E_{elec} + \Delta E_{vdw} \quad (C)$$

$$\Delta E_{sol} = \Delta G_{PB/GB} + \Delta G_{SA} \quad (D)$$

Ecuación 6. Descripción de la ecuación general para el cálculo de la energía libre de unión.

Donde ΔE_{MM} , ΔG_{sol} y $-T\Delta S$ son los cambios presentados en la energía mecánica molecular en fase gaseosa, energía libre de solvatación y entropía conformacional en la unión del ligando, respectivamente (E. Wang et al., 2020). Es importante recalcar que el término ΔE_{MM} incluye cambios en la energía interna ($\Delta E_{interna}$), que tiene en cuenta energías de enlaces, ángulos y diedros; también incluyen las contribuciones de las energías electrostáticas (ΔE_{elec}) y energía van der Waals (ΔE_{vdw}) (E. Wang et al., 2020). El término ΔG_{sol} , está compuesta por dos componentes: contribuciones polares ($\Delta G_{PB/GB}$) y contribuciones no polares ΔG_{SA} , calculados a partir de los modelos PB o GB y SASA, respectivamente (E. Wang et al., 2020).

Teniendo los antecedentes mencionados anteriormente relacionados con el dengue, la diana farmacológica y el uso de técnicas computacionales para la determinación de compuestos con actividad biológica, este trabajo de investigación tuvo los siguientes objetivos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Identificar, por medio de estudios *in silico*, metabolitos secundarios con potencial de interacción con el complejo proteico formado por NS2B/NS3pro, complejo clave durante el proceso de infección viral del DENV.

2.2. Objetivos específicos

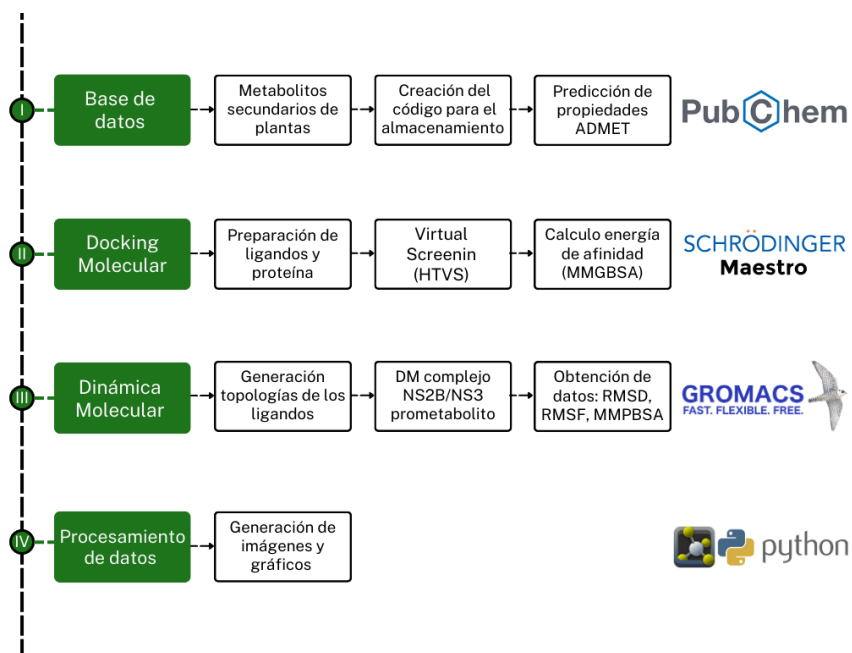
- Diseñar y alimentar una base de datos online de acceso libre de metabolitos secundarios de plantas con posible actividad inhibitoria del complejo proteico NS2B/NS3pro.
- Identificar mediante screening virtual, metabolitos secundarios de plantas con potencial de interacción con la proteína NS2B/NS3pro.
- Evaluar la estabilidad de los metabolitos seleccionados en el sitio de unión propuesto a través de simulaciones de dinámica molecular.

3. Metodología

Este proyecto de grado hizo parte del macroproyecto titulado: Fortalecimiento de capacidades instaladas de CyT en el área de Epidemiología Molecular Viroológica de la sede UIS-Guatiguará para aplicación de herramientas para atender

problemáticas asociadas con patógenos de alto riesgo para la salud humana Santander. Con el fin de desarrollar los objetivos anteriormente planteados, se procedió a realizar la metodología descrita en la **Figura 6**.

Figure 6. Esquema metodológico para el desarrollo de los objetivos planteados



3.1. Preparación de la base de datos.

Se partió con la creación de una base de datos usando firebase como herramienta de almacenamiento. Esta base de datos contuvo información sobre 4082 metabolitos secundarios de plantas con actividad antiviral reportada (material suplementario 1). La información almacenada incluye variables como código de la PubChem, nombre del metabolito, planta de origen y adicionalmente propiedades ADMET predichas por el software de libre acceso SwissADME tales como TPSA (Topological Polar Surface Area), GI (Gastrointestinal absorption), puntuación de

biodisponibilidad, número de aceptores de hidrógeno, número de donadores de hidrógeno, iLOGP (coeficiente de partición octanol/agua). Finalmente se incluyó información obtenida de la literatura relacionada con cada metabolito como Actividad biológica, organismo en el cual fue evaluada tal actividad y el link de acceso a la biografía donde reportaron tal estudio.

Con el propósito de que cualquier usuario tenga acceso a la base de datos y solo usuarios permitidos pueda editarla, se desarrolló un código para una página web usando Vue. Vue se basa en lenguajes de programación relacionado con HTML, CSS y JavaScript el cual permitió el fácil desarrollo de una interfaz amigable. Al código se le adicionaron criterios de búsqueda de tal forma que el usuario pueda filtrar información dependiendo del criterio de la variable almacenada en la base de datos.

3.2. Predicción de las propiedades ADMET.

A partir de los metabolitos obtenidos en la base de datos, se les realizó la predicción de las propiedades ADMET (Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad) mediante la herramienta QikProp de Schrodinger (Schrödinger LLC, New York, USA, 2021). El número de las violaciones a las leyes de Lipinski, la permeabilidad aparente en células Caco-2 (QPPcaco), el coeficiente de partición octanol/agua (QPlogPo/W) y los valores cualitativos de la absorción oral humana, y la puntuación a similitud de fármacos fueron definidos como criterios de selección.

3.3. Preparación de la proteína y ligandos.

La preparación de la proteína y los cálculos de acoplamiento se realizaron usando el paquete de Schrodinger Drug Discovery para modelamiento molecular (versión 2021-4). La estructura cristalina del complejo protéico NS2B/NS3pro se obtuvo de la base de datos Protein Data Bank (código PDB: 3U1I; resolución: 2.30 Å (Noble et al., 2012)). Este complejo protéico se preparó con la herramienta de Protein Preparation Wizard (Madhavi Sastry et al., 2013); donde se ajustó los estados de protonación de los aminoácidos a un pH de 7.0, se agregó hidrógenos polares, se agregaron átomos perdidos en las cadenas laterales. adicionalmente removieron las moléculas de agua y subestructuras presentes, incluyendo el ligando co-cristalizado. Finalmente se realizó una minimización de la energía usando el campo de fuerza OPLS4.

Las estructuras de los metabolitos secundarios de plantas fueron obtenidas de la base de datos PubChem en formato SDF y posteriormente se prepararon con ayuda del módulo de LigPrep de Schrodinger para generar la conformación tridimensional, ajustar el estado de protonación a un pH 7.0 ± 0.2 y la generación de todos los posibles isómeros a partir del campo de fuerza OPLS4 (Lu et al., 2021).

3.4. Screening Virtual.

Los estudios de acoplamiento molecular con los ligandos anteriormente preparados se realizaron con el módulo Glide (V8.9) (Friesner et al., 2004). Un total de 4082 metabolitos secundarios de plantas fueron dockeados dentro de una caja cubica con dimensiones de 20 Å, tomando como centro los residuos de la triada

catalítica (His-51, Asp-75 y Ser-135) y los residuos Asp-79, Asp-80 y Asp81 de la NS2B debido a su importancia en el reconocimiento del sustrato y la transición conformacional del complejo proteico (Kronenberger et al., 2021). Con el objetivo de identificar aquellos compuestos que tienen interacciones favorables con el complejo proteico NS2B/NS3pro, se usaron diferentes opciones de docking molecular con diferentes niveles de precisión que ofrece Glide, desde el modo High-Throughput Virtual Screening (HTVS), con menos precisión; seguido de Standard Precision (SP) y finalmente Extra Precision (XP), el cual posee mayor precisión en los cálculos. De los 4082 metabolitos evaluados por en HTVS, se seleccionó el 50% para evaluarlos por SP. Seguido de esto, el 20% de los metabolitos evaluados en el paso anterior fueron seleccionados para evaluarlos por XP. Finalmente, el 10% de los resultados del docking XP fueron seleccionados para posteriores análisis. Para cada uno de estos niveles de precisión se generaron 10 poses por ligando.

La selección de los mejores ligandos se basó mediante criterios como el docking score e interacciones con residuos aminoacídicos de la triada catalítica His-51, Asp-75, Ser-135 de la NS3pro. Esto debido a que, como se mencionó anteriormente, los residuos de la triada catalítica son los responsables para el correcto reconocimiento e hidrólisis del sustrato y que, además, no solo son conservados entre los cuatro serotipos del DENV, sino que también entre los virus dentro del género *Flavivirus*.

3.5. Predicción de la energía libre de unión.

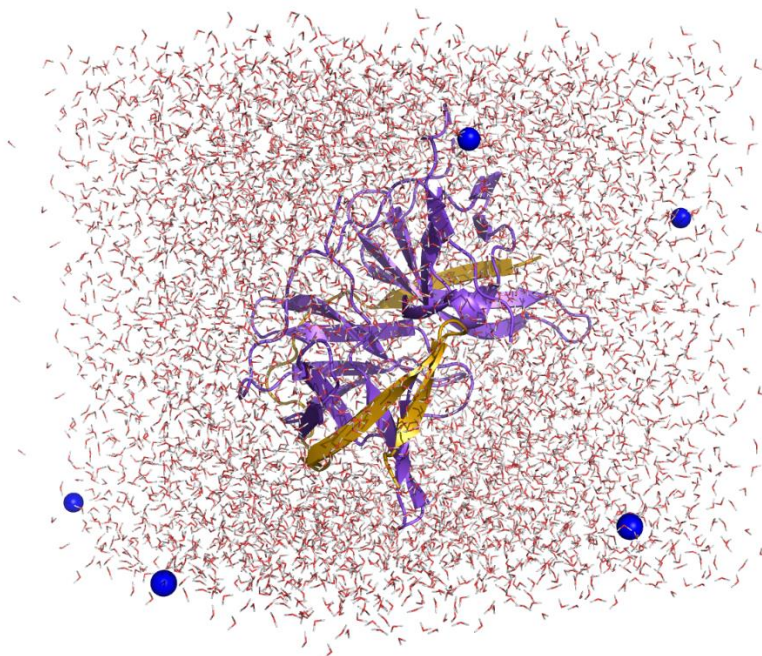
El método de energía libre de la Mecánica Molecular, el modelo Generalizado de Born y la Accesibilidad del Solvente (MM-GBSA) del módulo Prime/MM-GBSA de Schrödinger Drug Discovery fue aplicado para predecir la energía libre de unión (ΔG_{bind}) del complejo proteína-ligando obtenidos en los resultados del Docking XP (Lyne et al., 2006). Se usó el modelo de solvatación VSGB con una distancia a la cual los residuos fueron considerados como flexibles de 6.0 Å

3.6. Simulaciones de Dinámica Molecular (DM).

La dinámica molecular (DM) es una importante herramienta durante el estudio de macromoléculas debido a que se pueden analizar la estabilidad conformacional y la dinámica de la proteína y de complejos proteína-ligando. En el presente estudio se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular por duplicado de cada uno de los metabolitos seleccionados en los pasos anteriores. Estas simulaciones se llevaron a cabo en el software de GROMACS versión 2021.1. Las simulaciones iniciaron con la preparación de los ligandos con ayuda del servidor AnteChamber Python Parser interface (ACPYPE) usando el campo de fuerza Amber (GAFF) (Sousa Da Silva, 2012; J. Wang et al., 2004). Seguido se preparó el complejo proteína ligando donde se tomó el complejo proteico preparado y optimizado anteriormente en el módulo de Protein Preparation Wizard de Maestro y se generaron la correspondiente topología del complejo proteico usando el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN. Finalizado el paso anterior, se generó el complejo NS2B/NS3pro-metabolito el cual fue contenido dentro de una caja cúbica con una

distancia entre el complejo formado y las paredes de la caja de 1.2 nm. A esta caja formada se le adicionó aguas con el modelo TIP3P y se neutralizó el sistema generado con la adición de iones Na^+ y Cl^- 1 hasta una concentración final de 0,15 M. seguido se minimizó la energía del sistema anteriormente creado y se equilibró la presión y la temperatura a 310 K durante 100 ps (**Figura 7**). Finalmente, se obtuvieron los datos Root-Mean-Square Deviation (RMSD), la Root-Mean-Square Fluctuation (RMSF) y se determinó la energía de unión para el complejo NS2B/NS3pro con base en el método de Molecular/Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area (MMPBSA) (Genheden et al., 2015) durante un tiempo total de simulación de 200ns para un total de 10.000 frames.

