

Trabajo Fin de Máster
Máster Universitario en Biotecnología y Bioingeniería
Curso 2023 - 2024
Universidad Miguel Hernández de Elche

**DESCUBRIMIENTO DE INHIBIDORES DEL
COMPLEJO ENZIMÁTICO NS2B-NS3 DEL VIRUS
DEL ZIKA MEDIANTE CRIBADO VIRTUAL
COMPUTACIONAL**

Realizado por: Érika Fernández Martínez

Tutora académica: Ana María Fernández Escamilla

Cotutor: Gregorio Joaquín Fernández Ballester

Cotutora: María Clara Blanes Mira

Elche, julio 2024

Declaración de tutor

Dra. ANA MARÍA FERNÁNDEZ ESCAMILLA, Investigadora del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE) y Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH).

CERTIFICA

Que el presente trabajo titulado:

“DESCUBRIMIENTO DE INHIBIDORES DEL COMPLEJO ENZIMÁTICO NS2B-NS3 DEL VIRUS DEL ZIKA MEDIANTE CRIBADO VIRTUAL COMPUTACIONAL”

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

ÉRIKA FERNÁNDEZ MARTÍNEZ

ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), cumpliendo todos los requisitos necesarios.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Elche a 20 de junio de 2024

Fdo.: Prof. Ana María Fernández Escamilla

Listado de abreviaturas

ATPasa	Adenosina trifosfatasa
ARNm	ARN mensajero
ARNss (+)	ARN monocatenario de polaridad positiva
DENV	Virus del Dengue
ESOL	Estimación de la Solubilidad Acuosa por Fragmento
GTPasa	Guanililtransferasa
IC50	Concentración inhibitoria media
MTasa	Metiltransferasa
NS	No estructurales (proteínas)
NS3pro	Actividad proteasa de NS3
p-ANAPL	<i>Pan-African Natural Products Library</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RCSB PDB	<i>Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank</i>
RE	Retículo endoplasmático
RTPasa	ARN trifosfatasa
Rdrp	ARN polimerasa dependiente de ARN
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
ZIKV	Virus del Zika

ÍNDICE

<i>Declaración de tutor</i>	<i>I</i>
<i>Listado de abreviaturas</i>	<i>II</i>
<i>Resumen</i>	<i>V</i>
<i>Abstract</i>	<i>VI</i>
<i>1. Introducción y antecedentes</i>	<i>1</i>
1.2. Genoma y estructura de los virus de la familia <i>Flaviviridae</i>	3
1.2.1. Proteínas estructurales.....	4
1.2.2. Proteínas no estructurales.....	6
1.3. Ciclo de vida de los Flavivirus	9
1.3.1. Mecanismo de fusión.....	9
1.3.2. Mecanismo de replicación.....	11
1.4. Descripción del complejo catalítico NS2B-NS3	13
<i>2. Objetivos</i>	<i>17</i>
2.1. Objetivo general	17
2.2. Objetivos específicos	17
<i>3. Materiales y métodos</i>	<i>18</i>
3.1. Método general de selección de compuestos.	18
3.2. Uso de bases de datos RCSB PDB	18
3.3. Uso de librerías de moléculas	19
3.3.1. Librería <i>Phenol Explorer</i>	20
3.3.2. Librería <i>AfroMalariaDB</i>	20
3.3.3. Librería <i>p-ANAPL (Pan-African Natural Products Library)</i>	20
3.4. Programas informáticos	21
3.4.1. Programa de acoplamiento molecular (<i>docking</i>) <i>YASARA</i>	21
3.4.2. Programa de edición molecular <i>PyMOL</i>	22
3.4.3. Selección y manejo de librerías con <i>Marvin</i>	22
3.4.4. Evaluación de toxicidad con el programa <i>DataWarrior</i>	23
3.4.5. Análisis de las propiedades moleculares con <i>SwissADME</i>	23
3.4.6. Análisis de interacciones con <i>PLIP (Protein-Ligand Interaction Profiler)</i>	23

3.5. Selección de ligandos	23
4. Resultados.....	26
4.1. Selección de estructuras y su justificación.....	26
4.2. Selección de librerías de moléculas y su justificación	27
4.3. Acoplamiento molecular (<i>docking</i>) con el programa YASARA-VINA	28
4.4. Análisis de resultados de compuestos.....	28
4.5. Selección de los mejores candidatos	31
4.7. Localización comercial de los candidatos	35
5. Discusión.....	37
6. Conclusiones.....	41
7. Proyección futura.....	42
8. Referencias bibliográficas	43
9. Anexos.....	48
Anexo 1.....	48
Anexo 2.....	49

Resumen

Los virus del Zika (ZIKV) y del Dengue (DENV) pertenecen al género *Flavivirus* y se transmiten a humanos principalmente, mediante la picadura de artrópodos del género *Aedes* (*Ae. egipcy* y *Ae. albopictus*). En el caso del Zika, este virus es causante de graves complicaciones en embarazadas y sus fetos, aumentando el número de casos notificados cada año. Sin embargo, no existen fármacos específicos para actuar frente a estas infecciones, por lo que la búsqueda de sustancias antivirales es de vital importancia. La estructura tridimensional de la mayoría de las proteínas que conforman este virus o intervienen en su replicación, han sido resueltas. El complejo catalítico NS2B-NS3 es una de las mejores dianas para la búsqueda mediante cribado virtual de compuestos que puedan actuar como inhibidores alostéricos de este complejo proteico, debido a su papel en el proceso de replicación. En este estudio se llevó a cabo el acoplamiento molecular del complejo con ligandos pertenecientes a tres librerías de compuestos, mediante el programa *YASARA-VINA*. Los resultados obtenidos se ordenaron según el valor de las energías de acoplamiento, usando adicionalmente diferentes parámetros ADME. El análisis y comparación de las interacciones ligando-complejo, así como el estudio de sus propiedades fisicoquímicas permitió la selección de cinco compuestos como posibles fármacos inhibidores del complejo. Los candidatos seleccionados serán evaluados en ensayos experimentales. Este estudio supone un paso hacia el descubrimiento de agentes antivirales efectivos para el desarrollo de posibles terapias contra los flavivirus.

Palabras clave: complejo catalítico, replicación viral, ZIKV, acoplamiento molecular, cribado virtual.

Abstract

Zika (ZIKV) and Dengue (DENV) viruses belong to the genus *Flavivirus* and are transmitted to humans primarily through the bites of arthropods of the *Aedes* genus (*Ae. egypti* and *Ae. albopictus*). In the case of Zika, this virus causes serious complications in pregnant women and their fetuses, with the number of reported cases increasing each year. However, there are no specific drugs to combat these infections, so the search for antiviral agents is of paramount importance. The three-dimensional structure of most of the proteins that make up this virus or are involved in its replication has been solved. The NS2B-NS3 catalytic complex is one of the best targets for virtual screening for compounds that can act as allosteric inhibitors of this protein complex, due to its role in the replication process. In this study, molecular docking of the complex with ligands belonging to three compound libraries was carried out using the YASARA-VINA software. The results obtained were ranked according to the value of the binding energies, additionally using different ADME parameters. The analysis and comparison of the ligand-complex interactions, as well as the study of their physicochemical properties, allowed the selection of five compounds as possible inhibitors of the complex. Selected candidates will be evaluated in experimental tests. This study represents a step towards the discovery of effective antiviral agents for the development of possible therapies against flaviviruses.

Key words: catalytic complex, viral replication, ZIKV, molecular docking, virtual screening.

1. Introducción y antecedentes

Los virus son agentes infecciosos submicroscópicos que requieren de células huésped vivas para replicarse y proliferar. Pueden estar compuestos por material genético, ya sea ADN o ARN, encapsulado en una cubierta proteica que los protege del entorno y a su vez les permite interactuar con él. Una vez dentro del huésped, los virus utilizan la maquinaria celular para replicar su genoma y producir nuevas partículas virales, lo que puede causar una variedad de enfermedades (*Virus*, s.f.).

El virus del Zika (ZIKV) pertenece a la familia *Flaviviridae*, la cual está compuesta por pequeños virus con envoltura, transmitidos por vectores hematófagos, que contienen un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva (ARNss (+)). Lo conforman más de 70 especies que comprenden una serie de patógenos capaces de infectar y causar enfermedades muy importantes, tanto en humanos como en animales, causando una significativa morbilidad y mortalidad en todo el mundo (Petersen et al., 2016). La familia *Flaviviridae* incluye a otros agentes patógenos importantes como el Dengue (DENV). El DENV y el ZIKV comparten características genómicas y estructurales, al igual que sintomatología clínica y su transmisión. Esto hace que sean frecuentemente comparados, acentuando la necesidad de estrategias terapéuticas comunes (Martínez et al., 2019).

El descubrimiento del ZIKV se remonta a 1947 en el bosque Zika de Uganda. Sin embargo, no fue hasta los brotes en las Américas, especialmente en Brasil en 2015-2016, que el ZIKV atrajo la atención mundial debido a sus graves implicaciones para la salud pública (Pergolizzi et al., 2021). El ZIKV es transmitido principalmente por mosquitos del género *Aedes*, en concreto *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (éste último comúnmente conocido como mosquito tigre), en zonas tropicales y subtropicales. En los últimos años, estas especies de mosquitos se han introducido en la Península Ibérica, aumentando el riesgo de transmisión de enfermedades como el Zika y el Dengue. De hecho, se ha informado sobre casos autóctonos de estas enfermedades en España (Giménez-Richarte et al., 2024). Este hecho subraya la importancia de desarrollar estrategias efectivas para el control y tratamiento de estas infecciones virales emergentes (Fernández Martínez et al., 2019).

La transmisión del ZIKV ocurre principalmente a través de la picadura de mosquitos infectados, pero también puede propagarse por vía sexual, transfusiones de sangre y de madre a feto durante el embarazo (figura 1) (Bhandari et al., 2023). La infección por ZIKV suele ser asintomática o causar síntomas leves como fiebre, erupción cutánea, conjuntivitis y dolores musculares y articulares (Cabrera Hernández et al., 2017). No obstante, en los últimos

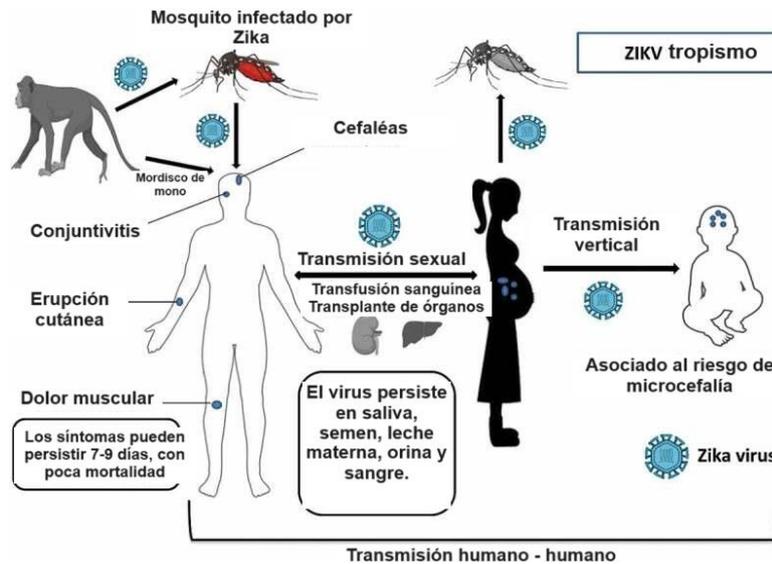


Figura 1. Esquema sobre el ciclo, sintomatología, y tropismo del virus del Zika. Adaptado de Mwaliko et al., 2020.

brotos de enfermedad por ZIKV, se han registrado complicaciones como el síndrome de Guillain-Barré (SGB), siendo éste una neuropatía periférica autoinmune, y el síndrome congénito del Zika, que incluye malformaciones cerebrales, defectos oftalmológicos y microcefalia en fetos (Ngono y Shresta, 2018).

Dado que no existen tratamientos específicos ni vacunas disponibles contra el ZIKV, el desarrollo de inhibidores eficaces es de vital importancia. La búsqueda de inhibidores puede realizarse a través de métodos experimentales tradicionales y, de manera cada vez más común, mediante cribado virtual computacional. Este último método permite la evaluación rápida y eficiente de grandes bibliotecas de compuestos, identificando potenciales candidatos que luego pueden ser validados experimentalmente (Mirza et al., 2022). Aunque también se ha explorado la búsqueda de péptidos con potencial inhibidor (Karwal et al., 2020), el cribado computacional ofrece ventajas significativas en términos de tiempo y coste, permitiendo una exploración más amplia de posibles inhibidores.

En este contexto, este estudio se centra en inhibir el complejo proteico NS2B-NS3 con actividad catalítica del virus del Zika. Este complejo es esencial para la replicación viral, actuando como una proteasa que procesa la poliproteína viral en sus componentes funcionales. La proteasa NS3, activada por el cofactor NS2B, es responsable del procesamiento proteolítico de la poliproteína viral, una etapa crucial para la maduración de las proteínas virales y para la replicación del virus. Por lo tanto, la inhibición de esta proteasa representa una estrategia efectiva para detener la replicación viral (Mirza et al., 2022).

Además, la estructura y función del complejo NS2B-NS3 son altamente conservadas entre los flavivirus, lo que sugiere que los inhibidores obtenidos podrían tener una eficacia amplia contra otros virus de esta familia (Collao et al., 2015).

El cribado virtual computacional emerge, como una herramienta poderosa en la identificación de inhibidores potenciales de NS2B-NS3. Este enfoque permite el análisis de grandes bases de datos de compuestos en un tiempo relativamente corto y con menor costo en comparación con los métodos experimentales tradicionales. Posteriormente, los compuestos identificados pueden ser obtenidos o sintetizados y probados in vitro e in vivo, acelerando así el proceso de descubrimiento de fármacos y ofreciendo una prometedora vía para el desarrollo de terapias efectivas contra el ZIKV (Rehman et al., 2023).

Por tanto, la búsqueda de inhibidores del complejo catalítico NS2B-NS3 del virus del Zika mediante cribado virtual computacional no solo es crucial para el desarrollo de tratamientos específicos contra el ZIKV, sino que también representa un enfoque innovador y eficiente en la lucha contra las enfermedades causadas por flavivirus. Esta metodología, combinada con estudios experimentales posteriores, puede proporcionar soluciones terapéuticas efectivas y seguras en un tiempo optimizado, respondiendo a la urgente necesidad de intervenciones frente a estas infecciones virales emergentes (Shin et al., 2021).

1.2. Genoma y estructura de los virus de la familia *Flaviviridae*

La familia *Flaviviridae* está compuesta por pequeños virus con envoltura, de forma icosaédrica, que contienen un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva (ARNss (+)). El genoma viral de la familia *Flaviviridae* se traduce en una poliproteína que es procesada por las proteasas (tanto celulares como propias) y produce 10 proteínas (figura 2). Concretamente, el genoma del ZIKV y DENV es muy similar y da lugar a 7 proteínas no estructurales (NS) cuya función es la replicación del genoma; y a 3 proteínas estructurales que forman la estructura del virión (Brinton & Basu, 2015).

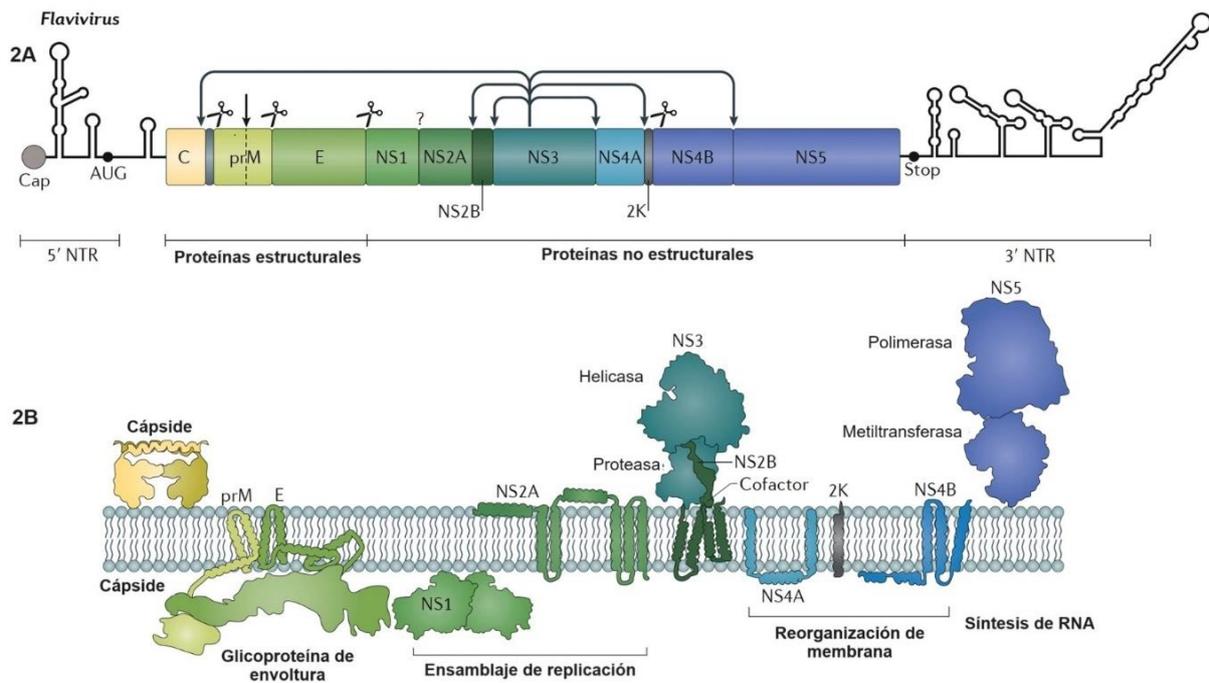


Figura 2. (A) Esquema del genoma de flavivirus, composición de la poliproteína. Se destacan las proteínas estructurales y no estructurales, así como sus extremos 5' NTR y 3' NTR. (B) Topología de membrana de las proteínas virales maduras. Adaptado de Neufeldt et al., 2018.

1.2.1. Proteínas estructurales

El grupo de las proteínas estructurales conforman la envoltura del virus y está formado por tres proteínas: la proteína E (envoltura), la proteína prM/M (premembrana/membrana) y la proteína C (cápside).

La proteína E es una glicoproteína de fusión de clase II. Localizada sobre la superficie viral, participa en la unión del virus a la membrana celular permitiendo su unión y posterior introducción del virus en la célula a través de una vía mediada por endosomas. La proteína E (figura 3) está compuesta por un dominio de anclaje transmembrana C-terminal (representado por cilindros en la figura 3) y un ectodominio compuesto por:

1. Dominio I (D-I): posee estructura de barril β , y actúa como puente entre los dos dominios siguientes (representado en color rojo en la figura 3).
2. Dominio II (D-II): formado por una estructura central estable y dos lazos expandidos. El asa distal posee un bucle de fusión rico en glicina, y su función es insertarse en la membrana endosomal. La fusión tiene lugar en la superficie proporcionada por D-II (en color amarillo en la figura 3).

3. Dominio III (D-III): Se encuentra en el extremo C-terminal. Su estructura similar a la de inmunoglobulina, y posee epítomos que neutralizan los anticuerpos eficazmente (en color azul en la figura 3) (Lin et al.,2018).

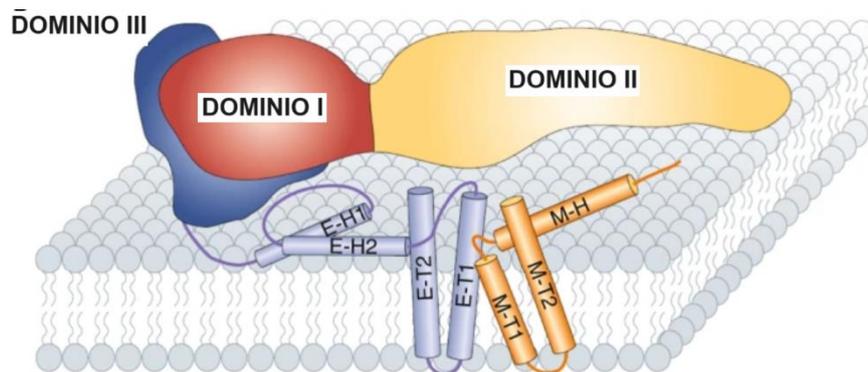


Figura 3. Representación esquemática de la proteína E del Zika virus. En rojo se representa el Dominio I, en amarillo el Dominio II, y en azul el Dominio III. Adaptado de Mwaliko et al. 2020.

Esta proteína presenta diferentes conformaciones estructurales durante la infección. Antes de fusionarse con la membrana celular adopta una conformación dimérica, y tras unirse a ella, adopta una conformación trimérica. Esta transición ocurre gracias al medio ácido que contiene el endosoma de la célula huésped. El D-I tiene un papel fundamental, ya que forma una bisagra junto a DII, exponiendo así el bucle de fusión de DII. Además, el D-I junto a D-III conforman una bisagra rígida a pH neutro (Nasar et al., 2020).

La proteína prM/M está compuesta por un predominio seguido del dominio M, una región troncal (rica en hélice- α e interactúa con la membrana lipídica del virus) y dos hélices transmembrana flexibles. El predominio está formado por siete hebras β antiparalelas estabilizadas por puentes disulfuro, las cuales cubren el bucle de fusión de la proteína E, evitando así la fusión del virus inmaduro con la célula huésped. Se cree que la prM es una chaperona encargada de promover y asegurar el plegamiento y ensamblaje de la proteína E (Velandia y Castellanos, 2011).

El predominio se encuentra glicosilado en la posición 69 (Asn) como función preventiva de la fusión viral inmadura. La proteína prM sufre una escisión mediada por furina en el aparato de Golgi, obteniendo como resultado pr y la proteína M. Este proceso es importante para la maduración viral y la infectividad, ya que la fusión de la proteína E con la membrana del huésped depende de que la escisión de prM ocurra de forma correcta. A pH neutro prM-E forma 60 picos triméricos (virus en estado inmaduro), dando al virus una conformación icosaédrica puntiaguda. Al pasar a un entorno con un pH bajo, los picos triméricos se convierten en 90 dímeros de E, cambian su conformación a una forma de “espina de pescado”,

y 180 copias de la proteína M que dan lugar a un virus maduro de superficie lisa (Nasar et al., 2020).

En condiciones ácidas, la proteína E se expone en conformación dimérica exponiendo el sitio diana de la furina, y seguidamente prM sufre la escisión. El péptido pr resultante, se une al bucle de fusión de la proteína E conservando así su función protectora. El péptido se escinde ante un cambio de pH provocado tras la liberación del virus fuera de la célula. Además, los estados oligoméricos de la proteína E alteran el ángulo de la bisagra (DI y DIII de la proteína E), contribuyendo a la maduración del virus (Nasar et al., 2020).

La proteína de la cápsida o proteína C, presenta afinidad tanto por el genoma viral como por la membrana lipídica. Localizada en el citosol, es una proteína homodimérica y es la primera proteína que se traduce por el genoma viral. La proteína C es importante para formar la nucleocápsida en las primeras etapas del ensamblaje del virión. NS3 junto a NS2B (su cofactor) realizan el procesamiento proteolítico de la unión cápsida/ancla dando lugar a la proteína de la cápsida (Nasar et al., 2020). La proteína C puede encontrarse en conformación monomérica (contiene cuatro hélices- α) y en conformación dimérica, en la cual las hélices- α 4 y 2 de cada monómero interactúan entre sí, formando una región de 20 residuos hidrofóbica y muy conservada. Esta región hidrofóbica es la encargada de la unión de la proteína de la cápsida madura con la membrana del retículo endoplasmático (RE). La proteína C presenta una región N-terminal estructuralmente flexible cargada positivamente y es la responsable de unir gotas de lípidos. Además, actúa como chaperonina del ARN, participando en el empaquetamiento y plegamiento adecuado del ARN viral (Alzahrani et al., 2020).

1.2.2. Proteínas no estructurales

Las proteínas no estructurales (NS) se encargan de remodelar cooperativamente las membranas del RE para formar sitios de replicación y además son las encargadas de replicar el ARN viral. Este grupo de proteínas está formado por siete proteínas: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 (Leier et al., 2020).

La proteína NS1 es una glicoproteína multifuncional de la cual todavía no se conoce su función concreta. La maduración de NS1 se produce tras escindirse de la poliproteína viral, la escisión ocurre entre el extremo C-terminal de NS1 y el extremo N-terminal de NS2A, por la actividad proteolítica de NS2A. Se expresa en conformación monomérica soluble, y pasa a conformación dimérica en la luz del RE gracias a la N-glicosilación de NS1 en la posición N-130 y N-207 (altamente conservadas en flavivirus). Ante la presencia de manosa y glicanos, NS1 se une con lectina evitando así la respuesta inmune e, inhibiendo la neutralización del

virus a través de la vía de la lectina. Esta proteína tiene tres posibles destinos desde el aparato de Golgi: la implicación en la replicación del virus, dirigirse a la superficie celular y asociarse a la membrana o liberarse al espacio extracelular en conformación hexamérica. NS1 está compuesta por tres dominios: uno es de carácter hidrófilo, siendo el encargado de interactuar con las estructuras de la membrana, y otros dos dominios de naturaleza hidrófila (Nasar et al., 2020).

La NS2A es hidrófoba, cuyo papel abarca desde la replicación viral hasta la evasión inmune. Posee un tamaño de 22 KDa, y se escinde en sus dos extremos. En el extremo N-terminal de la proteína actúa la proteasa del huésped y en el extremo C-terminal actúan las proteasas virales, obteniendo como resultado NS2A madura. NS2A es una proteína transmembrana ubicada en el RE, su región N-terminal reside en la luz del RE, mientras los residuos de C-terminal se encuentran en el citoplasma. Los residuos N-terminales están involucrados en su papel citopatogénico, mientras que los residuos C-terminales están implicados en el ensamblaje y secreción viral. Se ha observado que tiene propiedades similares a vioporinas y se ha implicado en la supresión inmune, actuando en sinergia con otras proteínas virales (Nasar et al., 2020).

La proteína NS2B se caracteriza por ser hidrofóbica, poseer cuatro hélices transmembrana, y situarse sus dos extremos terminales en el citoplasma. NS2B actúa como cofactor de actividad proteolítica de NS3, gracias a un dominio hidrofílico conservado con actividad (se encuentra entre $\alpha 2$ y $\alpha 3$), y es capaz de mediar la escisión proteolítica. Cuando NS2B se une con NS3, se denomina NS2B-NS3 y actúa como serina proteasa. Recientemente, se ha descubierto que NS2B tiene un papel en la supresión inmune al estar implicado en la degradación de proteínas antivirales (Nasar et al., 2020).

La NS3 se caracteriza por su multifuncionalidad de ahí que sea una interesante diana terapéutica en la lucha contra los flavivirus. Puede actuar como serina proteasa, adenosina trifosfatasa (ATPasa), ARN trifosfatasa (RTPasa) y ARN helicasa. Es una proteína soluble y, además, una de las proteínas más conservadas en los flavivirus. La proteína NS3 funciona en asociación con su cofactor NS2B, formando el complejo NS2B-NS3, anteriormente mencionado. La región proteasa y la región helicasa de NS3 están separadas por una región enlazadora de 11 aminoácidos, aportando suficiente flexibilidad a la proteína para poder realizar sus actividades helicasa y proteasa. Las actividades ATPasa/RTPasa están localizadas en el dominio C-terminal de NS3 (Nasar et al., 2020).

NS4A es una proteína transmembrana situada en el RE y es esencial en la replicación viral. Se caracteriza por formar oligómeros transmembranales para obtener así una mayor

estabilidad. NS4A se obtiene gracias a la acción de las proteasas virales. Posee en su dominio I aminoácidos que participan en la formación del complejo NS4A/NS4B. Los residuos situados en el N-terminal son de carácter hidrofóbico, e interactúan con el lado citosólico de la membrana del RE, siendo capaces de unirse a membranas muy curvadas. Se cree que NS4A está implicada en la inducción de modificaciones en la membrana de la célula huésped. Otra de las funciones de NS4A junto a una proteína del huésped es la capacidad de inducir cambios conformacionales en los túbulos del RE, para así facilitar el ensamblaje de vesículas mediado por membranas (Nasar et al., 2020).

La NS4B, al igual que NS4A, es una proteína transmembrana e hidrofóbica. Tras la actuación de la proteasa para escindir NS4A, se obtiene como resultado 2K-NS4B. El fragmento 2K actúa como péptido señal, provocando la translocación NS4B a la luz del RE, donde el péptido 2K se escinde gracias a una proteasa del huésped. NS4B se encuentra en el RE de la célula infectada, a no ser que sea reclutada por NS4A para formar parte del complejo de replicación (Nasar et al., 2020). NS4B está formada por 11 hélices, de las cuales 5 son hélices transmembrana, involucradas principalmente en la reorganización de la membrana para facilitar la formación del complejo de replicación viral (Leier et al., 2020).