Figure 7. Sistema generado para la dinámica molecular NS2B/NS3pro-Ligando



*Nota. *El complejo proteico está representado por los colores morado y amarillo para la NS3pro y NS2B, respectivamente. Las moléculas de agua con el modelo TIP3P está representadas en rojo y blanco correspondiente al átomo de oxígeno e hidrógeno, respectivamente. Las esferas en azul representan los iones de Na⁺ adicionados al sistema.*

3.6. Imágenes.

Las imágenes de los resultados del Docking molecular se generaron con el programa PyMol 4.4.0. Los resultados obtenidos de la dinámica molecular como el RSDF y RMSD se realizaron con ayuda de Python y la biblioteca de matplotlib.pyplot

4. Resultados y discusión

4.1. Base de datos.

El código de la página desarrollada fue alojado en el hosting de firebase donde posteriormente se generó un link de acceso (<https://base-datos-prueba-5b642.web.app/login/>). Al abrir el link, se obtiene una primera página la cual contiene la opción de inicio de sesión con Google al igual que el logo del grupo de investigación, el logo de la universidad, en la parte superior, y los logos de Colombia científica, Minciencias y del programa BioReto en la parte inferior (Figura 8A). Después de la autenticación, aparecerá una segunda página el cual habilita al usuario realizar la búsqueda dentro de la base de datos dependiendo de tres criterios: “PubChem ID”, “Nombre del compuesto” y “Nombre de la planta de origen”. Finalizada la selección del criterio de búsqueda, el usuario puede realizar la consulta. Por ejemplo, para la búsqueda del metabolito con el número de la PubChem ID de 612, se obtuvo la información almacenada en la base de datos relacionada a este metabolito (Figura 8B).

Debido a que es necesario seguir alimentando la base de datos, en la página principal y en la de los resultados se muestra un botón en la parte superior izquierda “Editar Base de datos”; el cual redirecciona al usuario a una nueva página. En esta nueva página, el usuario tiene la posibilidad de consultar, editar y agregar nueva información (Figura 8C).

Figure 8. *Interface de la base de datos de metabolitos secundarios de plantas*

A) Grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología. Login form with fields for 'Nombre de usuario' and 'Contraseña'.

B) Grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología. Search page with a search bar and a dropdown for 'PubChem ID'. Below the search bar, a 'Resumen metabolito' for 'Lactic acid' is displayed with the following properties:

- ✓ Score de Biodisponibilidad: 0.85
- ✓ Nombre: Lactic acid
- ✓ Absorción Gastrointestinal: High
- ✓ Número de aceptores de enlaces de hidrogeno: 3
- ✓ Número de donadores de enlaces de hidrogeno: 2
- ✓ ILOGP: 0.52
- ✓ Masa molecular: 90.08
- ✓ PubChem ID: 612
- ✓ Origen de planta: Coriandrum sativum
- ✓ TPSA: 57.5
- ✓ Literatura:

Actividad biológica: antimicrobial agent
 Tipo de organismo: Escoli and kibibolla spp
 Referencia: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26957978/>

C) Grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología. 'Añadir metabolito a la base de datos' form with the following sections:

- Tipo de ... (Compuete / Metabolito)
- Nombre e identificadores: PubChem ID, Número del compuesto, Origen de planta
- Propiedades ADME: Número de aceptores de enlaces de hidrogeno, Número de donadores de enlaces de hidrogeno, Masa molecular, ILOGP, Absorción Gastrointestinal, Score de Biodisponibilidad, TPSA
- Literatura: Actividad biológica, Tipo de organismo, Referencia

*Nota. *En la figura se muestran las 4 principales páginas para la consulta y almacenamiento de información relacionada con metabolitos secundarios de plantas. En la figura A. se muestra el inicio de sesión para ingresar a la base de datos. B. es la página principal para la búsqueda. C. resultados mostrados para la búsqueda realizada. D. página para la edición de la base de datos.*

4.2. Predicción de propiedades ADME y Docking Molecular.

Para el análisis del docking molecular se usó un protocolo de tres pasos. Se inició el proceso de docking molecular de los 4082 metabolitos a través de la precisión HTVS para la posterior selección del 2041 de los metabolitos con los

mejores resultados. Los metabolitos seleccionados a través del docking molecular HTVS fueron posteriormente usados para los cálculos de docking molecular a través de la precisión SP. A partir de los resultados del docking SP, se seleccionaron 408. Finalmente se llevó a cabo el docking con la precisión XP donde se eligieron 50 metabolitos para posteriores estudios *in silico* como el cálculo de la energía de unión a partir del método MM-GBSA. Para la selección de los resultados en los pasos anteriores, se tuvieron en cuenta parámetros como docking score (DS) e interacciones con residuos aminoacídicos relevantes para la actividad catalítica del complejo proteico.

En la tabla 1 se muestran los 11 mejores resultados obtenidos del screening virtual; todos ellos son metabolitos secundarios pertenecientes a la familia de los flavonoides los cuales se relacionan con los pigmentos vegetales que, en general, son compuestos hidrofílicos (Havsteen, 2002). Algunos de estos metabolitos han demostrado actividades biológicas tales como anticáncer, antioxidante, antiinflamatorio etc. (Čvorović et al., 2018; S. J. Lee et al., 2013).

Tabla 1. Propiedades farmacológicas de los metabolitos secundarios seleccionados después del docking molecular XP.

Metabolito	Peso molecular (g/mol)	$\Delta G_{(unión)}$ kcal/mol	DS	Similitud	Violaciones reglas de Lipinski	Caco-2	QPlogPo/W
Cianidina 3-diglucósido 5-glucósido	773,7	-98,19	-13,88	13	3	0,082	-5,197
Sambicianina	581,5	-97,1	-10	9	3	2,141	-2,15
Camelliaside A	756,7	-93,07	-10,782	13	3	0,274	-3,934
Quercetina 3-gentiobiosido	626,5	-91,99	13,151	12	3	0,251	-3,336
Oenin	493,4	-87,36	-7,294	3	2	10,438	-2,513
Peonidina 3,5-diglucósido	625,6	-87,22	-10,05	11	3	1,627	-2,513
Delphinidín 3-O-sambubioside	597,5	-86,98	-7,488	10	3	2,182	-2,715
Meratina	626,5	-83,92	-12,274	11	3	0,526	-3,24

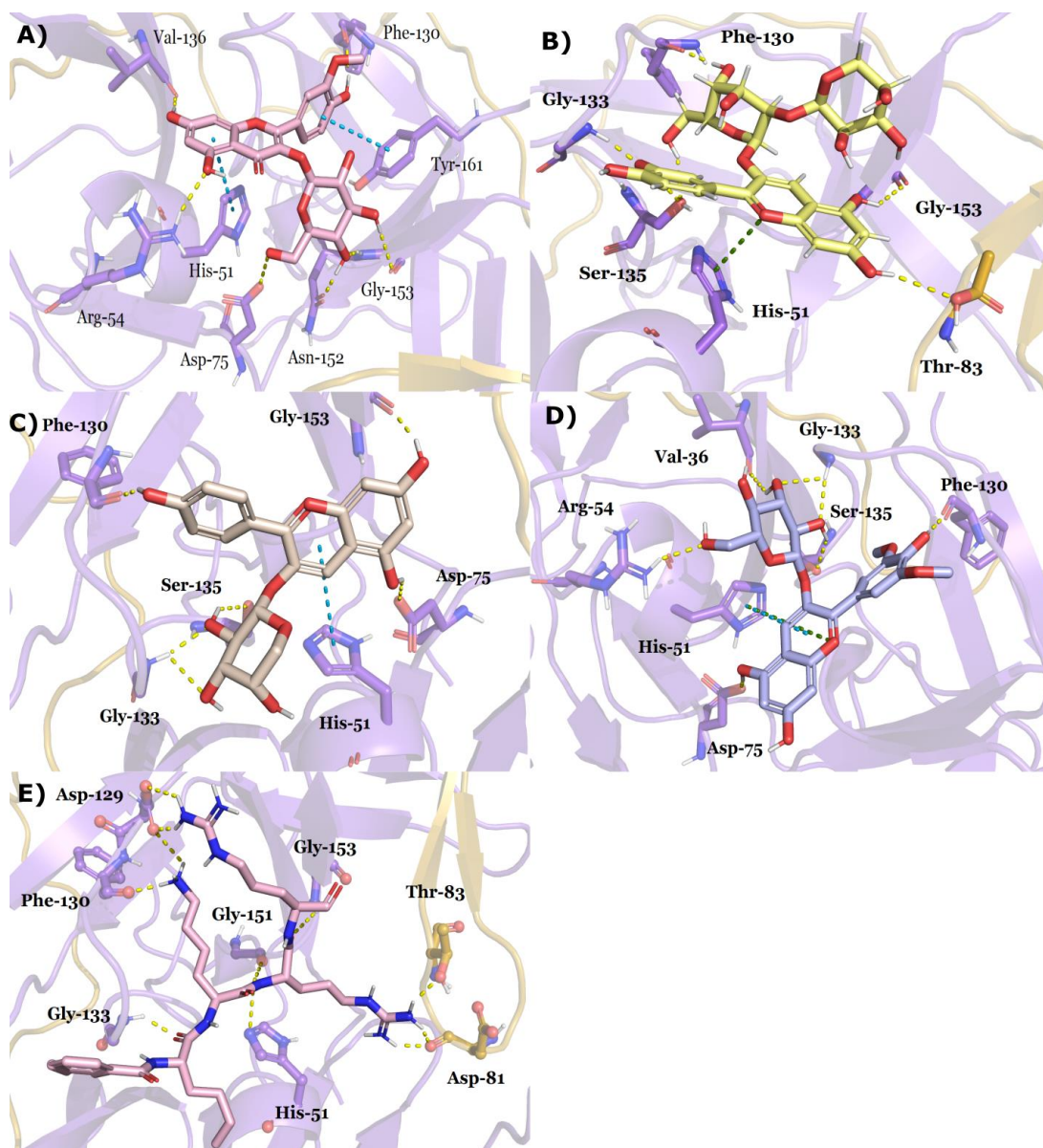
Pelargonidina 3-arabinósido	403,4	-79,7	-7,256	0	1	22,167	-0,014
Miricetina 3-(2G-ramnosilrutinósido))	772,7	-75,81	-12,624	16	3	0,15	-3,866
Isorhamnetina-3-O-glucósido	478,4	-69,32	-8,709	4	2	9,268	-0,684

En términos de la energía de unión, los metabolitos mostrados en la tabla 1 se distribuyen en un rango de energía entre los $-65,74 \text{ kcal/mol}$ y $-98,19 \text{ kcal/mol}$. Si tenemos en cuenta las propiedades ADMET predichas, se destaca la pelargonidina 3-arabinósido (DS: $-7,256$, energía de unión: $-79,7 \text{ kcal/mol}$, **tabla 1**) debido a que demuestra ser el metabolito con la mejor permeabilidad en células Caco-2, siendo estas un modelo que describe la barrera intestinal; adicionalmente, posee un valor en el coeficiente de partición octanol-agua (QPlogPo/W) dentro de los rangos aceptables ($-2,0-6,5$). Cabe resaltar que la pelargonidina 3-arabinósido solo posee una violación a las reglas de Lipinski, lo cual se traduce en una mayor probabilidad de ingreso a lumen celular mediante transporte pasivo. Lo anterior lo confirma estudios *in vitro* donde se determinó la biodisponibilidad de metabolitos derivados de la pelargonidina, incluida la pelargonidin-3-O-glucoside un metabolito similar a la pelargonidina 3-arabinósido, demostrando una alta absorción oral y detección en plasma sanguíneo (Mullen et al., 2008; Xu et al., 2021). También se destacan oenin (DS: $-7,294$ y energía de unión $-65,36 \text{ kcal/mol}$, **tabla 1**) que, aunque posee un QPlogPo/W fuera del rango aceptable ($-2,0 - 6,0$), posee una puntuación de similitud a fármacos de 3 (valores aceptables entre 0 y 5) y solo dos violaciones a las reglas de Lipinsky (más de 5 átomos donadores de hidrógenos y más de 10 átomos

aceptores de hidrógenos). Finalmente, los compuestos isorhamnetina-3-O-glucósido (DS: $-8,709$ y energía de unión $-65,74$ kcal/mol, **tabla 1**) y sambicianina (Energía de unión: $-79,7$ kcal/mol, DS: $-7,256$, **tabla 1**) que, si bien son compuestos con menor biodisponibilidad que los anteriores mencionados, sus interacciones con residuos aminoacídicos claves predichas por el docking molecular lo hace relevante para estudios más a detalle. Los modos de unión para los cuatro metabolitos secundarios anteriormente mencionados y el inhibidor peptídico de referencia Bz-nKKR-H son ilustrados en la **figura 9**. En general, los cuatro metabolitos, junto con

el inhibidor, comparten interacciones tipo puentes de hidrógeno con la Phe-130 y con Gly-153, excepto para el oenin.

Figure 9. *Interacciones predichas por el docking molecular.*



Nota. *Cada conjunto de átomos de los residuos y de los metabolitos poseen un código de color. Oxígenos: rojo. Nitrógenos: azul. Los metabolitos están nombrados de A – E: A. Isorhamnetina-3-O-glucósido, B. Sambicianina, C.

Pelargonidina 3-arabinósido, D. Oenin, E, inhibidor Bz-nKKR-H. La cadena de la NS2B se presenta en color amarillo mientras que NS3pro se presenta en morado. las líneas punteadas representan las interacciones entre la NS2B/NS3pro y el metabolito: Interacciones tipo puente de hidrógeno (color amarillo). Interacciones tipo π - π mientras (color azul). Interacciones tipo π -catión (color verde).

La isorhamnetina-3-O-glucósido (Figura 9 A.) muestra interacciones muy interesantes con el complejo proteico NS2B/NS3pro. Entre ellas se destacan interacciones tipo puente de hidrógeno con Asp-75 y una interacción tipo π - π con His-51 e interacciones hidrofílicas con Ser-135, los cuales hacen parte de la triada catalítica. Para este mismo metabolito el docking molecular predice interacciones tipo puente de hidrógeno con Phe-130 y Asn-152, Gly-153 e interacción tipo π - π con Tyr-161 los cuales demostraron ser responsables de la estabilización del sustrato mediante interacciones con los residuos en las posición P1 y P4, por los cuales han sido postulados como potenciales sitios unión de ligando (Kronenberger et al., 2021; Noble et al., 2012; Yotmanee et al., 2015). Estas interacciones con aminoácidos relevantes para el reconocimiento del sustrato podrían relacionarse como una posible inhibición de su actividad catalítica al no permitir que el sustrato se posicione en los sitios de unión correspondientes impidiendo el procesamiento proteolítico. Adicional a las interacciones anteriormente mencionadas, la isorhamnetina-3-O-glucósido presenta interacciones tipo puentes de hidrógeno con Arg-54, Val-136.

La sambicianina (Figura 9B.) hace parte de un grupo de metabolitos secundarios denominados antocianinas. Para efectos del presente estudio, el docking molecular predijo interacciones tipo puente de hidrógeno con la Ser-135 e interacciones tipo π -catión con la His-51 que, como se ha mencionado anteriormente, hacen parte de la triada catalítica. Adicionalmente se predice interacciones tipo puente de hidrógeno con la Phe-130, Gly-133 y Gly-153 en la NS3pro y Thr-83 de la NS2B. A parte de los puentes de hidrógeno, posee una interacción polar con Gly-133. Los residuos Gly-133 y Ser-135 (Anexo 4), hacen parte del sitio de unión de sustrato S1, que junto con Gly-153, son potenciales sitios de unión y reconocimiento de inhibidores (de Almeida et al., 2013; Kronenberger et al., 2021).

La pelargonidina 3-arabinósido (Figura 9C) es uno de los seis derivado de la antocianina de mayor abundancia en la naturaleza. Esdtudios *in vivo* y en humanos han demostrado que compuestos similares a la pelargonidina 3-arabinósido, como la pelargonidina-3-O-glucósido, es absorbido despues de la administración oral; siendo el transporte pasivo uno de los involucrados en la absorción (Mullen et al., 2008; Xu et al., 2021). En el presente estudio de docking molecular, se presentaron interacciones con residuos aminoacídicos claves para la actividad enzimática de la NS2B/NS3pro. Entre ellas, interacciones con los residuos de la triada catalítica: tipo puente de hidrógeno con Ser-135 y Asp-75 y con la His-51. Adicionalmente presenta interacciones tipo puentes de hidrógeno con Gly-133 y Gly-153; los cuales han sido propuestos como importantes sitios de unión para el sustrato ya que actúan como estabilizadores del intermediario del oxoanión tetraédrico formado durante la hidrolisis del sustrato(Gibbs et al., 2018; Lima & Seabra, 2016; Timiri et al., 2016).

Adicional a la interacción tipo puente de hidrógeno con Ser-135, el docking molecular sugiere que la pelargonidina 3-arabinósido tiene interacciones débiles del tipo hidrofílicas con este residuo e interacciones hidrofóbicas con la Val-52. Finalmente, se presenta una interacción tipo puente de hidrógeno con Phe-130 la cual se presenta en con todos los metabolitos, incluido el compuesto de referencia (Figura 10E). Las interacciones tipo puente de hidrógeno sugeridas por el docking molecular con los residuos de la triada catalítica junto con las interacciones con los residuos en los sitios de unión de sustrato (Gly-133 y Gly-153) podría conducir a una posible inhibición de la actividad catalítica (de Almeida et al., 2013; Erbel et al., 2006; Kronenberger et al., 2021).

El oenin, (figura 9D), es un derivado catiónico de la antocianina que posee un residuo tipo beta-D-glucosilo unido al carbono en la posición 3'. Presenta interacciones tipo puentes de hidrógeno, π -catión y π - π , con residuos de la triada catalítica. Con el aminoácido His-51, tiene dos interacciones: una interacción tipo π - π con el anillo aromático y tipo π -catión con el oxígeno que se encuentra cargado positivamente. Adicionalmente, con la Asp-75, un aminoácido cargado negativamente, se predice una interacción tipo puente de hidrógeno a través del hidróxido enlazado al carbono 5. Finalmente, con el residuo Ser-135, predice una interacción tipo puente de hidrógeno. Fuera de los residuos de la triada catalítica, el oenin muestra interacciones con Gly-133, un aminoácido que ha sido discutido anteriormente por su relevancia como sitio de unión de sustrato.

El complejo proteico NS2B/NS3pro junto con los cuatro metabolitos anteriormente discutidos como relevantes debido a los resultados del docking molecular, energía de unión y propiedades ADMET, fueron sometidos a simulaciones de dinámica molecular por un tiempo total de 200 ns con el fin de estudiar la estabilidad y la variación conformacional de la proteína y el metabolito.

4.2. Dinámica molecular

Con el fin de evaluar la estabilidad de los metabolitos seleccionados y propuestos por el docking molecular, se analizaron los datos del RMSD y del RMSF obtenidos durante los 200 ns de simulación. RMSD (En inglés – Root Mean Square Deviation) es usado para la medición de la diferencia en la posición de los átomos de una proteína o del ligando a lo largo del tiempo. Por lo tanto, un RMSD pequeño es interpretado como una mayor estabilidad de la proteína o del ligando (Kufareva & Abagyan, 2012). Por otro lado, el RMSF (En inglés – Root Mean Square Fluctuation) representa el promedio del desplazamiento de un átomo o, particularmente aminoácido, durante la simulación. Lo anterior indica que valores altos de RMSF se interpretan como una alta flexibilidad del aminoácido (Kufareva & Abagyan, 2012).

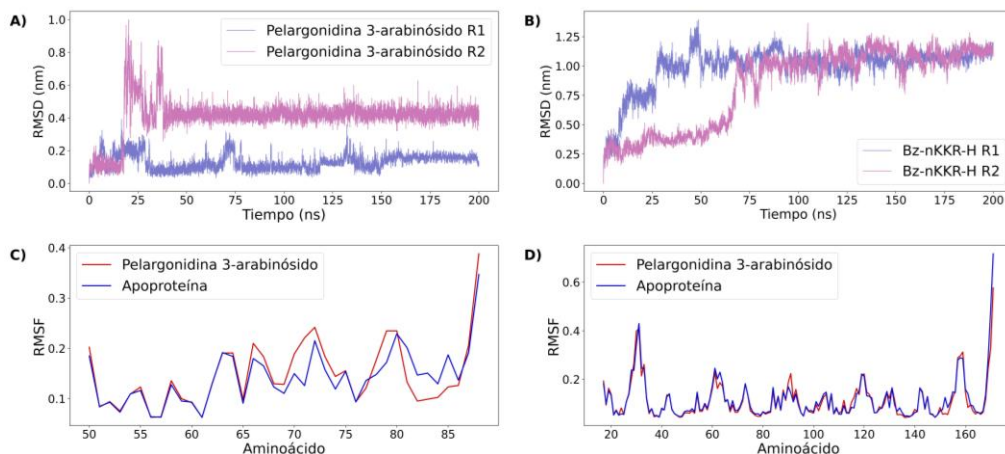
Se analizaron los resultados de la dinámica molecular del complejo protéico NS2B/NS3pro junto con los metabolitos sambicianina, oenin, pelargonidina 3-arabinósido, isorhamnetina-3-O-glucósido, el inhibidor y sin metabolito (apoproteína). Sin embargo, para facilitar el entendimiento el entendimiento de los resultados de DM se realizará un énfasis en la pelargonidina 3-arabinósido debido a que presenta una mejor estabilidad. No obstante, sambicianina, oenin e

isorhamnetina-3-O-glucósido alcanzan una rápida estabilización en el sitio predicho por el docking molecular después de los 50 ns de simulación seguido de unos cambios abruptos notables del RMSD a lo largo de la simulación (Anexo 3).

En la figura 10 se observa los resultados de DM de la pelargonidina 3-arabinósido y el ligando de referencia Bz-nKKR-H los cuales incluyen el RMSD y el RMSF de dos simulaciones independientes. En la figura 10A y 10B muestra dos réplicas del RMSD de la pelargonidina 3-arabinósido y el ligando de referencia a lo largo de un tiempo de simulación de 200 ns los cuales presentan un promedio en los valores del RMSD de $0,2682 \pm 0,06549 \text{ nm}$ y $0,9113 \pm 0,2881 \text{ nm}$, respectivamente. Para las réplicas de la pelargonidina 3-arabinósido (figura 10A) alcanzan una mayor estabilidad el metabolito después de los 50 ns de simulación con un RMSD no mayor a $0,430 \text{ nm}$. Lo anterior sugiere que la mayor parte de la simulación la pelargonidina 3-arabinósido se mantiene en su sitio predicho por el docking molecular y posiblemente interactuando con los aminoácidos predichos con una mayor estabilidad comparado con el ligando de referencia. Adicionalmente, la pelargonidina 3-arabinósido a lo largo de los 200 ns de simulación presenta una energía de unión de $-31,1819 \pm 4,4775 \text{ kcal/moly}$ $-26,4383 \pm 2,5945 \text{ kcal/mol}$, **tabla 2** ; para la réplica 1 y réplica 2, respectivamente. Por su parte, el ligando de referencia Bz-nKKR-H, figura 10B, el cual llegó a una estabilización cerca a los 80 ns, con un RMSD después de estabilizarse cerca de los 1.3 nm, mucho mayor que la

pelargonidina 3-arabinósido. A pesar de esto, según la tabla 2 el ligando de referencia obtuvo la mejor energía de unión a lo largo de todo el tiempo de simulación.