La proteína NS5 es la proteína de mayor tamaño, con un peso molecular de 103kDa. Se cree que NS3 y NS5 son las enzimas catalíticas clave del complejo de replicación, ya que están implicadas en la replicación del genoma viral y la protección de este. La región N-terminal de NS5 tiene un dominio metiltransferasa capaz de catalizar tres actividades: guaniltransferasa, guanina-N7-metiltransferasa y nucleósido-2'-O-metiltransferasa. Gracias a estas tres actividades de NS5 junto a la actividad RTPasa de NS3 se obtiene ARN viral protegido de las enzimas hidrolizantes y además se facilita la unión del ARN viral a los ribosomas de traducción. NS3 junto a NS5 se encuentran juntos formando un complejo donde NS5 estimula las actividades catalíticas de NS3. NS5 se puede localizar en el núcleo de la célula huésped, para así manipular la maquinaria de empalme del huésped, y poder madurar el ARNm. Además, NS5 es el encargado de bloquear la vía de señalización del interferón (Nasar et al., 2020).

En la siguiente tabla (tabla 1) se resume información clave sobre las 10 proteínas del virus del Zika, junto con una breve descripción de su función.

Tabla 1. Resumen de las proteínas de los flavivirus y sus funciones.

Tipo	Nombre	Función
Estructurales	C	Proteína de la cápside, interviene el ensamblaje de las partículas virales.
	prM/M	Proteínas de membrana, participan en la maduración viral.
	E	Proteína de envoltura, fusión del virus en membrana celular.
No estructurales	NS1	Secreción de proteínas, formación de viriones, etc. (Funcionamiento correcto desconocido).
	NS2A	Cofactor de proteasa NS3, implicada en la formación de viriones.
	NS2B	Cofactor de proteasa NS3, involucrado en replicación viral y en procesamiento de proteínas virales.
	NS3	Proteasa, ATPasa, RTPasa y helicasa, involucrada en replicación del genoma viral.
	NS4A	Proteína transmembrana, esencial en replicación viral y formación de complejos de replicación.
	NS4B	Proteína transmembrana, esencial en formación de complejos de replicación.
	NS5	Tapado del ARN viral (Mtasa) y síntesis del ARN viral (ARN polimerasa). Esencial en replicación viral.

1.3. Ciclo de vida de los Flavivirus

1.3.1. Mecanismo de fusión

El mecanismo de fusión de los flavivirus es llevado a cabo por la proteína E (siendo ésta una proteína de fusión de clase II). Las proteínas de fusión de clase II se caracterizan por interactuar con las dos membranas que se van a fusionar y realizar el plegamiento, termodinámicamente favorable, sobre sí mismas, permitiendo la fusión de las dos membranas, la viral y la de la célula huésped. La fusión de membranas se lleva a cabo en los pasos detallados en la figura 4 (Modis, 2013).

En primer lugar, se produce la unión de la proteína E con un receptor de la célula, produciendo la endocitosis del virus mediada por clatrina. La clatrina es una proteína estructural cuya función es recubrir a las vesículas, desempeñando un papel clave en el transporte intracelular. Esto lleva a la formación de una vesícula recubierta de clatrina y la internalización celular. Aunque la duración de la asociación del virus con la clatrina es limitada, esta ruta de entrada puede variar según el tipo celular y la cepa viral.

Tras esto, se produce una bajada de pH en el endosoma desencadenando el reordenamiento conformacional, dando lugar a la exposición del bucle de fusión situado en la punta del dominio II, que previamente se encontraba escondido. Este reordenamiento se produce al flexionarse entre si el dominio I y II de la proteína E, como si fuese una bisagra a 30 °, produciendo el acercamiento del bucle de fusión hacia la membrana de la célula huésped (Nasar et al., 2020). El alejamiento de la superficie viral del dominio II permite que la célula se encuentre en un estado menos empaquetado. Este reordenamiento expone el bucle de fusión y permite la formación de trímeros junto a otras proteínas E adyacentes.

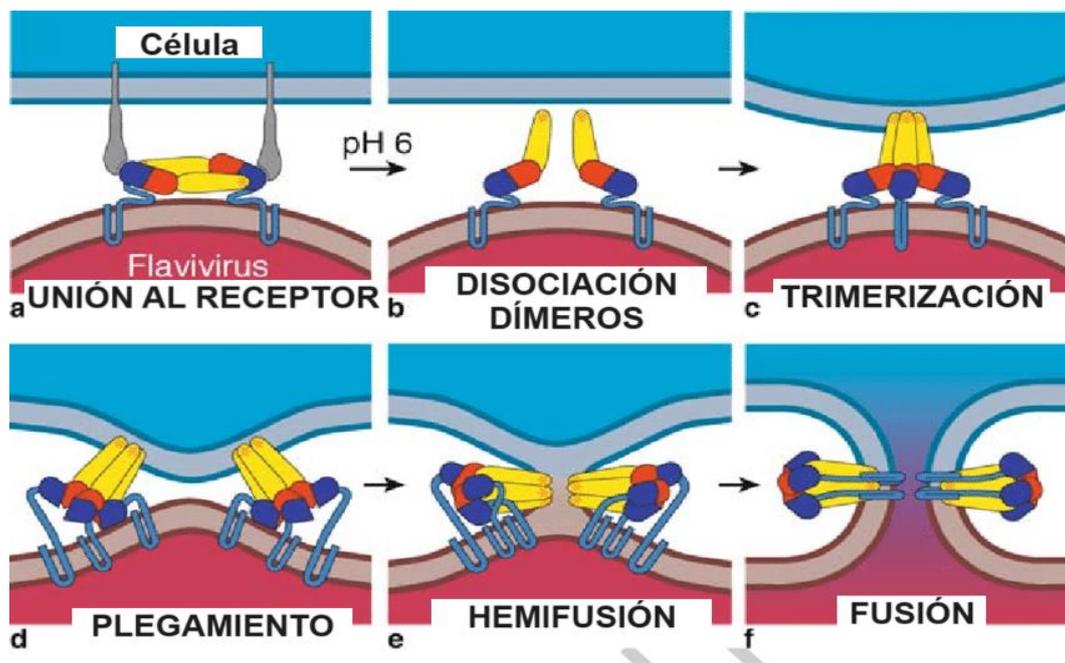


Figura 4. Esquema sobre el mecanismo de fusión de membranas de proteínas de clase II. (A) La proteína de fusión E se une al receptor. (B) El pH ácido en el endosoma hace que el dominio II gire, se exponga el bucle de fusión y reorganización de monómeros E. (C) Bucle de fusión se inserta en la membrana del huésped promoviendo la formación de trímeros. (D) La proteína pliega, dirige el bucle de fusión al anclaje C-terminal, y dobla las membranas. (E) Contactos de trímeros dan lugar a la hemifusión. (F) Fusión total y formación de poro lipídico. Adaptado de Modis, 2013.

Acto seguido, se produce la introducción del bucle de fusión en la membrana de la célula huésped. Una vez insertado el bucle de fusión, el dominio II gira y se desplaza doblándose hacia sí mismo, llevando el bucle de fusión hacia el extremo C-terminal de la proteína, replegándose. Este repliegue de la proteína entierra ciertas superficies proteicas y provoca que las membranas viral y celular se doblen una hacia la otra.

Este acercamiento de las membranas supera la resistencia natural de las membranas a la deformación, lo que resulta primero en la hemifusión de las membranas, donde las capas externas se fusionan mientras que las capas internas permanecen intactas. Finalmente, este

proceso culmina en la fusión completa de las membranas, formando un poro final que permite la liberación del contenido viral en el citosol de la célula huésped (Modis, 2013).

1.3.2. Mecanismo de replicación

El proceso de replicación de los *Flavivirus* consiste en una serie de etapas que dan comienzo cuando el virus se internaliza por endocitosis en la célula huésped y es expulsado de esta una vez queda infectada por exocitosis (figura 5).

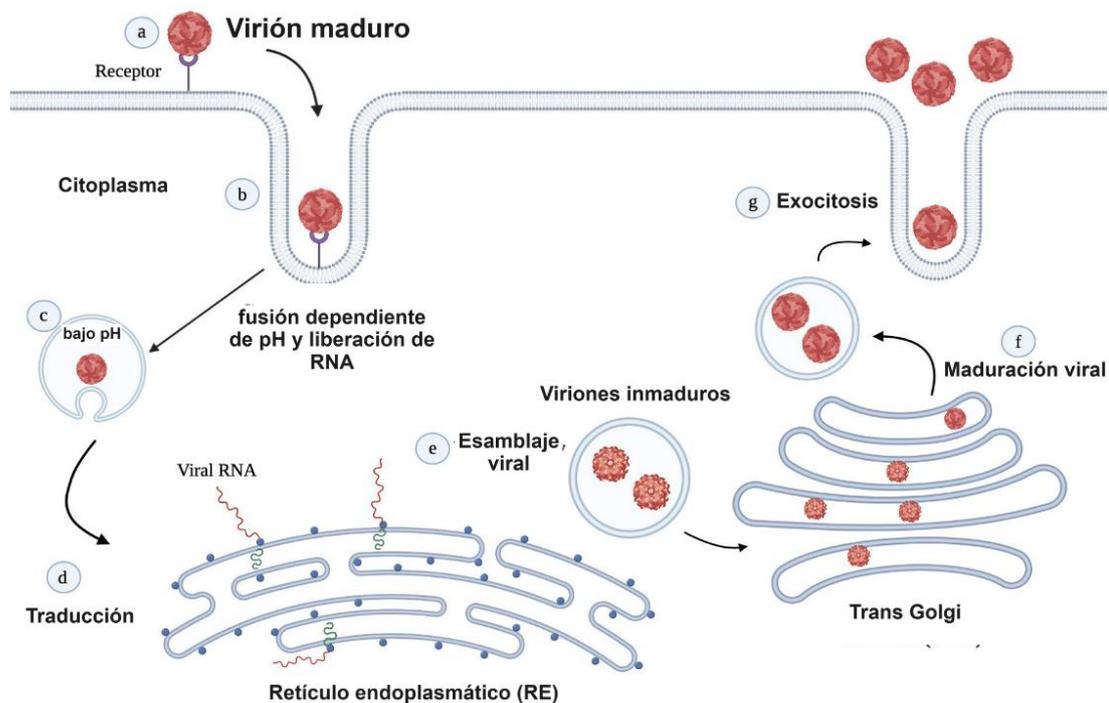


Figura 5. Ciclo de replicación de flavivirus. (a) El virus se une a la célula huésped. (b) Entrada en la célula huésped mediante endocitosis mediada por receptores o clatrina. (c) La fusión de membranas dependiente del pH en endosoma y produce la formación de poros que liberan genoma viral en el citoplasma del huésped. (d) El ARN viral liberado se traduce en una poliproteína. (e) El ensamblaje viral ocurre en el RE para formar viriones inmaduros. (f) Estos viajan por vía secretora y trans Golgi para formar viriones maduros. (g) Las partículas maduras se exocitan. Adaptado de Lee et al., 2023.

El primer paso consiste en la unión del virus a la superficie de la célula huésped (la más comunes son monocitos, células dendríticas de la piel, neuronas o macrófagos placentarios). Para ello, la proteína viral de envoltura (E) se une a factores de unión como los glicosaminoglicanos, seguidamente se produce la interacción con los receptores primarios como integrinas y receptores de lectina de tipo C (Neufeldt et al., 2018). Las partículas del flavivirus tras interactuar con los receptores de las células huésped penetran mayoritariamente por endocitosis dependiente de clatrina (Mercer et al., 2010; Agrelli et al., 2019).

En el endosoma se produce una bajada de pH provocando el cambio conformacional de la proteína E, uniéndose en trímeros y permitiendo así, la fusión de la membrana viral y la endosómica. Tras fusionarse las membranas se produce la liberación del ARN viral en el citosol (Harapan et al., 2020). El ARN viral liberado de sentido positivo (ARN (+)), es reconocido por los ribosomas de la célula huésped e inician la traducción en la membrana del RE produciendo una poliproteína. La poliproteína posteriormente se escinde en tres proteínas estructurales y siete proteínas no estructurales por la acción de las proteasas celulares y víricas. (Silva et al., 2020). Mientras las proteínas estructurales se encargan de construir el virión, las NS se encargan de realizar invaginaciones en la membrana del RE para amplificar el genoma ARN (Neufeldt et al., 2018).

El aumento de la concentración de proteínas virales en el RE desencadena la replicación viral. Las proteínas no estructurales virales guían la replicación en invaginaciones del RE (formando vesículas) (figura 6). En ellas se encuentran los componentes del complejo de replicación, el RNA y proteínas no estructurales virales. Estas vesículas están conectadas al citoplasma a través de un poro, permitiendo la entrada de factores necesarios para la replicación. Es aquí donde el genoma viral se replicará (Diosa-Toro et al., 2020).

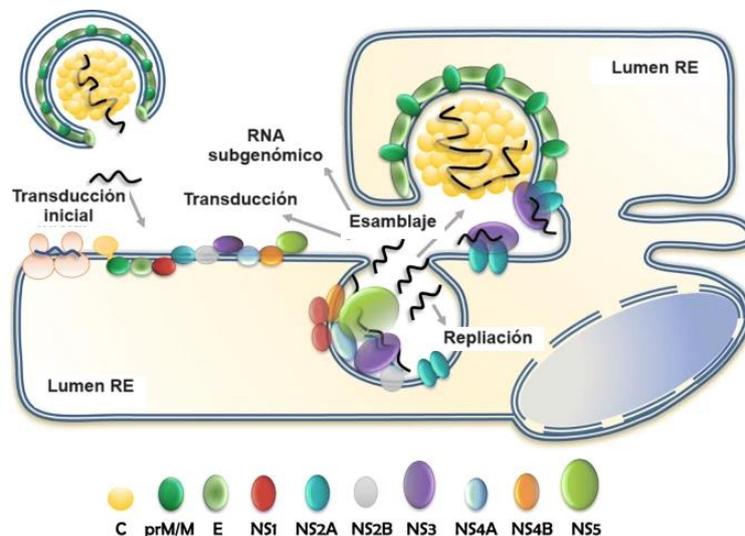


Figura 6. Proceso de transducción, complejo de replicación y ensamblaje de los flavivirus. Adaptado de Diosa-Toro et al., 2020.

El ARN viral de cadena positiva (ARNs(+)) actúa como una plantilla para la síntesis de nuevo ARN genómico. En primer lugar, se genera ARN de sentido negativo (obteniendo como resultado un intermedio de ARN de doble cadena). A partir de aquí, el ARN (-) será la plantilla para la amplificación de nuevos ARN de sentido positivo. Esta síntesis de ARN viral la lleva a cabo la proteína NS5, en concreto, la actividad de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). El extremo N-terminal de NS5, que contiene guanililtransferasa (GTPasa) y

metiltransferasa (MTasa), está implicado en la formación de una estructura de capucha tipo 1 en el extremo 5' del ARN viral (Morita & Suzuki, 2021).