Figure 100. *RMSD y RMSF obtenidos durante los 200 ns de simulación*



*Nota. *Representación del RMSD y RMSF para el complejo proteico NS2B/NS3pro en presencia del metabolito y sin el metabolito (apoproteína). A. Resultados del RMSD para la pelargonidina 3-arabinósido para la réplica 1 (color morado) y para la réplica 2 (color rosado). C. Resultados del RMSF para la NS2B sin el metabolito o apoproteína (rojo) y en presencia de la pelargonidina 3-arabinósido (azul).*

Adicionalmente se presenta promedio del RMSF de dos simulaciones independiente, donde el promedio de sus valores es $0,147 \pm 0,0655 \text{ nm}$ y $0,142 \pm 0,0550 \text{ nm}$, respectivamente para la NS2B en presencia de la pelargonidina 3-arabinósido y la apoproteína (Figura 10B). Mientras para el dominio proteasa NS3pro, el promedio de los valores del RMSF es de $0,112 \pm 0,0781 \text{ nm}$ y $0,118 \pm 0,0862 \text{ nm}$ (Figura 10B). Lo anterior indican que la pelargonidina 3-arabinósido

genera un leve cambio conformacional mayormente aportado por la flexibilidad de los aminoácidos Ser 71 y His-72 en la NS2B; incluso se logra observar una leve fluctuación en los aminoácidos Asp-79 y Asp80, también de la NS2B, que junto con la Asp-81 conforman una región de aminoácidos cargados negativamente los cuales han sido postulados como relevantes para el reconocimiento de inhibidores y la transición conformacional entre abierto-cerrado del complejo proteico (Erbel et al., 2006; Kronenberger et al., 2021).

Tabla 2. Resultados para el promedio de la energía de unión para los metabolitos durante los 200 ns de simulación. Réplica 1 (R1) y réplica 2 (R2)

Metabolito	R1 $\Delta G_{(unión)}$ kcal/mol	Desviación Estándar	R2 $\Delta G_{(unión)}$ kcal/mol	Desviación Estándar
Isorhamnetina-3-O-glucósido	-29,5653	±4,017	-29,8036	±5,4416
Sambicianina	-37,2708	±3,1787	-36,7469	±4,2956
Ligando Ref	-42,084	±5,8432	-35,1842	±8,5956
pelargonidina 3-arabinósido	-31,1819	±4,4775	-26,4383	±2,5945
Oenina	-29,3082	±5,8157	-16,1779	±4,5969

Teniendo en cuenta lo anterior, junto con la estabilidad de la pelargonidina 3-arabinósido observado en el RMSD, ésta podría inducir el cambio conformacional en el complejo proteico dando como resultado una posible inhibición de su actividad catalítica. Por otro lado, el comportamiento en el dominio proteasa se observa una leve estabilización de la proteína en presencia de la pelargonidina 3-arabinósido de acuerdo con los resultados del RMSF. Este fenómeno ha sido observado en inhibidores allostéricos, como la curcumina, en estudios de dinámica molecular lo cual podría implicar una relación con la posible inhibición del complejo proteico producto de la interacción con la pelargonidina 3-arabinósido (Lim et al., 2020b)

4. Conclusiones.

- Se logró diseñar e implementar una base de datos con información de la biodisponibilidad de metabolitos secundarios de plantas para la rápida consulta de información y uso en futuras investigaciones computacionales.

- Los resultados de docking molecular permiten identificar la sambicianina, oenin, pelargonidina 3-arabinósido, isorhamnetina-3-O-glucósido como posibles inhibidores del complejo proteico NS2B/NS3pro mediada por interacciones principalmente tipo puentes de hidrógeno con los residuos de la triada catalítica, His-51, Asp-75 y Ser-135; al igual que interacciones tipo puente de hidrógeno e hidrofóbicas con residuos como Gly-133 y Gly-153 que, si bien no hace parte de la triada catalítica, son relevante para el reconocimiento y procesamiento del sustrato.

- Se propone la Pelargonidina 3-arabinósido como el mejor posible inhibidor del complejo proteico NS2B/NS3pro debido a que posee las mejores propiedades ADMET, interacciones con residuos de la triada catalítica predichas por el docking, energía de afinidad y, finalmente, por su estabilidad dentro del sitio activo durante la simulación de dinámica molecular.

Recomendaciones

Inicialmente se recomienda realizar simulaciones mayores a los 200 ns con el fin de confirmar la estabilidad del ligando dentro del sitio de unión y así poder determinar posibles transiciones conformacionales del complejo proteico

NS2B/NS3pro en presencia del inhibidor. Finalmente, se recomienda realizar ensayos *in vitro* de la actividad de la pelargonidina 3-arabinósido sobre el complejo proteico NS2B/NS3pro y de esta forma lograr proponerlo como posible agente terapéutico contra la infección por el DENV.

Finalmente se recomienda mejorar el código de la base de datos con el fin de almacenar información relacionada con la estructura 3D de cada uno de los metabolitos secundarios al igual la posibilidad de agregar más información.

Divulgación de resultados

Los resultados fueron presentados en el I Congreso Internacional de Ciencias Biomédicas (CICB) en los días 10 – 13 de noviembre de 2021.



LA UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
Certifica que:

YILBER NIYER CÁRDENAS FLOREZ

Participó en el **I Congreso Internacional en Ciencias Biomédicas: Epidemias, Endemias y Pandemias Persistentes y Emergentes**, organizado por el Departamento de Ciencias Básicas, Escuela de Medicina, Facultad de Salud, que se realizó del 11 al 13 de noviembre de 2021, en Bucaramanga, Colombia.



Maria Carolina Velásquez Martínez
Directora Departamento de Ciencias Básicas – Escuela de Medicina



Mario Felipe Negrette Guzmán
Coordinador de Posgrado - Departamento de Ciencias Básicas – Escuela de Medicina



Adicionalmente, los resultados fueron presentados en el foro virtual LatinXChem en modalidad de póster realizado el 20 de septiembre el 2021.



September 24, 2021

This is to certify that

Yilber Niyer C. Florez, Luis C. Vesga, and Stelia Carolina Mendez Sanchez

participated in the #LatinXChem Twitter Conference 2021 on Sept. 20, 2021 with the poster #BIO089 entitled:

Phytochemical compounds identification as potential antiviral agents against dengue virus (DENV) targeting NS2B/NS3pro

A stylized, abstract signature in black ink.

Gabriel Merino
on behalf of the
#LatinXChem Organizing Committee

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Luciana Gonzaga de Oliveira".

Luciana Gonzaga de Oliveira
#LXChemBio organizer

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Lorena Betancor".

Lorena Betancor
#LXChemBio organizer

Agradecimientos

Agradecimientos al proyecto SGR BPIN 2020000100126 “Fortalecimiento de capacidades instaladas de CyT en el área de Epidemiología Molecular Viroológica de la sede UIS-Guatiguará para aplicación de herramientas para atender problemáticas asociadas con patógenos de alto riesgo para la salud humana Santander”

Agradecimientos a Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, Ministerio de Educación Nacional, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo e ICETEX. Convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica. Fondo Francisco José de Caldas, Contrato RC-FP44842-212-2018. Programa Bio-Reto XXI-15:50.

Referencias Bibliográficas

- Aparoy, P., Reddy, K. K., & Reddanna, P. (2012). Structure and Ligand Based Drug Design Strategies in the Development of Novel 5-LOX Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 19(22), 3763.
<https://doi.org/10.2174/092986712801661112>
- Bachar, S. C., Mazumder, K., Bachar, R., Aktar, A., & Al Mahtab, M. (2021). A Review of Medicinal Plants with Antiviral Activity Available in Bangladesh and Mechanistic Insight Into Their Bioactive Metabolites on SARS-CoV-2, HIV and HBV. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 3137.
<https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.732891/BIBTEX>
- Behnam, M., & Klein, C. (2020). Conformational selection in the flaviviral NS2B-NS3 protease. *Biochimie*, 174, 117–125.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2020.04.014>
- Bowers, K. J., Chow, E., Xu, H., Dror, R. O., Eastwood, M. P., Gregersen, B. A., Klepeis, J. L., Kolossvary, I., Moraes, M. A., Sacerdoti, F. D., Salmon, J. K., Shan, Y., & Shaw, D. E. (2006). Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters. *Proceedings of the 2006 ACM/IEEE Conference on Supercomputing, SC'06*.
<https://doi.org/10.1145/1188455.1188544>
- Brooks, B. R., Brooks, C. L., Mackerell, A. D., Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., Im, W., ...

- Karplus, M. (2009). CHARMM: The biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry*, 30(10), 1545–1614.
<https://doi.org/10.1002/JCC.21287>
- Case, D. A., Cheatham, T. E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K. M., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., & Woods, R. J. (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1668–1688. <https://doi.org/10.1002/JCC.20290>
- Chen, H.-R., Lai, Y.-C., & Yeh, T.-M. (2018). Dengue virus non-structural protein 1: a pathogenic factor, therapeutic target, and vaccine candidate. *Journal of Biomedical Science 2018 25:1*, 25(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12929-018-0462-0>
- Chen, W.-N., Loscha, K. V., Nitsche, C., Graham, B., & Otting, G. (2014). The dengue virus NS2B–NS3 protease retains the closed conformation in the complex with BPTI. *FEBS Letters*, 588(14), 2206–2211.
<https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2014.05.018>
- Cox, P. B., & Gupta, R. (2022). Contemporary Computational Applications and Tools in Drug Discovery. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 13(7), 1016–1029.
https://doi.org/10.1021/ACSMEDCHEMLETT.1C00662/ASSET/IMAGES/LARGE/ML1C00662_0001.JPEG
- Čvorović, J., Zibera, L., Fornasaro, S., Tramer, F., & Passamonti, S. (2018).

Bioavailability of Flavonoids: The Role of Cell Membrane Transporters.

Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease, 295–320.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813006-3.00022-2>

Dang, M., Lim, L., Roy, A., & Song, J. (2022). Myricetin Allosterically Inhibits the

Dengue NS2B-NS3 Protease by Disrupting the Active and Locking the

Inactive Conformations. *ACS Omega*, 7(3), 2798–2808.

https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.1C05569/SUPPL_FILE/AO1C05569_SI_001.PDF

de Almeida, H., Bastos, I. M. D., Ribeiro, B. M., Maigret, B., & Santana, J. M.

(2013). New Binding Site Conformations of the Dengue Virus NS3 Protease

Accessed by Molecular Dynamics Simulation. *PLoS ONE*, 8(8).

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0072402>

De Vivo, M., Masetti, M., Bottegoni, G., & Cavalli, A. (2016). Role of Molecular

Dynamics and Related Methods in Drug Discovery. *Journal of Medicinal*

Chemistry, 59(9), 4035–4061.

https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.5B01684/ASSET/IMAGES/LARGE/JM-2015-016843_0006.JPEG

Dey, D., Poudyal, S., Rehman, A., & Hasan, S. S. (2021). Structural and

biochemical insights into flavivirus proteins. *Virus Research*, 296, 198343.