Las copias de ARN (+) recién sintetizadas salen de las vesículas y son incorporadas a las partículas virales asociándose a la proteína C, y se comienzan a formar los viriones inmaduros por la gemación del RE (Neufeldt et al., 2018). Tras esto, los viriones inmaduros son transportados a través de la vía secretora (red Trans-Golgi). Durante el recorrido se produce la maduración de los viriones, que es dependiente de pH y de la furina. El proceso de maduración consiste en la escisión por proteasas de tipo furina del péptido pr de la proteína prM, obteniendo como resultado la proteína M madura, dando lugar a partículas víricas maduras e infectivas. Finalmente, los viriones infecciosos son liberados al medio extracelular por exocitosis (Hasan et al., 2018).

El proceso de formación del complejo de replicación implica la participación de diversos cofactores tanto virales como celulares. Algunas proteínas no estructurales transmembranales actúan como soporte para mantener el complejo de replicación en el RE, siendo NS2B un cofactor crucial para la actividad de la proteasa NS3, esencial en la replicación (Morita & Suzuki, 2021).

1.4. Descripción del complejo catalítico NS2B-NS3

Como se ha descrito en el apartado anterior, el complejo enzimático NS2B-NS3 del ZIKV, conocido como bZipro, es crucial para la replicación viral y está altamente conservado en el género *Flavivirus*. Lo conforma las proteínas no estructurales NS3 y NS2B. La proteína NS3, parte de este complejo, tiene funciones de serina proteasa, NTPasa y ARN helicasa, distribuidas en tres dominios: peptidasa (NS3pro), ATPasa (NTPase) y helicasa (NS3hel). La NS2B actúa como su cofactor (Shiryaev et al., 2017).

La importancia de seleccionar el complejo NS2B-NS3 para este estudio radica en su función crítica en la mediación de la escisión de la poliproteína viral, proceso necesario para la replicación y la infección viral. Interrumpir su función proteolítica impide el procesamiento adecuado de la poliproteína, bloqueando la replicación del virus, lo que subraya su relevancia como objetivo para el diseño de fármacos antivirales (Shiryaev et al., 2023).

La replicación del virus del Zika depende críticamente de la actividad de la proteasa NS3 (NS3pro), una enzima de 69 kDa que se activa solo cuando se asocia con su cofactor NS2B. NS2B es una pequeña proteína transmembrana de 14 kDa que, al unirse con NS3,

forma el complejo enzimático NS2B-NS3. Este complejo es capaz de reconocer su sustrato y realizar la catálisis necesaria para la maduración de las proteínas virales (Starvaggi et al., 2024).

NS3pro es una serina proteasa similar a la tripsina, situada en el dominio extremo N-terminal de NS3 (comprendiendo 180 residuos). Presenta una estructura compuesta por dos barriles β , cada uno formado por seis hebras β . Posee una tríada catalítica, compuesta por los aminoácidos His51, Asp75 y Ser135, la cual se encuentra completamente conservada en la familia *Flaviviridae*. La actividad de esta proteasa depende de su interacción con NS2B, que se asocia a la membrana del RE y posiciona NS3pro en su cara citoplásmica. NS2B contiene una región hidrofílica central de 47 residuos (NS2BH) que abarca los residuos 49-95 y forma una horquilla- β . Esta horquilla- β puede adoptar dos conformaciones distintas:

A) "Estructura cerrada", representa la conformación activa, donde NS2B interactúa íntimamente con NS3pro, formando parte del sitio de unión al sustrato (figura 7A).

B) "Estructura abierta", representa la conformación inactiva, donde NS2B no interactúa con NS3pro (figura 7B) (Starvaggi et al., 2024).

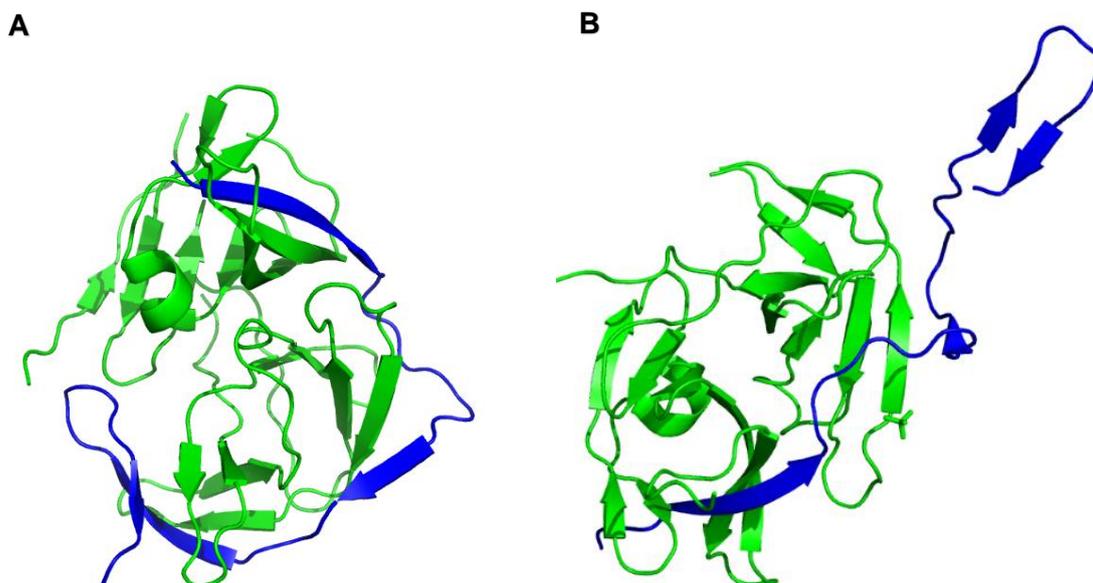


Figura 7. Estructura molecular del complejo NS2B-NS3; en color verde la proteasa NS3, y en color azul su cofactor NS2B. (A) Conformación cerrada y activa del complejo. (B) Conformación abierta e inactiva del complejo.

Existen diferentes tramos de interacción entre NS3 y NS2B en la estructura cerrada (figura 8). Estos varían en su grado de contacto e influencia sobre la actividad enzimática.

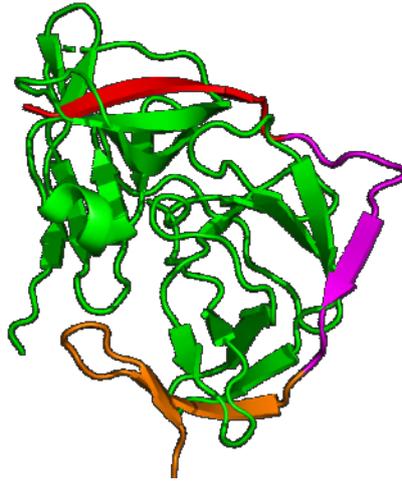


Figura 8. Estructura molecular del complejo NS2B-NS3. Las regiones de NS2B aparecen representadas en colores, dependiendo de su grado de interacción con NS3. En rojo la primera región; en magenta la segunda; y en naranja la tercera.

La primera región (representada en color rojo en la figura 8) es una hebra beta de NS2B: Esta región siempre permanece unida a NS3pro y representa la interacción mayor y más estable dentro del complejo. La segunda región (en color magenta) es un fragmento desordenado. Este tramo puede contener alguna hebra beta ocasional, dependiendo de la estructura que se consulte. Funciona como una bisagra entre la primera y la tercera región, permitiendo flexibilidad y facilitando los cambios conformacionales necesarios para la activación de la proteasa. Esta es la región de menor interacción directa con NS3pro. Por último, la tercera región 3 (en color naranja), tratándose de una horquilla beta. Este fragmento se une a NS3pro formando una horquilla beta, lo que contribuye a la conformación cerrada y activa de la proteasa. Esta interacción es significativa y esencial para la actividad catalítica del complejo. La capacidad de NS2B para alternar entre estas conformaciones influye en la actividad catalítica de NS3pro, haciendo del complejo NS2B-NS3 un objetivo particularmente interesante para la inhibición y el diseño de fármacos antivirales (Phoo et al., 2018).

La estructura cristalográfica de este complejo revela la existencia de dos sitios de unión a ligandos: un sitio de unión ortostérico (activo) y otro alostérico. El sitio ortostérico es la región proteica a la que se unen los agonistas endógenos para realizar su función y conforma lo que se conoce como sitio activo, mientras que el sitio alostérico se sitúa en un área diferente de la proteína desde donde puede modular el efecto de la sustancia endógena sobre el sitio ortostérico (Juárez, 2021).

Este estudio se centra en el sitio de unión alostérico del complejo enzimático como objetivo terapéutico, basándose en la capacidad de los sitios alostéricos para modular la

actividad enzimática de manera selectiva. A diferencia de los sitios activos cuya función puede ser compartida con otras enzimas, no pudiendo inhibir específicamente una enzima sin afectar a otras con actividad similar, como ocurre con el sitio ATPasa presente en muchas proteínas.

En ausencia de inhibidor unido, la parte C-terminal de la proteína se encuentra en una conformación abierta. Sin embargo, cuando un inhibidor se une a la proteasa, se forma un complejo más compacto en el cual la parte NS2B envuelve a la proteína NS3 y entra en contacto directo con el inhibidor (conformación cerrada) (Zhang et al., 2016).

En el contexto de la proteína NS2B-NS3 del virus del Zika, la búsqueda y desarrollo de un inhibidor alostérico podría ofrecer una vía prometedora para la creación de tratamientos efectivos, similar a los logros alcanzados con inhibidores alostéricos en infecciones causadas por el virus del Dengue (Yildiz et al., 2013).

En conclusión, la proteasa viral NS2B-NS3 no solo es esencial para la replicación del virus del Zika, sino que también representa una diana terapéutica potencial para la inhibición viral. La investigación y el desarrollo de inhibidores específicos para este complejo enzimático podrían llevar a avances significativos en el tratamiento de infecciones por ZIKV y otros flavivirus relacionados.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Encontrar agentes antivirales capaces de inhibir el complejo enzimático de NS2B-NS3 en el sitio alostérico a través de métodos puramente computacionales.

2.2. Objetivos específicos

1. Búsqueda de moléculas inhibidoras del sitio de unión alostérico del complejo NS2B-NS3 mediante acoplamiento molecular.
2. Optimización de la lista de moléculas obtenida en función de sus propiedades ADME.
3. Caracterización de las interacciones más importantes en la unión de los compuestos en el sitio alostérico del complejo NS2B-NS3.
4. Seleccionar los compuestos más prometedores para su posterior evaluación experimental *in vitro*.

3. Materiales y métodos

3.1. Método general de selección de compuestos.

A continuación, se muestra el diagrama de flujo en el que se presenta de manera concisa el proceso de selección de compuestos con potencial carácter inhibitorio sobre el complejo proteasa NS2B-NS3, desde la selección inicial de la estructura del complejo hasta la selección final de los mejores candidatos (figura 9).

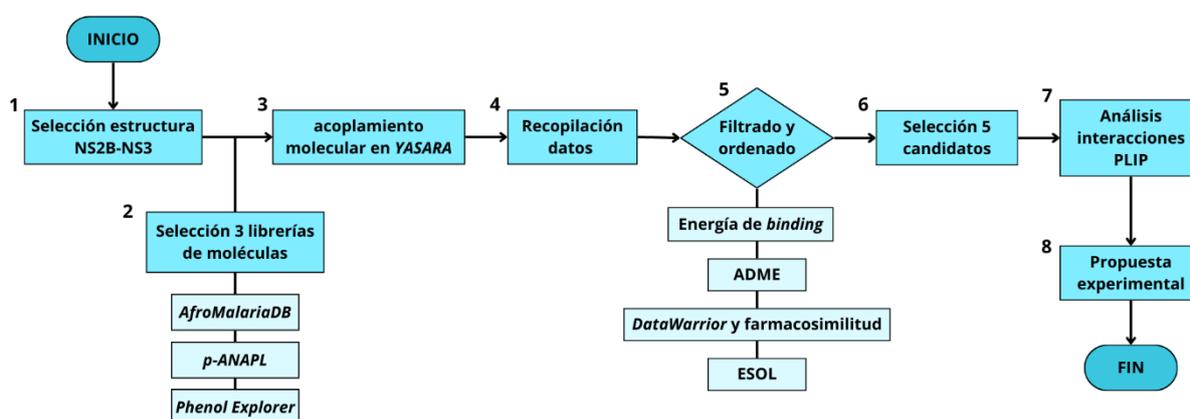


Figura 9. Método de selección de compuestos en diagrama de flujo. Las etapas del método incluyen (1) Elección de la estructura del complejo NS2B-NS3. (2) Selección de las tres librerías de compuestos. (3) Cribado virtual de las moléculas en YASARA. (4) Recolección de datos generados en el acoplamiento de cada librería. (5) Clasificación y disposición de las moléculas según los parámetros de estudio. (6) Elección de las mejores 5 moléculas candidatas. (7) Examinar la interacción entre las moléculas elegidas y el complejo utilizando PLIP. (8) Planteamiento experimental de ensayo en laboratorio.

3.2. Uso de bases de datos RCSB PDB

La base de datos RCSB PDB (“Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank”; <https://www.rcsb.org/>) fue empleada como fuente para adquirir los modelos cristalográficos del complejo proteico NS2B-NS3 del virus del Zika. Esta base de datos es reconocida por su amplitud y fiabilidad, con más de 200.000 registros.

Antes de determinar la estructura más adecuada para el análisis, se definieron una serie de criterios fundamentales para facilitar la selección del modelo cristalográfico óptimo (tabla 2). Uno de estos criterios es la resolución, dado que los modelos cristalográficos deben mantener una alta resolución ($< 3 \text{ \AA}$). Valores superiores podrían distorsionar significativamente la representación de la realidad, desviando el estudio de su objetivo primordial.

El método preferido para la selección de la estructura fue la cristalografía de rayos X, debido a su estabilidad, resolución adecuada y la fidelidad de las conformaciones obtenidas mediante este procedimiento. En términos de filogenia, se estableció que los complejos deben pertenecer a la familia *Flaviviridae*, específicamente al virus del Zika.

Los Factores R y R_{free} deben oscilar entre 0.15 y 0.30, ya que valores más elevados podrían indicar una resolución inadecuada, lo que conllevaría a errores en el acoplamiento molecular. Por último, se requiere que el bolsillo alostérico de unión en los modelos cristalográficos se encuentre en un estado desplegado, con la mayor apertura posible, para facilitar el acoplamiento de los ligandos en estudio.

Una vez evaluados estos criterios, se procedió a seleccionar los modelos cristalográficos, priorizando siempre la apertura del sitio alostérico de unión como el factor más relevante para la elección del modelo adecuado. En la siguiente tabla (tabla 2), se muestra un resumen de los requisitos que debe cumplir la estructura seleccionada.

Tabla 2. Tabla resumen con los requisitos que debe cumplir la estructura cristalográfica del complejo NS3-NS2B del virus del Zika.

Criterio	Descripción
Base de datos	RCSB PDB
Resolución	< 3 Å
Método de obtención	Cristalografía de rayos X
Familia	<i>Flaviviridae</i>
Virus específico	Virus del Zika
Factores R y R_{free}	Entre 0.15 y 0.30
Prioridad en la selección	Apertura del sitio alostérico de unión

3.3. Uso de librerías de moléculas

En este trabajo se emplearon tres librerías de compuestos para la identificación y selección de ligandos inhibidores potenciales del complejo proteasa NS2B-NS3. Estas librerías se eligieron por su reconocido contenido y relevancia en la investigación biomédica.

3.3.1. Librería *Phenol Explorer*

Phenol Explorer es una base de datos integral que contiene información detallada sobre el contenido de polifenoles en diversos alimentos. Posee un tamaño relativamente grande, con un total de 921 moléculas. En este contexto, esta base de datos se utiliza para identificar y analizar compuestos con potenciales propiedades antivirales derivados de la dieta humana. La información obtenida de *Phenol Explorer* es crucial para entender cómo los polifenoles pueden interactuar con el complejo proteico NS2B-NS3 del virus del Zika. Esta librería se destaca por su amplitud y precisión en la cuantificación de polifenoles, lo que permite una selección informada de compuestos para estudios posteriores. Más información en: <https://academic.oup.com/database/article/doi/10.1093/database/bap024/401207>.

3.3.2. Librería *AfroMalariaDB*

AfroMalariaDB (<https://orgmedchemlett.springeropen.com/articles/10.1186/s13588-014-0006-x>) es una librería que reúne estructuras tridimensionales de compuestos con actividades antiplasmodiales y antimaláricas, derivados de la flora africana. Posee un total de 248 moléculas. Esta base de datos se ha usado para identificar moléculas con estructuras y propiedades que podrían ser útiles en el desarrollo de inhibidores del virus del Zika. Los compuestos seleccionados fueron evaluados por su capacidad de interactuar con el sitio activo del complejo enzimático NS2B-NS3, aprovechando su potencial bioactivo demostrado contra otros patógenos.

3.3.3. Librería *p-ANAPL (Pan-African Natural Products Library)*

La librería *p-ANAPL* contiene una amplia colección de compuestos derivados de plantas medicinales africanas, incluyendo un total de 496 moléculas. Esta base de datos ha sido empleada para explorar la diversidad química de los productos naturales africanos y su posible aplicación en la inhibición del virus del Zika. *p-ANAPL* ofrece una rica fuente de compuestos bioactivos que han sido tradicionalmente utilizados en la medicina africana, proporcionando una base sólida para el descubrimiento de nuevas moléculas con actividad antiviral. Más información en:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0090655>

En conjunto, estas tres librerías de compuestos ofrecen una gama diversa y rica de moléculas para el análisis estructural y funcional del complejo enzimático NS2B-NS3 del virus del Zika, permitiendo un enfoque integral en la búsqueda de nuevos inhibidores efectivos.

3.4. Programas informáticos

3.4.1. Programa de acoplamiento molecular (*docking*) YASARA

En este trabajo, se empleó el software YASARA (*Yet Another Scientific Artificial Reality Application*) (<http://www.yasara.org/>) como una herramienta fundamental para llevar a cabo el acoplamiento proteína-ligando. Permite realizar funciones de visualización, modelado, dinámica molecular y acoplamiento, entre otros. El proceso se dividió en dos etapas principales: la preparación del receptor y los ligandos, y el acoplamiento propiamente dicho.

Dado el alto consumo de recursos computacionales, el proceso se ejecuta en el servidor remoto Osiris del laboratorio. Para la preparación del receptor y los ligandos, se creó un directorio de trabajo donde se organizaron los archivos necesarios. En él se incluyeron el archivo del receptor en formato de escena de YASARA, que contiene el receptor preparado con la caja de simulación (figura 10); la librería de compuestos en formato “sdf”, que contiene todos los ligandos a evaluar; y el archivo comandos correspondiente.

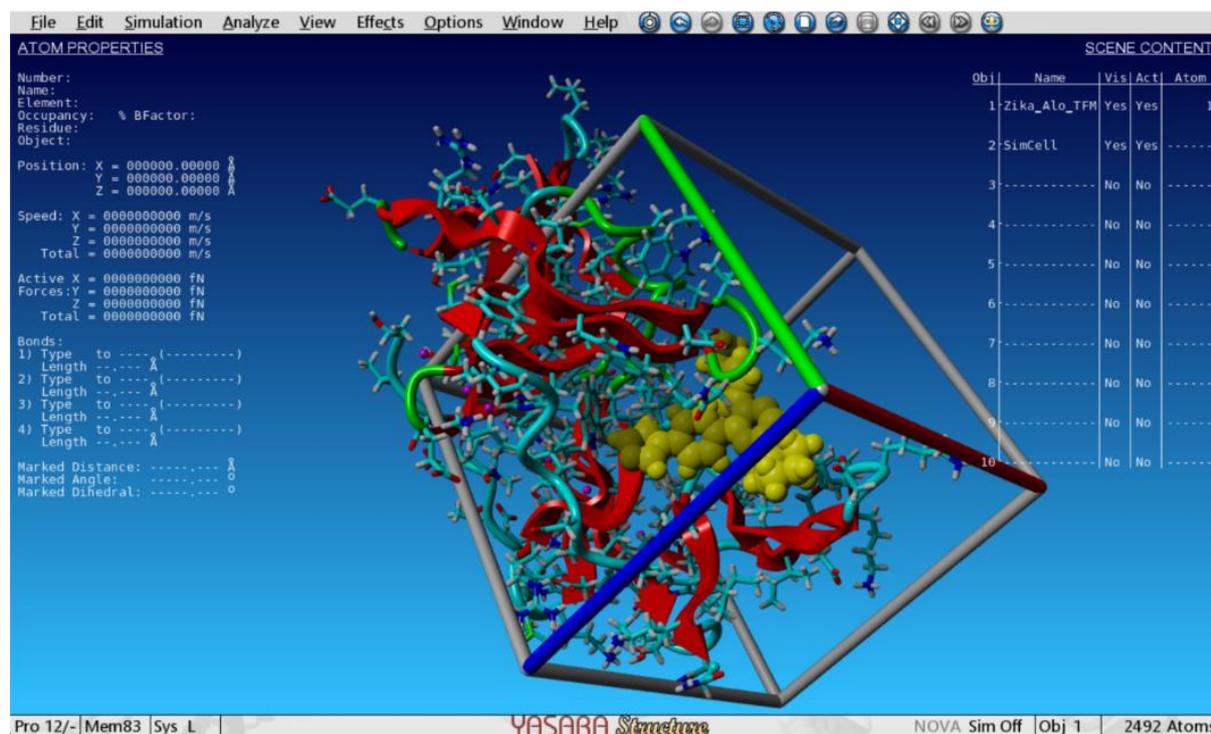


Figura 10. Escena con caja de simulación en YASARA. Se muestra el complejo NS2B-NS3 junto al ligando de referencia (en color amarillo). La caja se encuentra definida y centrada alrededor del ligando. Sus dimensiones son de 26,47 Å en cada arista.

En la etapa de acoplamiento, se utilizó el algoritmo VINA implementado en YASARA, que emplea la búsqueda global y su posterior refinamiento local para poder encontrar la mejor

conformación a cada ligando al que se le realiza el acoplamiento. *YASARA-VINA* es un avanzado algoritmo de acoplamiento molecular basado en el muestreo de Monte Carlo. Combina el software *YASARA* con el motor de acoplamiento *AutoDock-VINA* para predecir con alta precisión las interacciones entre ligandos y proteínas. Se ejecutó un guion de comandos (`dock_runscreening.mcr`) que automatizó el proceso de búsqueda y cálculo para encontrar la mejor conformación de cada ligando acoplado al receptor.

Al finalizar el proceso de acoplamiento, se obtuvieron resultados en forma de archivos de texto y escenas de *YASARA*. Entre los archivos generados, el más relevante fue el archivo de texto ("log"), que proporciona información detallada sobre todas las energías de unión de los complejos proteína-ligando.

Se realizaron análisis de tres librerías de compuestos distintos, lo cual implicó la ejecución de este procedimiento en tres ocasiones, cada una dedicada a una librería específica.

3.4.2. Programa de edición molecular *PyMOL*

PyMOL (<https://pymol.org/2/>) es un software de visualización molecular de código abierto y una de las principales herramientas de consulta y modificación de estructuras 3D en la comunidad científica. La selección de este programa se basa en su capacidad para proporcionar acceso rápido y eficiente a las estructuras descargadas de la base de datos RCSB PDB, permitiendo así la elección de un modelo estructural adecuado para llevar a cabo investigaciones de acoplamiento molecular en etapas posteriores.

3.4.3. Selección y manejo de librerías con *Marvin*

MarvinView es una herramienta versátil desarrollada por ChemAxon, diseñada para la visualización y manipulación de estructuras moleculares en formato 2D y 3D. Además de su capacidad de visualización, *MarvinView* ofrece diversas funcionalidades que facilitan la manipulación y análisis de moléculas, lo que lo convierte en una herramienta valiosa en el campo de la química computacional y el modelado molecular.

Una de las funciones clave de *MarvinView* es su capacidad para convertir entre diferentes formatos de archivo de estructuras químicas. En este contexto, se utilizó *MarvinView* para convertir las tres librerías de estructuras seleccionadas en formato "mol2" a formato "sdf" (Structure Data File), generando un archivo único para cada librería. Este proceso es necesario ya que se necesita convertir las librerías en un formato compatible con *YASARA*, por lo que facilita su manipulación y posterior análisis.

3.4.4. Evaluación de toxicidad con el programa *DataWarrior*

DataWarrior (v5.5) es una herramienta de software de código abierto utilizada para el análisis y visualización de datos químicos y biológicos, incluyendo la predicción y evaluación de la toxicidad de compuestos (<https://openmolecules.org/datawarrior/index.html>). Se analizaron parámetros relacionados con la toxicidad en *DataWarrior*, incluyendo su potencial tumorigénico, irritante, mutagénico y sus efectos sobre la reproducción. Estos parámetros se cuantificaron en una escala de 0 a 2, donde 0 indica que el compuesto no presenta riesgo de toxicidad; 1 que el compuesto presenta riesgo intermedio; y 2 indica que el compuesto tiene un alto riesgo de toxicidad.

3.4.5. Análisis de las propiedades moleculares con *SwissADME*

Se usó el servidor web *SwissADME* (<http://www.swissadme.ch/index.php>) para generar las representaciones moleculares y analizar las características físico-químicas correspondientes. Esta herramienta permitió visualizar y comparar las estructuras químicas de manera precisa, generando representaciones gráficas detalladas de las estructuras respectivas. Este proceso facilitó significativamente la selección de los compuestos finales.

3.4.6. Análisis de interacciones con *PLIP (Protein-Ligand Interaction Profiler)*

PLIP (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) es una herramienta bioinformática que analiza y visualiza las interacciones entre proteínas y ligandos, proporcionando información detallada sobre la naturaleza y la fuerza de estas interacciones, lo que permite evaluar la afinidad y especificidad de los compuestos seleccionados. El análisis en profundidad de los representantes de cada grupo se llevó a cabo utilizando *PLIP*.

3.5. Selección de ligandos

En primer lugar, los ligandos obtenidos mediante el programa *YASARA* se ordenaron en base a su energía de unión y a continuación se completó la descripción de cada uno de los ligandos mediante sus propiedades ADME.

Las propiedades ADME se refieren a las características farmacocinéticas de un fármaco en el organismo, abarcando su absorción (entrada al torrente sanguíneo), distribución

(alcance a tejidos y órganos), metabolismo (transformación química) y excreción (eliminación del cuerpo). Estos métodos se han diseñado con el objetivo de filtrar y seleccionar los ligandos más prometedores para su posterior análisis en el contexto de la investigación.

Se recopilaron todos los datos ADME de los ligandos de las tres bibliotecas de la base de datos del laboratorio obtenida a partir del servidor web *SwissADME* y se fusionaron con los valores de energía de unión obtenidos con el programa *YASARA*.

Posteriormente, se aplicaron las reglas de Lipinski como criterio inicial de filtrado. La regla de Lipinski (tabla 3) considera que para que un principio activo pueda ser administrado oralmente, no debe incumplir más de una de las siguientes consideraciones: el peso molecular debe ser inferior a 500 g/mol y el logP (siendo este el coeficiente de reparto octanol-agua) no debe superar valores de cinco. El ligando a estudio no debe presentar más de cinco HBD (donadores de hidrógeno) ni más de diez HBA (aceptores de hidrógeno).

Tabla 3. Parámetros de la Regla de Lipinski.

Parámetro	Valor
Peso molecular (g/mol)	<= 500
logP	<= 5
HBD	<= 5
HBA	<= 10

A continuación, se llevaron a cabo filtrados posteriores utilizando parámetros de absorción para refinar aún más la selección de ligandos. Se consideraron aspectos como la absorción gastrointestinal (GIA, *gastrointestinal absorption*), con valores de 0, 1 y 2. Un valor de 0 indica que el compuesto no es absorbido gastrointestinalmente; un valor de 1 indica una absorción moderada; y un valor de 2 indica una alta absorción gastrointestinal. Se evaluó también la permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica (BBB, *blood-brain barrier*), con valores de 0 y 1. Un valor de 0 significa que el compuesto no puede atravesar la barrera hematoencefálica, mientras que un valor de 1 indica que el compuesto es permeable a dicha barrera. Además, se analizó la capacidad de prevenir la expulsión por transportadores, determinando si la molécula es sustrato de una bomba de extracción de fármacos, como la glicoproteína-P (PGP), con valores de 0 y 1. Un valor de 0 indica que la molécula no es sustrato de la glicoproteína-P, mientras que un valor de 1 indica que sí lo es.

También se llevó a cabo una validación de la solubilidad de los ligandos seleccionados utilizando el modelo predictivo de solubilidad ESOL (Delaney, 2004) (tabla 4).