<https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2021.198343>

Du, M., Jing, W., Liu, M., & Liu, J. (2021). The Global Trends and Regional

Differences in Incidence of Dengue Infection from 1990 to 2019: An Analysis from the Global Burden of Disease Study 2019. *Infectious Diseases and Therapy*, 10(3), 1625–1643. <https://doi.org/10.1007/S40121-021-00470-2/FIGURES/4>

Dwivedi, V. D., Bharadwaj, S., Afroz, S., Khan, N., Ansari, M. A., Yadava, U., Tripathi, R. C., Tripathi, I. P., Mishra, S. K., & Kang, S. G. (2020). Anti-dengue infectivity evaluation of bioflavonoid from *Azadirachta indica* by dengue virus serine protease inhibition. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1734485>, 39(4), 1417–1430. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1734485>

Eldridge, M. D., Murray, C. W., Auton, T. R., Paolini, G. V., & Mee, R. P. (1997). Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 1997 11:5, 11(5), 425–445. <https://doi.org/10.1023/A:1007996124545>

Erbel, P., Schiering, N., D'Arcy, A., Renatus, M., Kroemer, M., Lim, S. P., Yin, Z., Keller, T. H., Vasudevan, S. G., & Hommel, U. (2006). Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. *Nature Structural & Molecular Biology* 2006 13:4, 13(4), 372–373. <https://doi.org/10.1038/nsmb1073>

Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., Repasky, M. P., Knoll, E. H., Shelley, M., Perry, J. K., Shaw, D. E.,

Francis, P., & Shenkin, P. S. (2004). Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7), 1739–1749.

https://doi.org/10.1021/JM0306430/SUPPL_FILE/JM0306430_S.PDF

Genheden, S., & Ryde, U. (2015). The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 10(5), 449. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1032936>

Gibbs, A. C., Steele, R., Liu, G., Tounge, B. A., & Montelione, G. T. (2018).

Inhibitor Bound Dengue NS2B-NS3pro Reveals Multiple Dynamic Binding Modes. *Biochemistry*, 57(10), 1591–1602.

https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCHEM.7B01127/ASSET/IMAGES/LARGE/BI-2017-01127N_0008.JPEG

Gómez, L. A., Stashenko, E., & Ocazonez, R. E. (2013). Comparative Study on In Vitro Activities of Citral, Limonene and Essential Oils from *Lippia citriodora* and *L. alba* on Yellow Fever Virus:

<https://doi.org/10.1177/1934578X1300800230>, 8(2), 249–252.

<https://doi.org/10.1177/1934578X1300800230>

González, M. A. (2011). Force fields and molecular dynamics simulations. *École Thématique de La Société Française de La Neutronique*, 12, 169–200.

<https://doi.org/10.1051/SFN/201112009>

Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (1990). Automated docking of substrates to proteins

by simulated annealing. *Proteins*, 8(3), 195–202.

<https://doi.org/10.1002/PROT.340080302>

Gorlenko, C. L., Kiselev, H. Y., Budanova, E. V., Zamyatnin, A. A., Jr., & Ikryannikova, L. N. (2020). Plant Secondary Metabolites in the Battle of Drugs and Drug-Resistant Bacteria: New Heroes or Worse Clones of Antibiotics? *Antibiotics*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9040170>

Gubler, D. J. (2011). Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. *Tropical Medicine and Health*, 39(4SUPPLEMENT), S3–S11. <https://doi.org/10.2149/TMH.2011-S05>

Gutierrez-Barbosa, H., Medina-Moreno, S., Zapata, J. C., & Chua, J. V. (2020). Dengue Infections in Colombia: Epidemiological Trends of a Hyperendemic Country. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 5(4). <https://doi.org/10.3390/TROPICALMED5040156>

Halsey, E. S., Marks, M. A., Gotuzzo, E., Fiestas, V., Suarez, L., Vargas, J., Aguayo, N., Madrid, C., Vimos, C., Kochel, T. J., & Laguna-Torres, V. A. (2012). Correlation of Serotype-Specific Dengue Virus Infection with Clinical Manifestations. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6(5), e1638. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0001638>

Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96(2–3), 67–202. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(02\)00298-X](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(02)00298-X)

- Higuera, A., & Ramírez, J. D. (2019). Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: An update. *Acta Tropica*, *190*, 99–111. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2018.11.010>
- Hou, T., Wang, J., Li, Y., & Wang, W. (2011). Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 1. The accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *51*(1), 69–82. https://doi.org/10.1021/CI100275A/SUPPL_FILE/CI100275A_SI_001.PDF
- Jing, Q., & Wang, M. (2019). Dengue epidemiology. *Global Health Journal*, *3*(2), 37–45. <https://doi.org/10.1016/J.GLOHJ.2019.06.002>
- Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., & Taylor, R. (1997). Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of Molecular Biology*, *267*(3), 727–748. <https://doi.org/10.1006/JMBI.1996.0897>
- Jorgensen, W. L., Maxwell, D. S., & Tirado-Rives, J. (1996). Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *Journal of the American Chemical Society*, *118*(45), 11225–11236. https://doi.org/10.1021/JA9621760/SUPPL_FILE/JA11225.PDF
- Karamese, M., Aydogdu, S., Karamese, S. A., Altoparlak, U., & Gundogdu, C. (2015). Preventive effects of a major component of green tea, epigallocatechin-3-gallate, on hepatitis-B virus DNA replication. *Asian*

Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP, 16(10), 4199–4202.

<https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.10.4199>

Kim, H., & Chung, M. S. (2018). Antiviral Activities of Mulberry (*Morus alba*) Juice and Seed against Influenza Viruses. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2606583>

Kim, Y. M., Gayen, S., Kang, C. B., Joy, J., Huang, Q., Chen, A. S., Wee, J. L. K., Ang, M. J. Y., Lim, H. A., Hung, A. W., Li, R., Noble, C. G., Lee, L. T., Yip, A., Wang, Q. Y., Chia, C. S. B., Hill, J., Shi, P. Y., & Keller, T. H. (2013). NMR analysis of a novel enzymatically active unlinked dengue NS2B-NS3 protease complex. *Journal of Biological Chemistry*, 288(18), 12891–12900. <https://doi.org/10.1074/JBC.M112.442723/ATTACHMENT/037016CB-02CD-41FE-A1B7-3F2B19EC32EE/MMC1.PDF>

Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., & Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery* 2004 3:11, 3(11), 935–949. <https://doi.org/10.1038/nrd1549>

Klein, D. E., Choi, J. L., & Harrison, S. C. (2013). Structure of a Dengue Virus Envelope Protein Late-Stage Fusion Intermediate. *Journal of Virology*, 87(4), 2287. <https://doi.org/10.1128/JVI.02957-12>

Konteatis, Z. D., Klon, A. E., Zou, J., & Meshkat, S. (2011). Computational Approach to De Novo Discovery of Fragment Binding for Novel Protein

States. *Methods in Enzymology*, 493, 357–380. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381274-2.00014-5>

Kronenberger, T., M. S. M. S., A. K. T., V. G. M., & A. P. (2021). Ligand Accessibility Insights to the Dengue Virus NS3-NS2B Protease Assessed by Long-Timescale Molecular Dynamics Simulations. *ChemMedChem*, 16(16), 2524–2534. <https://doi.org/10.1002/CMDC.202100246>

Kularatne, S. A., & Dalugama, C. (2022). Dengue infection: Global importance, immunopathology and management. *Clinical Medicine*, 22(1), 9–13. <https://doi.org/10.7861/CLINMED.2021-0791>

Lee, C. M., Xie, X., Zou, J., Li, S.-H., Lee, M. Y. Q., Dong, H., Qin, C.-F., Kang, C., & Shi, P.-Y. (2015). Determinants of Dengue Virus NS4A Protein Oligomerization. *Journal of Virology*, 89(12), 6171–6183. <https://doi.org/10.1128/JVI.00546-15>

Lee, J. S., Lourenço, J., Gupta, S., & Farlow, A. (2018). A multi-country study of dengue vaccination strategies with Dengvaxia and a future vaccine candidate in three dengue-endemic countries: Vietnam, Thailand, and Colombia. *Vaccine*, 36(17), 2346–2355. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2018.03.002>

Lee, S. J., Hong, S., Yoo, S. H., & Kim, G. W. (2013). Cyanidin-3-O-sambubioside from *acanthopanax sessiliflorus* fruit inhibits metastasis by downregulating MMP-9 in breast cancer cells MDA-MB-231. *Planta Medica*, 79(17), 1636–1640. <https://doi.org/10.1055/S-0033-1350954/BIB>

- Leonel, C. A., Lima, W. G., dos Santos, M., Ferraz, A. C., Taranto, A. G., de Magalhães, J. C., dos Santos, L. L., & Ferreira, J. M. S. (2018). Pharmacophoric characteristics of dengue virus NS2B/NS3pro inhibitors: a systematic review of the most promising compounds. *Archives of Virology*, *163*(3), 575–586. <https://doi.org/10.1007/S00705-017-3641-5/FIGURES/5>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2008.07.001>
- Li, J., Fu, A., & Zhang, L. (2019). An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular Docking. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences 2019 11:2*, *11*(2), 320–328. <https://doi.org/10.1007/S12539-019-00327-W>
- Li, L., Basavannacharya, C., Chan, K. W. K., Shang, L., Vasudevan, S. G., & Yin, Z. (2015). Structure-guided Discovery of a Novel Non-peptide Inhibitor of Dengue Virus NS2B–NS3 Protease. *Chemical Biology & Drug Design*, *86*(3), 255–264. <https://doi.org/10.1111/CBDD.12500>
- Libraty, D. H., Young, P. R., Pickering, D., Endy, T. P., Kalayanarooj, S., Green, S., Vaughn, D. W., Nisalak, A., Ennis, F. A., & Rothman, A. L. (2002). High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue Hemorrhagic Fever. *The Journal of Infectious Diseases*, *186*(8), 1165–1168.

<https://doi.org/10.1086/343813>

Lim, L., Dang, M., Roy, A., Kang, J., & Song, J. (2020a). Experimental and computational studies on molecular mechanism by which Curcumin allosterically inhibits Dengue protease. *BioRxiv*, 2020.09.20.305664.

<https://doi.org/10.1101/2020.09.20.305664>

Lim, L., Dang, M., Roy, A., Kang, J., & Song, J. (2020b). Curcumin Allosterically Inhibits the Dengue NS2B-NS3 Protease by Disrupting Its Active Conformation. *ACS Omega*, 5(40), 25677–25686.

https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.0C00039/SUPPL_FILE/AO0C00039_SI_001.PDF

Lima, M. C. P., & Seabra, G. M. (2016). Reaction mechanism of the dengue virus serine protease: a QM/MM study. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18(44), 30288–30296. <https://doi.org/10.1039/C6CP03209E>

Lin, K.-H., Ali, A., Rusere, L., Soumana, D. I., Kurt Yilmaz, N., Schiffer, C. A., Yilmaz, N. K., & Schiffer, C. A. (2017). Dengue Virus NS2B/NS3 Protease Inhibitors Exploiting the Prime Side. *Journal of Virology*, 91(10). [/pmc/articles/PMC5411607/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5411607/)

Lin, K. H., Nalivaika, E. A., Prachanronarong, K. L., Yilmaz, N. K., & Schiffer, C. A. (2016). Dengue Protease Substrate Recognition: Binding of the Prime Side. *ACS Infectious Diseases*, 2(10), 734–743.

https://doi.org/10.1021/ACSINFECDIS.6B00131/SUPPL_FILE/ID6B00131_S

I_001.PDF

Lu, C., Wu, C., Ghoreishi, D., Chen, W., Wang, L., Damm, W., Ross, G. A.,

Dahlgren, M. K., Russell, E., Von Bargen, C. D., Abel, R., Friesner, R. A., &

Harder, E. D. (2021). OPLS4: Improving force field accuracy on challenging

regimes of chemical space. *Journal of Chemical Theory and Computation*,

17(7), 4291–4300.

https://doi.org/10.1021/ACS.JCTC.1C00302/SUPPL_FILE/CT1C00302_SI_0

02.ZIP

Lyne, P. D., Lamb, M. L., & Saeh, J. C. (2006). Accurate prediction of the relative

potencies of members of a series of kinase inhibitors using molecular docking

and MM-GBSA scoring. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(16), 4805–4808.

https://doi.org/10.1021/JM060522A/SUPPL_FILE/JM060522ASI20060503_0

61009.PDF

Madhavi Sastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., & Sherman, W.

(2013). Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on

virtual screening enrichments. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*,

27(3), 221–234. <https://doi.org/10.1007/S10822-013-9644-8/TABLES/9>

Mendoza, N., & Silva, E. M. E. (2018). Introduction to Phytochemicals: Secondary

Metabolites from Plants with Active Principles for Pharmacological

Importance. *Phytochemicals - Source of Antioxidants and Role in Disease*

Prevention. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.78226>

Meneses, R., Ocazonez, R. E., Martínez, J. R., & Stashenko, E. E. (2009).

Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication in vitro. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-8-8/FIGURES/3>

Monticelli, L., & Tieleman, D. P. (2013). *Force Fields for Classical Molecular*

Dynamics. 197–213. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-017-5_8/COVER

Mullen, W., Edwards, C. A., Serafini, M., & Crozier, A. (2008). Bioavailability of

pelargonidin-3-O-glucoside and its metabolites in humans following the ingestion of strawberries with and without cream. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 713–719.

https://doi.org/10.1021/JF072000P/ASSET/IMAGES/LARGE/JF-2007-02000P_0004.JPEG

Mustafa, M. S., Rasotgi, V., Jain, S., & Gupta, V. (2015). Discovery of fifth

serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal, Armed Forces India*, 71(1), 67.

<https://doi.org/10.1016/J.MJAFI.2014.09.011>

Nemésio, H., & Villalaín, J. (2014). Membrane Interacting Regions of Dengue Virus

NS2A Protein. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 118(34), 10142.

<https://doi.org/10.1021/JP504911R>

Nitsche, C., S, H., T, S., & CD, K. (2014). Biochemistry and medicinal chemistry of

the dengue virus protease. *Chemical Reviews*, 114(22), 11348–11381.

<https://doi.org/10.1021/CR500233Q>

- Nivarthi, U. K., Swanstrom, J., Delacruz, M. J., Patel, B., Durbin, A. P., Whitehead, S. S., Kirkpatrick, B. D., Pierce, K. K., Diehl, S. A., Katzelnick, L., Baric, R. S., & de Silva, A. M. (2021). A tetravalent live attenuated dengue virus vaccine stimulates balanced immunity to multiple serotypes in humans. *Nature Communications* 2021 12:1, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21384-0>
- Noble, C. G., Seh, C. C., Chao, A. T., & Shi, P. Y. (2012). Ligand-Bound Structures of the Dengue Virus Protease Reveal the Active Conformation. *Journal of Virology*, 86(1), 438. <https://doi.org/10.1128/JVI.06225-11>
- Ocazonez, R. E., Meneses, R., Torres, F. Á., & Stashenko, E. (2010). Virucidal activity of Colombian Lippia essential oils on dengue virus replication in vitro. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(3), 304–309. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000300010>
- Oganización Panamericana de la Salud. (2023). *PAHO/WHO Data - Boletín Anual Arbovirosis 2022*. <https://www3.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue/boletin-anual-arbovirosis-2022.html>
- Okimoto, N., Futatsugi, N., Fuji, H., Suenaga, A., Morimoto, G., Yanai, R., Ohno, Y., Narumi, T., & Taiji, M. (2009). High-Performance Drug Discovery: Computational Screening by Combining Docking and Molecular Dynamics Simulations. *PLOS Computational Biology*, 5(10), e1000528.

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1000528>

Ou-Yang, S. S., Lu, J. Y., Kong, X. Q., Liang, Z. J., Luo, C., & Jiang, H. (2012).

Computational drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica* 2012 33:9, 33(9), 1131–1140. <https://doi.org/10.1038/aps.2012.109>

Páll, S., Abraham, M. J., Kutzner, C., Hess, B., & Lindahl, E. (2015). Tackling

exascale software challenges in molecular dynamics simulations with

GROMACS. *Lecture Notes in Computer Science (Including Subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, 8759, 3–27. https://doi.org/10.1007/978-3-319-15976-8_1/FIGURES/7

Paranavitane, S. A., Gomes, L., Kamaladasa, A., Adikari, T. N., Wickramasinghe,

N., Jeewandara, C., Shyamali, N. L. A., Ogg, G. S., & Malavige, G. N. (2014). Dengue NS1 antigen as a marker of severe clinical disease. *BMC Infectious Diseases*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/S12879-014-0570-8>

Phoo, W. W., El Sahili, A., Zhang, Z. Z., Chen, M. W., Liew, C. W., Lescar, J.,

Vasudevan, S. G., & Luo, D. (2020). Crystal structures of full length DENV4 NS2B-NS3 reveal the dynamic interaction between NS2B and NS3. *Antiviral Research*, 182, 104900. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2020.104900>

Płaszczycza, A., Scaturro, P., Neufeldt, C. J., Cortese, M., Cerikan, B., Ferla, S.,

Brancale, A., Pichlmair, A., & Bartenschlager, R. (2019). A novel interaction between dengue virus nonstructural protein 1 and the NS4A-2K-4B precursor is required for viral RNA replication but not for formation of the membranous

replication organelle. *PLOS Pathogens*, 15(5), e1007736.

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1007736>

Rodenhuis-Zybert, I. A., Wilschut, J., & Smit, J. M. (2010). Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2010 67:16, 67(16), 2773–2786. <https://doi.org/10.1007/S00018-010-0357-Z>

Sahili, A. El, & Lescar, J. (2017). Dengue Virus Non-Structural Protein 5. *Viruses*, 9(4), 1–20. <https://doi.org/10.3390/V9040091>

Saikia, S., & Bordoloi, M. (2018). Molecular Docking: Challenges, Advances and its Use in Drug Discovery Perspective. *Current Drug Targets*, 20(5), 501–521. <https://doi.org/10.2174/1389450119666181022153016>

Santos, L. H. S., Ferreira, R. S., & Caffarena, E. R. (2019). Integrating molecular docking and molecular dynamics simulations. *Methods in Molecular Biology*, 2053, 13–34. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9752-7_2/COVER

Saqallah, F. G., Abbas, M. A., & Wahab, H. A. (2022). Recent advances in natural products as potential inhibitors of dengue virus with a special emphasis on NS2b/NS3 protease. *Phytochemistry*, 202, 113362. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2022.113362>

Sarto, C., Kaufman, S. B., Estrin, D. A., & Arrar, M. (2020). Nucleotide-dependent dynamics of the Dengue NS3 helicase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1868(8), 140441.

<https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2020.140441>

Schaduangrat, N., Lampa, S., Simeon, S., Gleeson, M. P., Spjuth, O., & Nantasenamat, C. (2020). Towards reproducible computational drug discovery. *Journal of Cheminformatics* 2020 12:1, 12(1), 1–30.
<https://doi.org/10.1186/S13321-020-0408-X>

Schrödinger. (2021). *QikProp* (No. 4).

Song, J., Tan, H., Boyd, S. E., Shen, H., Mahmood, K., Webb, G. I., Akutsu, T., Whisstock, J. C., & Pike, R. N. (2011). BIOINFORMATIC APPROACHES FOR PREDICTING SUBSTRATES OF PROTEASES.
<https://doi.org/10.1142/S0219720011005288>, 9(1), 149–178.
<https://doi.org/10.1142/S0219720011005288>

Songprakhon, P., Thaingtamtanha, T., Limjindaporn, T., Puttikhunt, C., Srisawat, C., Luangaram, P., Dechtawewat, T., Uthaipibull, C., Thongsima, S., Yenchitsomanus, P. thai, Malasit, P., & Noisakran, S. (2020). Peptides targeting dengue viral nonstructural protein 1 inhibit dengue virus production. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69515-9>

Stanzione, F., Giangreco, I., & Cole, J. C. (2021). Use of molecular docking computational tools in drug discovery. *Progress in Medicinal Chemistry*, 60, 273–343. <https://doi.org/10.1016/BS.PMCH.2021.01.004>

Steuber, H., & Hilgenfeld, R. (2010). Recent Advances in Targeting Viral Proteases

for the Discovery of Novel Antivirals. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 10(3), 323–345. <https://doi.org/10.2174/156802610790725470>

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). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKX1127>

Timiri, A. K., Sinha, B. N., & Jayaprakash, V. (2016). Progress and prospects on DENV protease inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 117, 125–143. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2016.04.008>

Tran, B. L., Tseng, W. C., Chen, C. C., & Liao, S. Y. (2020). Estimating the Threshold Effects of Climate on Dengue: A Case Study of Taiwan. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(4). <https://doi.org/10.3390/IJERPH17041392>

Tuckerman, M. E., & Martyna, G. J. (2000). Understanding Modern Molecular Dynamics: Techniques and Applications. *Journal of Physical Chemistry B*, 104(2), 159–178. <https://doi.org/10.1021/JP992433Y/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JP992433YE00103.GIF>

Van Den Elsen, K., Quek, J. P., & Luo, D. (2021). Molecular Insights into the Flavivirus Replication Complex. *Viruses*, 13(6), 956.

<https://doi.org/10.3390/v13060956>

Veerasamy, R. (2022). QSAR—An Important In-Silico Tool in Drug Design and Discovery. *Lecture Notes in Mechanical Engineering*, 191–208.

https://doi.org/10.1007/978-981-16-7857-8_16/COVER

Velandia, M. L., & Castellanos, J. E. (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*, 15(1), 33–43.

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922011000100006&lng=en&nrm=iso&tlng=es

Velu, G., Palanichamy, V., & Rajan, A. P. (2018). Phytochemical and Pharmacological Importance of Plant Secondary Metabolites in Modern Medicine. *Bioorganic Phase in Natural Food: An Overview*, 135–156.

https://doi.org/10.1007/978-3-319-74210-6_8

Wang, E., Liu, H., Wang, J., Weng, G., Sun, H., Wang, Z., Kang, Y., & Hou, T.

(2020). Development and evaluation of MM/GBSA based on a variable dielectric GB model for predicting protein-ligand binding affinities. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(11), 5353–5365.

https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.0C00024/ASSET/IMAGES/LARGE/CI0C00024_0005.JPEG

Wang, E., Sun, H., Wang, J., Wang, Z., Liu, H., Zhang, J. Z. H., & Hou, T. (2019).

End-Point Binding Free Energy Calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: Strategies and Applications in Drug Design. *Chemical Reviews*, 119(16),

9478–9508.

https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.9B00055/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CR-2019-000558_M019.GIF

Wang, W. H., Urbina, A. N., Chang, M. R., Assavalapsakul, W., Lu, P. L., Chen, Y.

H., & Wang, S. F. (2020). Dengue hemorrhagic fever – A systemic literature review of current perspectives on pathogenesis, prevention and control.

Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 53(6), 963–978.

<https://doi.org/10.1016/J.JMIL.2020.03.007>

Wang, X., Ramírez-Hinestrosa, S., Dobnikar, J., & Frenkel, D. (2020). The

Lennard-Jones potential: when (not) to use it. *Physical Chemistry Chemical*

Physics, 22(19), 10624–10633. <https://doi.org/10.1039/C9CP05445F>

Wang, Y., Xie, X., & Shi, P. Y. (2022). Flavivirus NS4B protein: Structure,

function, and antiviral discovery. *Antiviral Research*, 207, 105423.

<https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2022.105423>

World Health Organization. (2022). *Dengue and severe dengue*. WHO Fact Sheet.

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>

Xie, X., Gayen, S., Kang, C., Yuan, Z., & Shi, P.-Y. (2013). Membrane Topology

and Function of Dengue Virus NS2A Protein. *Journal of Virology*, 87(8),

4609. <https://doi.org/10.1128/JVI.02424-12>

Xie, X., Zou, J., Zhang, X., Zhou, Y., Routh, A. L., Kang, C., Popov, V. L., Chen,

X., Wang, Q. Y., Dong, H., & Shi, P. Y. (2019). Dengue NS2A Protein

Orchestrates Virus Assembly. *Cell Host & Microbe*, 26(5), 606-622.e8.

<https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2019.09.015>

Xu, Y., Li, Y., Xie, J., Xie, L., Mo, J., & Chen, W. (2021). Bioavailability, Absorption, and Metabolism of Pelargonidin-Based Anthocyanins Using Sprague–Dawley Rats and Caco-2 Cell Monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(28), 7841–7850.

<https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.1C00257>

Yotmanee, P., Rungrotmongkol, T., Wichapong, K., Choi, S. B., Wahab, H. A., Kungwan, N., & Hannongbua, S. (2015). Binding specificity of polypeptide substrates in NS2B/NS3pro serine protease of dengue virus type 2: A molecular dynamics Study. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 60, 24–33. <https://doi.org/10.1016/J.JMGM.2015.05.008>

Behnam, M. A. M., & Klein, C. D. P. (2020). Conformational selection in the flaviviral NS2B-NS3 protease. *Biochimie*, 174, 117–125.