Tabla 4. Predicciones de solubilidad según el Modelo ESOL (Solubilidad estimada)

< -10	Insoluble
-10 a -6	Poco soluble
-6 a -4	Moderadamente soluble
-4 a -2	Soluble
-2 a 0	Muy soluble
> 0	Altamente soluble

El modelo ESOL (Estimación de la Solubilidad Acuosa por Fragmentos) es un método computacional que predice la solubilidad acuosa de compuestos orgánicos. Utiliza una combinación de propiedades moleculares y fragmentos estructurales para estimar la solubilidad de una molécula en agua, facilitando así el diseño y desarrollo de fármacos.

Seguidamente, se consideraron características farmacológicas deseables, como la farmacosimilitud (“*druglikeness*”), para identificar los ligandos con mayor probabilidad de éxito como candidatos terapéuticos. La farmacosimilitud es una medida que evalúa cómo de adecuado es un compuesto químico para ser desarrollado como fármaco, basado en sus propiedades físicas y químicas.

4. Resultados

4.1. Selección de estructuras y su justificación

En primer lugar, se realizó una búsqueda exhaustiva de las estructuras disponibles del complejo proteasa NS2B-NS3 del virus del Zika, así como de otros virus de la familia, en la base de datos RCSB PDB. Se identificaron varias estructuras relevantes que representan diferentes estados del complejo, tanto en su forma libre como en complejo con diversos inhibidores.

En el caso del virus del Zika se identificó la estructura PDB 5GXJ (2.6 Å), que contiene la estructura NS2B-NS3, pero que no tiene ningún ligando asociado en el sitio alostérico, ni la conformación adecuada para albergarlo. Por este motivo, la estructura PDB 6MO0 (figura 11A), que pertenece al complejo proteasa NS2B-NS3 del virus del Dengue, fue seleccionada debido a varios factores críticos: i) la proteasa NS2B-NS3 es prácticamente idéntica en secuencia y conformación a la del virus del Zika. ii) La resolución de la estructura 6MO0 es de 1.65 Å, proporcionando un nivel de detalle excepcionalmente alto. Esta alta resolución permite una visualización clara y precisa de la conformación del sitio alostérico y la interacción del inhibidor con la proteína. La precisión en la localización de átomos es crucial para estudios de modelado molecular y diseño de fármacos, ya que influye directamente en la exactitud de las predicciones sobre interacciones ligando-proteína. iii) Además, la estructura 6MO0 presenta un complejo NS2B-NS3 con un inhibidor alostérico específico.

Estas características son fundamentales, ya que nuestro objetivo es la búsqueda de nuevos inhibidores alostéricos. La presencia del inhibidor en la estructura proporciona un modelo de referencia para poder predecir con fiabilidad la interacción de compuestos inhibidores en el sitio alostérico de la proteína del Zika. Otras estructuras de NS2B-NS3 disponibles pueden estar en formas no inhibidas o con inhibidores de diferente naturaleza, lo que no sería tan útil para el propósito del estudio.

Asimismo, el inhibidor presente en la estructura 6MO0 de Dengue induce un cambio conformacional significativo en el complejo, revelando detalles sobre la plasticidad del sitio alostérico. Este conocimiento es de gran importancia para la predicción de nuevos inhibidores en Zika.

Para conseguir este objetivo se transfirió el ligando alostérico de la proteína del Dengue sobre la del Zika (figura 11), siendo necesario retocar un residuo de asparragina (Asn1152) en el sitio alostérico de la estructura del Zika 5GXJ. Este residuo se modificó con

el objetivo de conseguir un sitio alostérico abierto (figura 11B), con mayor posibilidad de albergar posibles inhibidores.

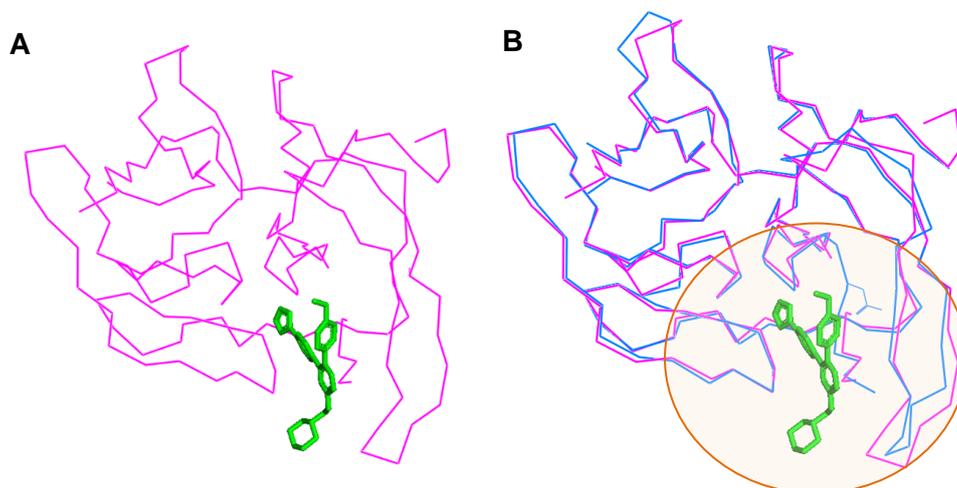


Figura 11. Estructura de NS2B-NS3 seleccionada (6MO0). (A) Complejo NS2B-NS3 del virus del Dengue en color rosa, unido a un inhibidor alostérico, en color verde. (B) Superposición de la estructura del NS2B-NS3 del Zika modificada de este complejo (en azul) sobre la estructura original de NS2B-NS3 de Dengue (en rosa), más el inhibidor alostérico, en color verde. En el círculo naranja se destaca el sitio de unión alostérico del complejo.

Disponemos, por tanto, de un modelo de la proteína NS2B-NS3 del Zika, con el sitio de unión alostérico abierto, donde realizar los ensayos de acoplamiento.

4.2. Selección de librerías de moléculas y su justificación

En el marco de este estudio, se ha llevado a cabo una selección exhaustiva de tres librerías de moléculas: *Phenol Explorer*, *p-ANAPL* y *AfroMalariaDB*. Se ha realizado un cribado virtual utilizando técnicas de *acoplamiento* molecular para evaluar la afinidad de todos los compuestos presentes en cada librería, con el complejo proteasa NS2B-NS3 de Zika. Este enfoque permite identificar cuáles de estos compuestos podrían encajar mejor en el sitio activo de la enzima, actuando como posibles inhibidores.

La capacidad de estas librerías para proporcionar datos detallados y fiables sobre una amplia gama de compuestos permite una selección informada y fundamentada de candidatos a inhibidores. Además, estas librerías se han actualizado constantemente, asegurando que la información utilizada en el análisis sea lo más realista y aplicable. Este nivel de detalle y actualización continua hace que librerías como *Phenol Explorer*, *p-ANAPL* y *AfroMalariaDB* sean una herramienta de gran utilidad para la investigación en biomedicina y farmacología.

Por otra parte, sus moléculas disponen de estructuras tridimensionales bien definidas, esenciales para realizar estudios de acoplamiento molecular. Las estructuras moleculares han

sido optimizadas y validadas, proporcionando modelos precisos para las simulaciones computacionales. La precisión de estas estructuras tridimensionales mejora la confiabilidad de los resultados obtenidos en los estudios de acoplamiento, facilitando la identificación de compuestos con alta actividad inhibitoria.

Por último, cabe subrayar el valor de los compuestos naturales de las tres librerías, que a menudo poseen estructuras químicas únicas. Estas características pueden resultar en mecanismos de acción novedosos y, potencialmente, en una mayor eficacia en la inhibición del complejo proteasa NS2B-NS3. Además, los productos naturales tienden a tener perfiles de seguridad más favorables, lo cual es una ventaja en el desarrollo de nuevos fármacos antivirales.

4.3. Acoplamiento molecular (*docking*) con el programa YASARA-VINA

El programa *YASARA-VINA* se presenta como una herramienta destacada, que combina las capacidades de *YASARA* con el algoritmo de *AutoDock-VINA*, integrando así herramientas de visualización, simulación y análisis molecular.

En el contexto específico del virus del Zika, el proceso de análisis incluirá la preparación del complejo proteico, las librerías, la configuración del acoplamiento, la ejecución y la evaluación de los resultados en función de su energía de unión. Su implementación en este estudio proporciona una base sólida para el desarrollo de nuevos tratamientos contra este patógeno emergente.

4.4. Análisis de resultados de compuestos

Los resultados obtenidos mediante el programa *YASARA-VINA* se ordenaron en base a la energía de unión ligando-receptor, resultando en una lista de 1665 compuestos (figura 12). Seguidamente, se recopilaron todos los datos ADME de los ligandos de las tres bibliotecas a partir del servidor web *SwissADME* y de las bases de datos del laboratorio, y se fusionaron con los valores de energía de unión obtenidos con el programa *YASARA*.

Posteriormente, se aplicaron las reglas de Lipinski como criterio inicial de filtrado, con el objetivo de reducir el número de ligandos en la lista y enfocar el análisis en aquellos más

prometedores desde el punto de vista farmacológico. En este primer filtrado, se seleccionaron las moléculas que cumplieran con todos los parámetros de Lipinski, así como aquellas que incumplían únicamente un parámetro, independientemente de cuál fuese. Este filtrado redujo el número de moléculas a 1256.

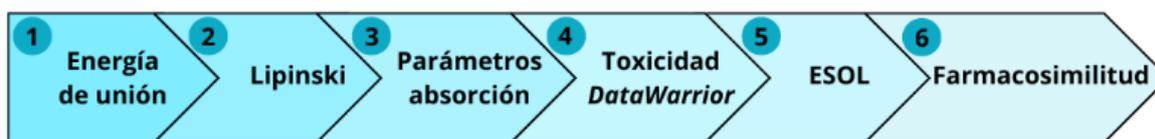


Figura 12. Esquema sobre los distintos pasos en el proceso de filtrado de las moléculas. Se ilustran las etapas de los filtrados sucesivos hasta la selección final de sustancias.

Una vez obtenido este primer listado de moléculas, se llevaron a cabo filtrados adicionales utilizando parámetros de absorción para refinar aún más la selección de ligandos. Se consideraron aspectos como la absorción gastrointestinal, aceptando solo aquellos compuestos con valores de 1 y 2. También de permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica, eligiendo aquellos compuestos que tuviesen valor 1 para este parámetro. Por último, respecto a los parámetros de absorción, se filtró según la capacidad de prevenir la expulsión por transportadores, sabiendo si la molécula es sustrato de una bomba de extracción de fármacos, como la glicoproteína-P, eligiendo aquellas moléculas con valor 0, es decir, que no sean sustratos de la glicoproteína-P. El filtrado de parámetros de absorción redujo las librerías a 343 ligandos.

Seguidamente se incorporaron parámetros relacionados con la toxicidad, utilizando el programa *DataWarrior*, incluyendo el potencial tumorigénico, irritante, mutagénico y sus efectos sobre la reproducción. En este proceso de filtrado, el requisito indispensable era que las moléculas estuviesen clasificadas como 0 en dichos parámetros, lo que redujo el número de moléculas a 144.

Además, se llevó a cabo una validación de la solubilidad de los ligandos seleccionados utilizando el modelo predictivo de solubilidad ESOL (Delaney, 2004). En este caso, el filtrado se realizó seleccionando aquellas moléculas con un valor de ESOL mayor que -4, quedando un total de 130 moléculas.

Por último, se consideraron características farmacológicas deseables, como la farmacosimilitud, para identificar los ligandos con mayor probabilidad de éxito como candidatos terapéuticos. Los compuestos obtenidos tras finalizar los filtrados anteriores se reordenaron de mayor a menor según su valor de farmacosimilitud. Además, para afinar la búsqueda, se volvió a filtrar según la regla de Lipinski en esta última lista, esta vez

seleccionando las moléculas que cumplieran con todos los parámetros. De esta manera, se generó un listado de 28 compuestos (tabla 5).

Tabla 5. Listado de los 28 compuestos resultantes tras los filtrados. Se muestra el número de orden, el nombre, y el número de incumplimientos de las reglas de Lipinski. El color de fondo indica la librería a la que pertenecen, siendo el rojo referente a AfroMalariaDB, el azul a p-ANAPL, y el verde a Phenol Explorer.

Nº	Nombre	Violaciones de Lipinski
1	Afro_Ma_UB_AYI_003.mol2	0
2	Afro_Ma_UB_AYI_010.mol2	0
3	p-ANAPL_P106.mol2	0
4	Phenol_496.mol2	0
5	p-ANAPL_Lg11-7.mol2	0
6	p-ANAPL_NCH2.mol2	0
7	Phenol_902.mol2	0
8	p-ANAPL_F-7.mol2	0
9	p-ANAPL_DME1.mol2	0
10	Afro_Ma_AYI_GOD_UB_006.mol2	0
11	p-ANAPL_P74.mol2	0
12	p-ANAPL_DMT13.mol2	0
13	Phenol_898.mol2	0
14	Phenol_896.mol2	0
15	p-ANAPL_SN4.mol2	0
16	p-ANAPL_LG12-4.mol2	0
17	Phenol_723.mol2	0
18	Phenol_771.mol2	0
19	Afro_Ma_AYI_GOD_UB_008.mol2	0
20	p-ANAPL_P83.mol2	0
21	Phenol_568.mol2	0
22	Phenol_549.mol2	0
23	p-ANAPL_RCE2.mol2	0
24	Phenol_546.mol2	0
25	Phenol_567.mol2	0
26	p-ANAPL_TRAL1.mol2	0
27	p-ANAPL_DprMAA4.mol2	0
28	p-ANAPL_HP39-3.mol2	0

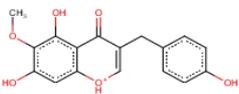
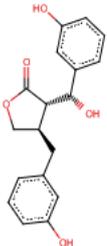
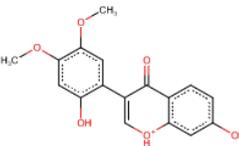
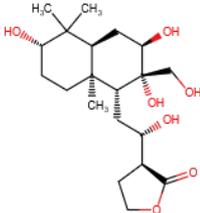
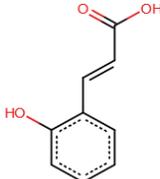
4.5. Selección de los mejores candidatos

Se procedió a la selección de moléculas de la lista mencionada en la Tabla 5, asegurando que sus estructuras fueran lo más diferentes posibles (ver Anexo I). Se usó el servidor web *SwissADME* para generar y analizar las representaciones moleculares correspondientes. Esta herramienta permitió visualizar y comparar las estructuras químicas de manera precisa, generando representaciones gráficas detalladas de las estructuras respectivas (ver Anexo II). Este proceso facilitó significativamente la selección de los compuestos finales.

La visualización de las estructuras de la tabla 5 permitió eliminar compuestos muy parecidos. Los compuestos 1, 13, 22, 23, 24 y 25 fueron descartados debido a duplicados o una alta similitud, resultando en un total de 22 compuestos únicos. Estos compuestos se agruparon en cinco grupos basándose en sus estructuras químicas: heterocíclicas con anillos fusionados y diferentes sustituyentes, fenoles, lactonas, ácidos carboxílicos y estructuras policíclicas con varios centros quirales.

Para asegurar la calidad de la selección, se eligieron los 10 mejores compuestos después de aplicar todos los criterios mencionados (moléculas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 15, 17 y 18). Esta selección se llevó a cabo considerando las diferentes estructuras químicas, eligiendo aquellas con mayor diversidad. Cada grupo fue representado por sus mejores compuestos, asegurando una variedad estructural y funcional dentro de la selección final. Posteriormente, este listado de 10 compuestos se volvió a filtrar teniendo en cuenta aquellos disponibles comercialmente y con mayor solubilidad, obteniendo un representante de cada uno de los cinco grupos formados anteriormente, reduciendo la lista a la mitad (5 compuestos). Las moléculas finales son las moléculas **5, 7, 17, 19 y 20**. En la tabla 6 se pueden observar las estructuras de dichas moléculas.

Tabla 6. Selección de moléculas final. Se representan las estructuras en 2D de las cinco moléculas seleccionadas de entre las 3 librerías analizadas.

5	7	17	19	20
				
<i>p</i> -ANAPL	Phenol Explorer	Phenol Explorer	AfroMalariaDB	<i>p</i> -ANAPL

Esta selección garantizó una variedad estructural y de características físico-químicas dentro del conjunto final de moléculas, representativas de las tres bibliotecas usadas.

El análisis en profundidad de las cinco moléculas seleccionadas se llevó a cabo utilizando *PLIP*, una web que analiza los complejos ligando-receptor y proporciona un listado de las interacciones encontradas. Para ello, se aisló el archivo PDB correspondiente a cada ligando-receptor y se envió a la web de *PLIP*. Los resultados obtenidos se utilizaron para explicar la eficiencia de la unión de los compuestos seleccionados. Esta evaluación se comparó con el ligando de referencia unido en el sitio de unión, proporcionando una perspectiva detallada sobre la afinidad y especificidad de cada compuesto en el contexto del sitio de unión específico.

El análisis de las cinco moléculas en el servidor *PLIP* muestra interacciones significativas con el sitio alostérico. En el caso de la molécula **7**, interactúa con el complejo estableciendo varios tipos de contactos en el sitio de unión, mostrando una variedad de interacciones hidrofóbicas y de enlace de hidrógeno (figura 13). La molécula **7** forma interacciones hidrofóbicas con cuatro residuos: Leu1076, Trp1083, Ile1123 y Val1155 (tabla 7). Estas interacciones son cruciales ya que estabilizan el ligando dentro del bolsillo hidrofóbico del sitio de unión, mejorando su afinidad de unión.

Tabla 7. Descripción de las interacciones hidrofóbicas de molécula 7 y el sitio de unión alostérico del complejo NS2B-NS3, analizadas usando el servidor web PLIP. Se describe el número del residuo, el tipo de aminoácido, y la distancia a la que se establece la interacción.

Número	Aminoácido	Distancia (Å)
1076A	Leu	3.40
1083A	Trp	3.79
1123A	Ile	3.63
1155A	Val	3.82
1155A	Val	3.76

Además, la molécula **7** se involucra en enlaces de hidrógeno con Asn1152 y Gly1153. Estos enlaces de hidrógeno contribuyen aún más a la estabilidad y especificidad del ligando en el sitio de unión, proporcionando un anclaje fuerte a través de interacciones tanto con la cadena principal como con las cadenas laterales. También se identificó una interacción de apilamiento aromático con el residuo Trp1083, lo cual sugiere que las interacciones aromáticas podrían jugar un papel importante en la estabilidad del complejo ligando-receptor.

Comparando las interacciones de la molécula **7** con las del ligando de referencia, se observan diferencias y similitudes que podrían influir en su capacidad inhibitoria. Mientras que ambos ligandos forman interacciones hidrofóbicas con Leu1076, el ligando de referencia también establece contactos hidrofóbicos adicionales con los residuos Thr1118, Asp1075 y Leu1149, lo que podría indicar una mayor área de interacción. Además, el ligando de referencia forma más enlaces de hidrógeno (tres en total) y tiene un mayor número de interacciones con residuos clave del receptor, como Asp1120 y His1051, lo cual puede aumentar su afinidad y estabilidad dentro del sitio de unión. Sin embargo, la molécula **7**, a pesar de tener menos interacciones totales, presenta una interacción de apilamiento aromático que no se observa en el de referencia, lo cual podría compensar parcialmente la menor cantidad de contactos hidrofóbicos y enlaces de hidrógeno. Estos hallazgos sugieren que, aunque tienen diferentes perfiles de interacción, ambas tienen potencial como inhibidores del receptor considerando no solo el número, sino también la naturaleza de las interacciones.

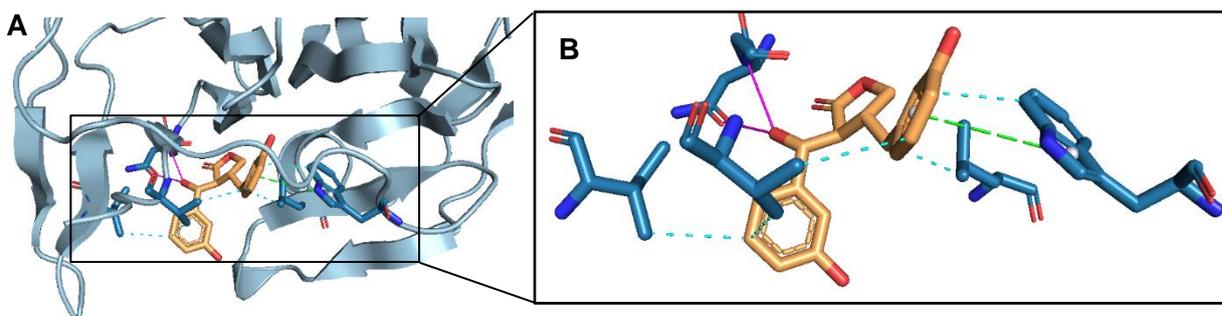


Figura 13. Interacciones de la molécula 7 (representada en color naranja) en el sitio de unión alostérico de NS3-NS2B. (A) Vista general del bolsillo alostérico del complejo NS2B-NS3 unido a la molécula 7. (B) Detalle de las interacciones de la molécula 7 (en naranja) y el complejo (en azul). En línea punteada de color cian se observan las interacciones hidrofóbicas, en la de color verde la de apilamiento aromático; y en magenta los enlaces de hidrógeno.

La molécula **5** (figura 14A) forma una interacción hidrofóbica con el residuo Trp1069, indicando una posible estabilización en la unión. Además, establece un enlace de hidrógeno con Leu1149. También participa en una interacción de apilamiento aromático con Trp1083, lo que sugiere una contribución adicional a la afinidad de la unión mediante interacciones de apilamiento de anillos aromáticos.

La molécula **17** (figura 14B) interactúa con el sitio de unión alostérico principalmente a través de interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno. Las interacciones de esta molécula con Leu1085 y Val1155 destacan dinámicas de unión diferentes en comparación con el ligando de referencia, enfocándose más en interacciones con la cadena principal dentro del sitio de unión.

La molécula **19** (figura 14C) interactúa a través de numerosas interacciones hidrofóbicas, observables en los residuos Gln1074, Leu1076, Ile1123 y Val1155, y enlaces de hidrógeno, lo que sugiere un buen ajuste en el sitio alostérico del complejo. En comparación con el ligando de referencia, que también presenta múltiples interacciones con el sitio de unión, se observa que comparten ciertos tipos de interacciones, pero difieren en algunos residuos.

La molécula **20** (figura 14D) interactúa con el complejo principalmente a través de dos tipos de interacciones: hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno. Comparándola con el ligando de referencia, esta molécula presenta menos interacciones en número y diversidad, pero a pesar de formar menos interacciones, sigue mostrando potencial como inhibidor debido a sus interacciones específicas.

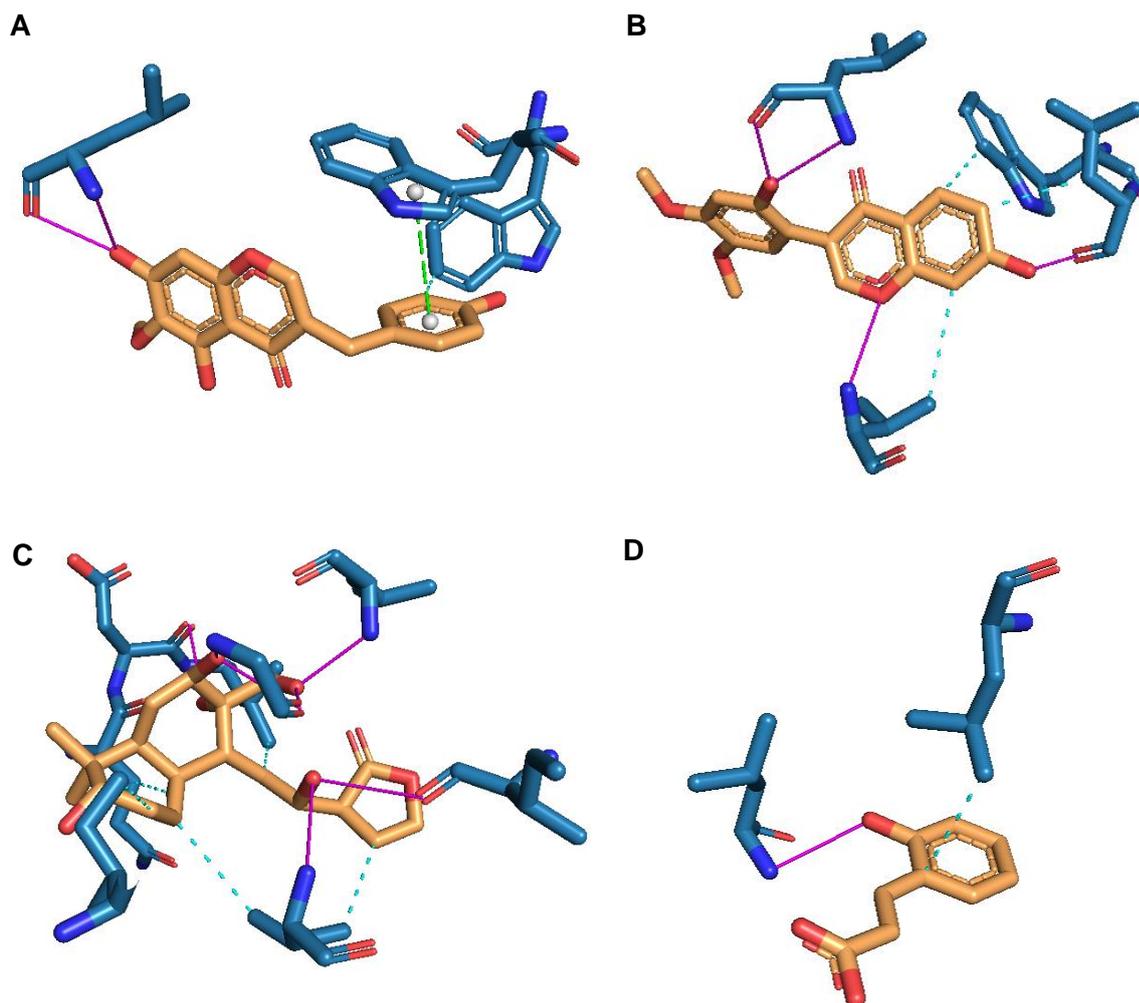


Figura 14 Interacciones de las diferentes moléculas (en color naranja) con el sitio de unión alostérico (en color azul). Las interacciones se muestran en diferentes colores: en línea punteada de color cian se observan las interacciones hidrofóbicas, en la de color verde la de apilamiento aromático; y en magenta los enlaces de hidrógeno. (A) Molécula 5. (B) Molécula 17. (C) Molécula 19. (D) Molécula 20.

4.7. Localización comercial de los candidatos

La disponibilidad comercial de los compuestos candidatos es un aspecto crucial para su implementación en estudios experimentales y en el desarrollo de nuevos fármacos. A continuación, se describe un análisis detallado de la accesibilidad de estas moléculas en el mercado, identificando proveedores confiables y destacando la viabilidad de su adquisición para su posterior utilización en el laboratorio.

La **molécula 5**, *6-methoxy-3-[(4-oxidophenyl)methyl]-4-oxo-4H-chromene-5,7-bis(olate)*, se puede adquirir a través de Sigma-Aldrich y TCI Chemicals. Estos proveedores

garantizan la pureza y calidad del compuesto, esencial para su aplicación en experimentos avanzados.

Asimismo, la **molécula 7**, *3-[(R)-hydroxy[(3S,4R)-4-[(3-oxidophenyl)methyl]-2-oxoxolan-3-yl]methyl]benzen-olate*, está disponible en TCI Chemicals y Fisher Scientific, al igual que la **molécula 17** (*3-(4,5-dimethoxy-2-oxidophenyl)-4-oxo-4H-chromen-7-olate*) y la **molécula 19** (***(3S)-3-[(1S)-2-[(1R,2S,3R,4aS,6S,8aS)-2,3,6-trihydroxy-2-(hydroxymethyl)-5,5,8a-trimethyl-decahydronaphthalen-1-yl]-1-hydroxyethyl]oxolan-2-one*). La amplia disponibilidad de estas moléculas facilita su adquisición para diversas investigaciones farmacológicas y de desarrollo de nuevos fármacos.

Finalmente, la **molécula 20** (*2E)-3-(2-oxidophenyl)prop-2-ene-1,1-bis(olate)* se puede adquirir a través de Sigma-Aldrich y Alfa Aesar, asegurando su pureza y disponibilidad.

Este análisis busca facilitar el proceso de obtención de los compuestos necesarios y garantizar la continuidad de la investigación científica. La elección de proveedores confiables y la posibilidad de síntesis personalizada aseguran que los investigadores cuenten con los recursos necesarios para el desarrollo adecuado de sus estudios.

5. Discusión

A lo largo de este estudio, se han evaluado diferentes librerías de compuestos con el objetivo de identificar inhibidores potenciales del complejo proteasa NS2B-NS3 del virus del Zika mediante el uso del acoplamiento virtual.