<https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2020.04.014>

Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., Drake, J. M., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., Sankoh, O., Myers, M. F., George, D. B., Jaenisch, T., Wint, G. R. W., Simmons, C. P., Scott, T. W., Farrar, J. J., & Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504. <https://doi.org/10.1038/NATURE12060>

C, N., S, H., T, S., & CD, K. (2014). Biochemistry and medicinal

chemistry of the dengue virus protease. *Chemical Reviews*, 114(22), 11348–11381. <https://doi.org/10.1021/CR500233Q>

Chen, H.-R., Lai, Y.-C., & Yeh, T.-M. (2018). Dengue virus non-structural protein 1: a pathogenic factor, therapeutic target, and vaccine candidate. *Journal of Biomedical Science* 2018 25:1, 25(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12929-018-0462-0>

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. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUU004>

Fakhar, Z., Faramarzi, B., Pacifico, S., & Faramarzi, S. (2021). Anthocyanin derivatives as potent inhibitors of SARS-CoV-2 main protease: An in-silico perspective of therapeutic targets against COVID-19 pandemic. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 39(16), 6171–6183. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1801510>

Fischl, W., & Bartenschlager, R. (2011). *Exploitation of cellular pathways by Dengue virus*. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.07.012>

Gorlenko, C. L., Kiselev, H. Y., Budanova, E. V., Zamyatnin, A. A., Jr., & Ikryannikova, L. N. (2020). Plant Secondary Metabolites in the Battle of Drugs and Drug-Resistant Bacteria: New Heroes or Worse Clones of Antibiotics? *Antibiotics*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9040170>

Guardia, C. D. La, & Lleonart, R. (2014). Progress in the Identification of Dengue Virus Entry/Fusion Inhibitors. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/825039>

Gubler, D. J. (2011). Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. *Tropical Medicine and Health*, 39(4SUPPLEMENT), S3–S11. <https://doi.org/10.2149/TMH.2011-S05>

Higuera, A., & Ramírez, J. D. (2019). Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: An update. *Acta Tropica*, 190, 99–111. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2018.11.010>

Kaptein, S. J. F., Goethals, O., Kiemel, D., Marchand, A., Kesteleyn, B., Bonfanti, J. F., Bardiot, D., Stoops, B., Jonckers, T. H. M., Dallmeier, K., Geluykens, P., Thys, K., Crabbe, M., Chatel-Chaix, L., Münster, M., Querat, G., Touret, F., de Lamballerie, X., Raboisson, P., ... Neyts, J. (2021). A pan-serotype dengue virus inhibitor targeting the NS3–NS4B interaction. *Nature* 2021 598:7881, 598(7881), 504–509. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03990-6>

Karamese, M., Aydogdu, S., Karamese, S. A., Altoparlak, U., & Gundogdu, C. (2015). Preventive effects of a major component of green tea, epigallocatechin-3-gallate, on hepatitis-B virus DNA replication. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 16(10), 4199–4202. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.10.4199>

Li, Y., Li, Q., Wong, Y. L., Liew, L. S. Y., & Kang, C. (2015).

Membrane topology of NS2B of dengue virus revealed by NMR spectroscopy.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1848(10), 2244–2252.

<https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2015.06.010>

Libraty, D. H., Young, P. R., Pickering, D., Endy, T. P., Kalayanarooj,

S., Green, S., Vaughn, D. W., Nisalak, A., Ennis, F. A., & Rothman, A. L.

(2002). High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein

NS1 Early in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue

Hemorrhagic Fever. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(8), 1165–1168.

<https://doi.org/10.1086/343813>

Lim, L., Dang, M., Roy, A., Kang, J., & Song, J. (2020a). Experimental

and computational studies on molecular mechanism by which Curcumin

allosterically inhibits Dengue protease. *BioRxiv*, 2020.09.20.305664.

<https://doi.org/10.1101/2020.09.20.305664>

Lim, L., Dang, M., Roy, A., Kang, J., & Song, J. (2020b). Curcumin

Allosterically Inhibits the Dengue NS2B-NS3 Protease by Disrupting Its

Active Conformation. *ACS Omega*, 5(40), 25677–25686.

https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.0C00039/SUPPL_FILE/AO0C00039_SI_001.PDF

Lim, S. P., Noble, C. G., Seh, C. C., Soh, T. S., El Sahili, A., Chan, G.

K. Y., Lescar, J., Arora, R., Benson, T., Nilar, S., Manjunatha, U., Wan, K. F.,

Dong, H., Xie, X., Shi, P. Y., & Yokokawa, F. (2016). Potent Allosteric

Dengue Virus NS5 Polymerase Inhibitors: Mechanism of Action and Resistance Profiling. *PLOS Pathogens*, 12(8), e1005737.

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1005737>

Lin, B. W., Gong, C. C., Song, H. F., & Cui, Y. Y. (2017). Effects of anthocyanins on the prevention and treatment of cancer. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1226. <https://doi.org/10.1111/BPH.13627>

Lin, K. H., Nalivaika, E. A., Prachanronarong, K. L., Yilmaz, N. K., & Schiffer, C. A. (2016). Dengue Protease Substrate Recognition: Binding of the Prime Side. *ACS Infectious Diseases*, 2(10), 734–743. https://doi.org/10.1021/ACSINFECDIS.6B00131/SUPPL_FILE/ID6B00131_SI_001.PDF

Martinez-Gutierrez, 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), e87412. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0087412>

Meneses, R., Ocazonez, R. E., Martínez, J. R., & Stashenko, E. E. (2009). Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication in vitro. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-8-8/FIGURES/3>

Messina, J. P., Brady, O. J., Golding, N., Kraemer, M. U. G., Wint, G. R. W., Ray, S. E., Pigott, D. M., Shearer, F. M., Johnson, K., Earl, L., Marczak, L. B., Shirude, S., Davis Weaver, N., Gilbert, M., Velayudhan, R., Jones, P., Jaenisch, T., Scott, T. W., Reiner, R. C., & Hay, S. I. (2019). The current and future global distribution and population at risk of dengue. *Nature Microbiology* 2019 4:9, 4(9), 1508–1515. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0476-8>

Mustafa, M. S., Rasotgi, V., Jain, S., & Gupta, V. (2015). Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal, Armed Forces India*, 71(1), 67. <https://doi.org/10.1016/J.MJAFI.2014.09.011>

Nemésio, H., & Villalaín, J. (2014). Membrane Interacting Regions of Dengue Virus NS2A Protein. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 118(34), 10142. <https://doi.org/10.1021/JP504911R>

Nguyen, N. M., Tran, C. N. B., Phung, L. K., Duong, K. T. H., Huynh, H. L. 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. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIS470>

Niyomrattanakit, P., Yahorava, S., Mutule, I., Mutulis, F., Petrovska, R., Prusis, P., Katzenmeier, G., & Wikberg, J. E. S. (2006). Probing the substrate specificity of the dengue virus type 2 NS3 serine protease by using internally quenched fluorescent peptides. *Biochemical Journal*, 397(Pt 1), 203. <https://doi.org/10.1042/BJ20051767>

Norazharuddin, H., & Lai, N. S. (2018). Roles and Prospects of Dengue Virus Non-structural Proteins as Antiviral Targets: An Easy Digest. *The Malaysian Journal of Medical Sciences : MJMS*, 25(5), 6. <https://doi.org/10.21315/MJMS2018.25.5.2>

Organización Mundial de la Salud. (2014). *Dengue and severe dengue*. WHO Fact Sheet. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>

Paranavitane, S. A., Gomes, L., Kamaladasa, A., Adikari, T. N., Wickramasinghe, N., Jeewandara, C., Shyamali, N. L. A., Ogg, G. S., & Malavige, G. N. (2014). Dengue NS1 antigen as a marker of severe clinical disease. *BMC Infectious Diseases*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/S12879-014-0570-8>

Pierson, T. C., & Diamond, M. S. (2020). The Continued Emerging Threat of Flaviviruses. *Nature Microbiology*, 5(6), 796. <https://doi.org/10.1038/S41564-020-0714-0>

Płaszczycza, A., Scaturro, P., Neufeldt, C. J., Cortese, M., Cerikan, B.,

Ferla, S., Brancale, A., Pichlmair, A., & Bartenschlager, R. (2019). A novel interaction between dengue virus nonstructural protein 1 and the NS4A-2K-4B precursor is required for viral RNA replication but not for formation of the membranous replication organelle. *PLOS Pathogens*, *15*(5), e1007736. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1007736>

Rodenhuis-Zybert, I. A., Wilschut, J., & Smit, J. M. (2010). Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and Molecular Life Sciences* *2010 67:16*, *67*(16), 2773–2786. <https://doi.org/10.1007/S00018-010-0357-Z>

Rosa, B. R., Cunha, A. J. L. A. Da, & Medronho, R. D. A. (2019). Efficacy, immunogenicity and safety of a recombinant tetravalent dengue vaccine (CYD-TDV) in children aged 2–17 years: systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*, *9*(3), 19368. <https://doi.org/10.1136/BMJOPEN-2017-019368>

Sahili, A. El, & Lescar, J. (2017). Dengue Virus Non-Structural Protein 5. *Viruses*, *9*(4), 1–20. <https://doi.org/10.3390/V9040091>

SJ, T., & IK, Y. (2019). A review of Dengvaxia®: development to deployment. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, *15*(10), 2295–2314. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1658503>

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. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKX1127>

T, K., M, S. M. S., A, K. T., V, G. M., & A, P. (2021). Ligand Accessibility Insights to the Dengue Virus NS3-NS2B Protease Assessed by Long-Timescale Molecular Dynamics Simulations. *ChemMedChem*, *16*(16), 2524–2534. <https://doi.org/10.1002/CMDC.202100246>

Takahashi, H., & Suzuki, Y. (2017). Cellular Control of Dengue Virus Replication: Role of Interferon-Inducible Genes. *Dengue - Immunopathology and Control Strategies*. <https://doi.org/10.5772/67984>

Thomas, S. J., & Yoon, I. K. (2019). A review of Dengvaxia®: development to deployment. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1658503>, *15*(10), 2295–2314. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1658503>

Tran, B. L., Tseng, W. C., Chen, C. C., & Liao, S. Y. (2020). Estimating the Threshold Effects of Climate on Dengue: A Case Study of Taiwan. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(4). <https://doi.org/10.3390/IJERPH17041392>

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).

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0000785>

Velandia, M. L., & Castellanos, J. E. (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*, 15(1), 33–43.

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922011000100006&lng=en&nrm=iso&tlng=es

Velu, G., Palanichamy, V., & Rajan, A. P. (2018). Phytochemical and Pharmacological Importance of Plant Secondary Metabolites in Modern Medicine. *Bioorganic Phase in Natural Food: An Overview*, 135–156.

https://doi.org/10.1007/978-3-319-74210-6_8

Wang, W. H., Urbina, A. N., Chang, M. R., Assavalapsakul, W., Lu, P. L., Chen, Y. H., & Wang, S. F. (2020). Dengue hemorrhagic fever – A systemic literature review of current perspectives on pathogenesis, prevention and control. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 53(6), 963–978. <https://doi.org/10.1016/J.JMII.2020.03.007>

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*, 62(4), 468–476. <https://doi.org/10.1093/CID/CIV949>

WHO. (n.d.). *Dengue and severe dengue*. Retrieved December 9, 2021, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>

Wilder-Smith, A., Ooi, E. E., Horstick, O., & Wills, B. (2019). Dengue. *Lancet (London, England)*, 393(10169), 350–363. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32560-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32560-1)

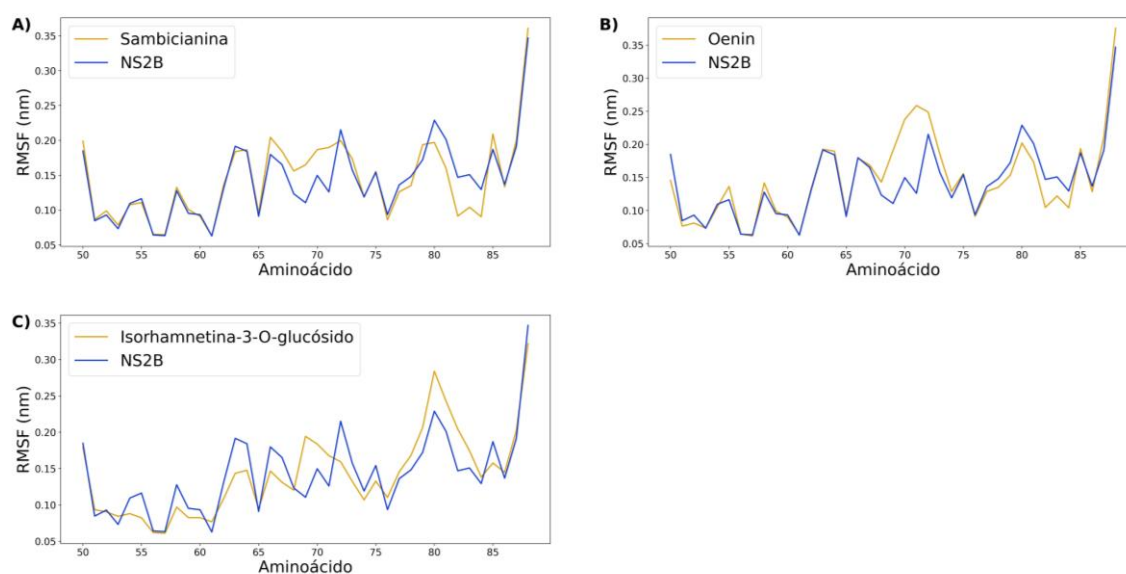
Xie, X., Gayen, S., Kang, C., Yuan, Z., & Shi, P.-Y. (2013). Membrane Topology and Function of Dengue Virus NS2A Protein. *Journal of Virology*, 87(8), 4609. <https://doi.org/10.1128/JVI.02424-12>

Xie, X., Zou, J., Zhang, X., Zhou, Y., Routh, A. L., Kang, C., Popov, V. L., Chen, X., Wang, Q. Y., Dong, H., & Shi, P. Y. (2019). Dengue NS2A Protein Orchestrates Virus Assembly. *Cell Host & Microbe*, 26(5), 606-622.e8. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2019.09.015>

RMSF de los residuos de la NS2B durante la simulación de DM

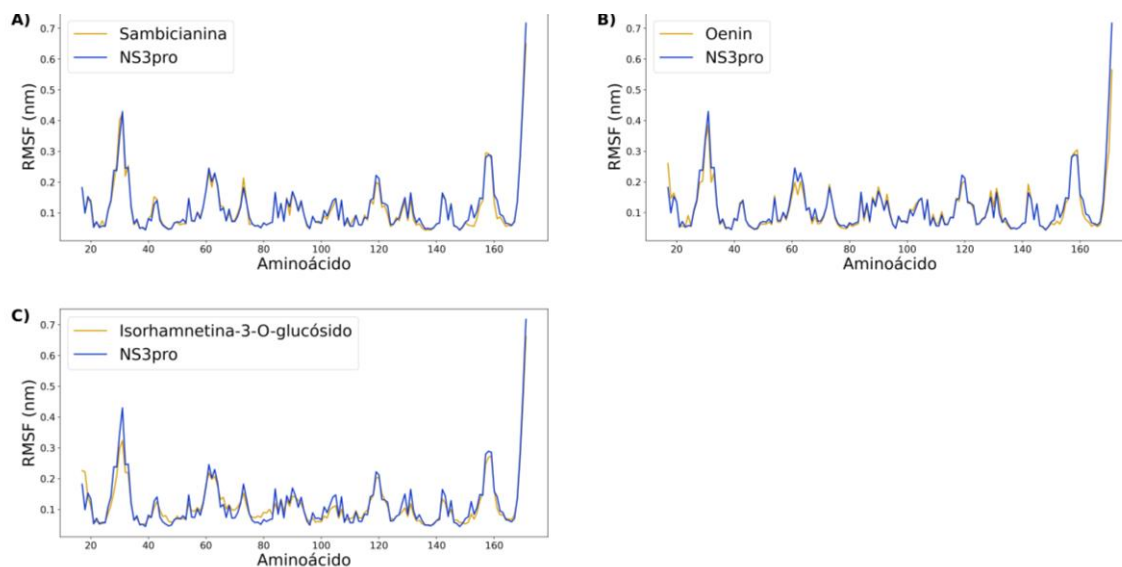
Apéndices

Apéndices A. *RMSF de los residuos de la NS2B durante la simulación de DM*



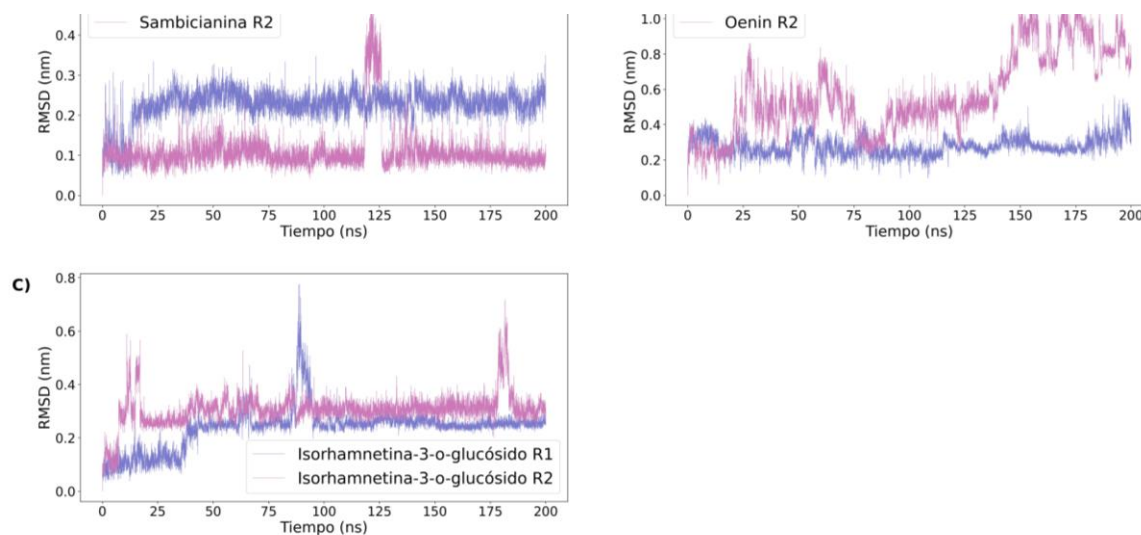
Nota. * *Se presentan los resultados del RMSF para la cadena NS2B del complejo proteico durante la simulación de 200 ns en presencia de los metabolitos Sambiciana (A), Oenin (B) y Isorhamnetina-3-o-glucósido (C) en color amarillo. En azul se representa los resultados del RMSF para la cadena NS2B para el complejo proteico sin metabolito (apoproteína).*

Apéndices B. RMSF de los residuos de la NS3pro durante la simulación de DM



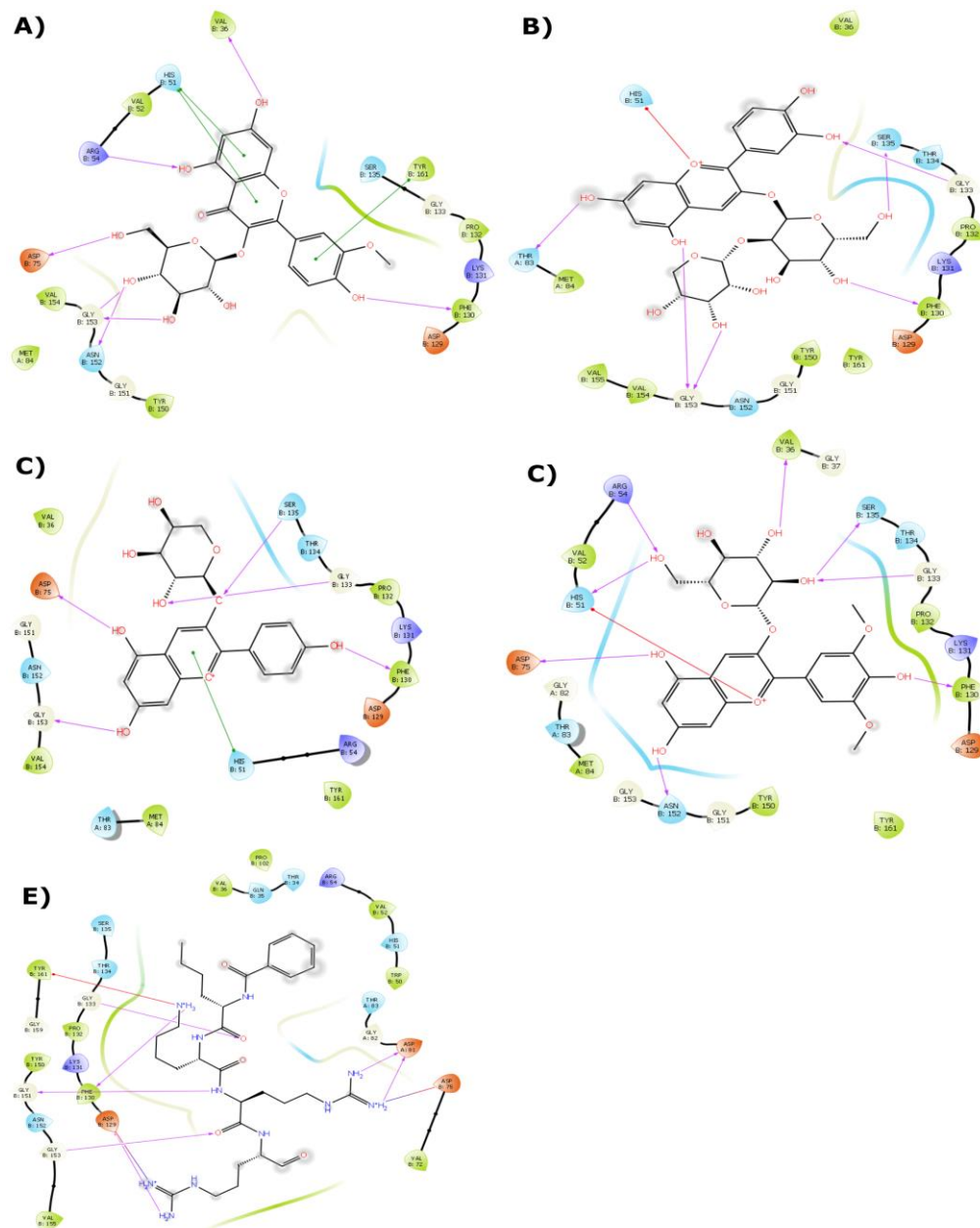
*Nota. * Se presentan los resultados del RMSF para la cadena NS3pro del complejo proteico durante la simulación de 200 ns en presencia de los metabolitos Sambiciana (A), Oenin (B) y Isorhamnetina-3-o-glucósido (C); en color amarillo. En azul se representa los resultados del RMSF para la cadena NS3pro para el complejo proteico sin metabolito (apoproteína).*

Apéndices C. *RMSD* obtenidos para los metabolitos durante la simulación de DM



Nota. * Se muestra los resultados del RMSD de la simulación de 200 ns para los metabolitos Sambicianina (A), Oenin (B) y Isorhamnetina-3-o-glucósido (C). en colores morado y rosado se presentan las réplicas 1 y 2.

Apéndices D. *Interacciones de los metabolitos con el complejo proteico predichas por el docking molecular*



Nota. *Los metabolitos están ordenados de A – E: A. Isorhamnetina-3-O-glucósido, B. Sambicianina, C. Pelargonidina 3-arabinósido, D. Oenin, E, inhibidor Bz-nKKR-H. Interacciones tipo puente de hidrógeno se representan en mediante flechas. Las interacciones tipo π - π mientras se representan mediante líneas verdes. Las interacciones hidrofóbicas se representan en las líneas de color verde y finalmente las interacciones polares en azul