La existencia de la estructura de la proteasa del virus del Dengue (PDB 6MO0) en presencia de un inhibidor alostérico fue clave para poder llevar a cabo el estudio computacional. El complejo proteasa del virus Zika (PDB 5GXJ) no presentaba la conformación adecuada en el sitio de unión alostérico para albergar posibles inhibidores, por lo que un análisis comparativo de las proteínas de ambos virus proporcionó una evaluación precisa del impacto de la Asn1152 en el sitio de unión alostérico, lo que permitió la modificación del sitio de unión de la proteasa del Zika y su adecuación para el estudio computacional. Comparativamente, otras estructuras disponibles no ofrecían la misma resolución ni el contexto adecuado para estudiar estas interacciones con la misma precisión.

En cuanto a las librerías seleccionadas, *Phenol Explorer* fue elegida debido a su exhaustiva recopilación de datos sobre compuestos fenólicos, los cuales poseen una amplia gama de actividades biológicas, desde antioxidantes hasta anticancerígenas. Estos compuestos fenólicos tienen la capacidad de modular diversos procesos fisiológicos, lo que los posiciona como agentes prometedores en la investigación farmacéutica. Además, su origen natural sugiere una mayor aceptación por parte del organismo humano y una menor probabilidad de efectos secundarios adversos en comparación con compuestos sintéticos. La librería es ampliamente reconocida y utilizada en la comunidad científica, lo que garantiza su disponibilidad y accesibilidad para la comparación y validación de resultados. Estos factores la convierten en una herramienta valiosa para el desarrollo de fármacos, proporcionando una base sólida para explorar el potencial farmacológico de los polifenoles, y justifican su elección para este estudio (Neveu et al., 2010).

La librería *p-ANAPL* fue seleccionada por su riqueza en compuestos derivados de plantas medicinales africanas, que han demostrado diversas actividades biológicas, incluyendo propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y anticancerígenas. Esta colección permite una exploración detallada de su potencial como inhibidores del complejo proteasa NS2B-NS3 del virus del Zika. La biodiversidad africana ofrece una fuente única de moléculas con propiedades biológicas no exploradas previamente, proporcionando un catálogo exclusivo de compuestos que no se encuentran comúnmente en otras librerías de productos naturales. Además, *p-ANAPL* se presenta como una fuente históricamente explotada en la investigación

farmacológica en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos. La riqueza de la flora africana y su uso tradicional en la medicina sugieren un alto potencial para descubrir nuevos fármacos antivirales, justificación fundamental para la elección de esta librería (Ntie-Kang et al., 2014).

La elección de la librería *AfroMalariaDB* se basa en la gran variedad de moléculas derivadas de la flora africana, las cuales exhiben actividades antiplasmodiales y antimaláricas. Estas moléculas han demostrado actividades significativas contra *Plasmodium falciparum*, el parásito causante de la malaria, lo que sugiere su potencial para actuar contra otras enzimas de patógenos, como el complejo NS2B-NS3 del virus del Zika. La librería *AfroMalariaDB* ofrece una notable diversidad química de sus moléculas, lo que favorece el descubrimiento de nuevas actividades biológicas, incluidas las propiedades antivirales. Además, estas moléculas fueron seleccionadas no solo por sus propiedades antiplasmodiales, sino también por sus características tipo fármaco (*drug-like*), lo que significa que poseen propiedades químicas adecuadas para el desarrollo de fármacos, tales como biodisponibilidad, estabilidad metabólica y baja toxicidad. Por lo tanto, su elección se justifica por su diversidad y potencial bioactivo, así como por su enfoque en moléculas con características tipo fármaco, cruciales para el desarrollo de nuevos fármacos antivirales (Onguéné et al., 2014).

El método de acoplamiento molecular *YASARA-VINA* fue seleccionado por su capacidad para proporcionar resultados precisos y reproducibles. Aunque existen otros programas de acoplamiento como *AutoDock* (Morris et al., 2009), *DOCK* (Ewing et al., 2001) y *FlexX* (Rarey et al., 1996), *YASARA-VINA* se destaca por su integración del algoritmo *AutoDock-Vina* en un entorno de simulación molecular robusto y flexible. *YASARA-VINA* permite manejar la flexibilidad tanto del ligando como del receptor, lo que es crucial para la precisión de las predicciones de unión. Además, su integración con el programa *YASARA* facilita la interpretación de resultados y proporciona un entorno adecuado para simulaciones moleculares. Comparativamente, otros métodos no ofrecían el mismo nivel de integración ni la misma eficiencia en el cribado de grandes librerías de compuestos. Por ejemplo, aunque *AutoDock* (Morris et al., 2009), es ampliamente utilizado, su entorno no es tan flexible ni está tan bien integrado para simulaciones moleculares complejas. *DOCK* (Ewing et al., 2001), por su parte, puede ser menos eficiente en manejar la flexibilidad del receptor, lo que puede afectar la precisión de las predicciones. *FlexX* (Rarey et al., 1996), aunque eficaz, no tiene la misma capacidad de integración para análisis posteriores dentro de un entorno de simulación completo como el que ofrece *YASARA*. En definitiva, *YASARA-VINA* permite obtener resultados más rápidos y precisos gracias a su algoritmo optimizado, mejorando así la identificación de inhibidores potenciales del virus del Zika.

La evaluación de las propiedades ADME se realizó para asegurar la selección de ligandos con características farmacocinéticas óptimas. Se aplicaron las reglas de Lipinski como criterio inicial de filtrado, ya que estas reglas predicen la capacidad de un compuesto para ser un fármaco oralmente activo en humanos. Este enfoque fue preferido sobre otros métodos de evaluación debido a su amplia aceptación y efectividad en la industria farmacéutica. Además, se evaluaron aspectos de absorción gastrointestinal (GIA), permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica (BBB), y la capacidad de evitar la expulsión por transportadores como la glicoproteína-P (PGP). La solubilidad se validó utilizando el modelo predictivo ESOL, y se evaluaron las características de farmacosimilitud para identificar los ligandos con mayor probabilidad de éxito como candidatos terapéuticos. Otros modelos predictivos (como *Veber Rules*, o *Ghose Filter*, entre otros) no ofrecían la misma precisión o no estaban tan ampliamente aceptados en la evaluación de compuestos para el desarrollo de fármacos.

Como resultado final del cribado de las librerías y filtrado posterior, se han identificado cinco compuestos con un potencial significativo como inhibidores antivirales del complejo NS2B-NS3 del virus del Zika. Estos compuestos fueron seleccionados basándonos en una combinación de sus características físico-químicas, sus interacciones con el sitio alostérico del complejo, su perfil de toxicidad y su disponibilidad comercial.

La **molécula 5** destaca por su buena solubilidad en agua y estabilidad química. Sus interacciones incluyen una interacción hidrofóbica con el residuo Trp1069, un enlace de hidrógeno con Leu1149 y una interacción de apilamiento aromático con Trp1083. Comparada con otros compuestos que no mostraban la misma afinidad ni estabilidad, la **molécula 5** se destacó por su fuerte afinidad con el sitio alostérico del complejo NS2B-NS3. Además, ha demostrado baja toxicidad en modelos preliminares y es fácilmente sintetizable y disponible en el mercado, lo que facilita su aplicación en futuros estudios.

La **molécula 7** se seleccionó por su alta estabilidad metabólica y buena biodisponibilidad. En comparación con otros compuestos con menor estabilidad metabólica y biodisponibilidad, la **molécula 7** aseguró una unión fuerte y específica al complejo. Su baja toxicidad y buen perfil de seguridad, junto con su fácil disponibilidad comercial, refuerzan su viabilidad como candidato para estudios más avanzados.

La **molécula 17** presenta una moderada solubilidad en agua y buena estabilidad química. Su baja toxicidad, su disponibilidad comercial y bajo costo la hacen una opción práctica para exploraciones adicionales.

La **molécula 19**, se seleccionó debido a su alta estabilidad y excelente biodisponibilidad. La baja toxicidad y el buen perfil de seguridad de esta molécula, junto con su relativa facilidad de síntesis y adquisición, la posicionan como un candidato prometedor.

Finalmente, la **molécula 20**, se caracteriza por su buena solubilidad y estabilidad. Comparada con otros compuestos que no demostraron la misma solubilidad y estabilidad, la molécula 20 destacó por su baja toxicidad y su disponibilidad comercial, reforzando su inclusión en esta selección.

Estas moléculas muestran interacciones significativas con el sitio alostérico del complejo NS2B-NS3 del virus del Zika, sugiriendo su potencial como sustancias antivirales efectivas. Cada una de estas moléculas ha demostrado cumplir con múltiples criterios *in silico*, indicando su validez para ser probados experimentalmente en estudios preclínicos.

6. Conclusiones

Las conclusiones extraídas de este estudio son las siguientes:

1. La estructura PDB 6MO0 del virus del Dengue permite optimizar el complejo proteasa NS2B-NS3 del virus del Zika (5GXJ) para su uso en cribado virtual computacional.
2. Las técnicas de acoplamiento molecular con librerías de sustancias naturales fueron efectivas para identificar potenciales inhibidores alostéricos del complejo proteasa NS2B-NS3.
3. El método YASARA-VINA tiende a seleccionar moléculas químicamente más sencillas, lo que podría facilitar la síntesis y optimización de compuestos en el desarrollo de fármacos.
4. Entre los compuestos seleccionados, se destaca la **molécula 7**, de la librería *Phenol Explorer* por sus propiedades fisicoquímicas, por sus valores ADME, y por su potencial para interactuar con el sitio de unión alostérico.

7. Proyección futura

Los mejores candidatos identificados en el cribado virtual serán ensayados mediante metodología fluorescente a través de un sustrato que emite fluorescencia al ser escindido por el complejo enzimático NS2B-NS3 lo que determinará la mayor o menor capacidad inhibitoria de los compuestos seleccionados, bajo diferentes condiciones experimentales para estudiar su toxicidad y, en consecuencia, hallar su IC50. Posteriormente, los que hayan resultado con la mayor capacidad inhibitoria, serán estudiados sobre células infectadas por ZIKV gracias a la colaboración con el grupo de la Dra. Irigoyen de la Universidad de Cambridge.

Complementando el estudio y en paralelo, se está llevando a cabo el cribado virtual mediante el software *Schrodinger*, de la librería de compuestos orgánicos que posee el grupo de Química Médica y Biología Traslacional dirigido por la doctora Ana Martínez Gil del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) Margarita Salas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), en Madrid, expertos en síntesis orgánica de moléculas y descubrimiento de fármacos, gracias a la estancia que realiza la Dra. Fernández Escamilla. Los compuestos seleccionados serán evaluados junto a los de este estudio, tal y como hemos descrito anteriormente.

Aquellos compuestos derivados de ambos estudios, que hayan presentado una capacidad inhibitoria destacada, será ensayada su eficacia en un modelo adecuado de la enfermedad de Zika.

En conclusión, esta investigación permitirá evaluar de manera precisa la eficacia de los compuestos inhibidores contra el virus del Zika, proporcionando información crucial para el desarrollo de posibles tratamientos.

8. Referencias bibliográficas

- Agrelli, A., de Moura, R. R., Crovella, S., & Brandão, L. A. C. (2019). ZIKA virus entry mechanisms in human cells. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 69, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.018>
- Alzahrani, N., Wu, M. J., Shanmugam, S., & Yi, M. K. (2020). Delayed by Design: Role of Suboptimal Signal Peptidase Processing of Viral Structural Protein Precursors in Flaviviridae Virus Assembly. *Viruses*, 12(10), 1090. <https://doi.org/10.3390/v12101090>
- Bhandari, V., Taksande, A. B., & Sapkale, B. (2023). Disease Transmission and Diagnosis of Zika Virus. *Curēus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.49263>
- Brinton, M. A., & Basu, M. (2015). Functions of the 3' and 5' genome RNA regions of members of the genus Flavivirus. *Virus Research*, 206, 108-119. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.02.006>
- Cabrera Hernández, Y., Vega Jiménez, J., Miranda Folch, J. J., Martínez Rodríguez, S., García Cuervo, D., & Martínez Abreu, J. (2017). Zika virus infection as an edge for Public Health. *Revista Médica Electrónica*, 39(2), 304-312. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1684-18242017000200015&lng=es&tlng=en.
- Collao, X., Prado, L., González, C. R., De Vasquez, A. M., Araki, R., Henríquez, T., & M, C. P. (2015). Detección de flavivirus en mosquitos (Diptera: Culicidae) de la Isla de Pascua-Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 32(1), 113-116. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182015000200016>
- Delaney, J. S. (2004). ESOL: Estimating aqueous solubility directly from molecular structure. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 44(3), 1000-1005. <https://doi.org/10.1021/ci034243x>
- Diosa-Toro, M., Prasanth, K. R., Bradrick, S. S., & Blanco, M. A. G. (2020). Role of RNA-binding proteins during the late stages of Flavivirus replication cycle. *Virology Journal*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01329-7>
- Elong Ngonu, A., & Shresta, S. (2018). Immune Response to Dengue and Zika. *Annual Review of Immunology*, 36(1), 279-308. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053142>

- Ewing, T. J., Makino, S., Skillman, A. G., & Kuntz, I. D. (2001). DOCK 4.0: Search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 15(5), 411-428. doi:10.1023/A:1011115820450
- Fernández Martínez, B., Martínez Sánchez, E. V., Díaz García, O., et al. (2019). La enfermedad por virus Zika en España. Resultados de la vigilancia y epidemiología de los casos notificados en 2015-2017. *Medicina Clínica*, 153(1), 6-12. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2018.12.014>
- Giménez-Richarte, Á., Arbona, C., & Ramos-Rincón, J. (2024). Arbovirus como amenaza para la seguridad transfusional en España: revisión narrativa. *Medicina Clínica*. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2024.01.028>
- Harapan, H., Michie, A., Sasmono, R. T., & Imrie, A. (2020). Dengue: A minireview. *Viruses*, 12(8), 829. <https://doi.org/10.3390/v12080829>
- Hasan, S. S., Sevana, M., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2018). Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25(1), 13-20. <https://doi.org/10.1038/s41594-017-0010-8>
- Juárez Marckwordt, A. M. (2021). *Evaluación in silico de actividad antiviral y propiedades farmacocinéticas de nuevos inherentes alostéricos de la proteasa NS2B/NS3 del virus Zika*. [Tesis de Licenciatura en Química] Universidad de Valle de Guatemala. <https://repositorio.uvg.edu.gt/handle/123456789/4322>
- Karwal, P., Vats, I. D., Sinha, N., Singhal, A., Sehgal, T., & Kumari, P. (2020). Therapeutic Applications of Peptides against Zika Virus: A Review. *Current Medicinal Chemistry*, 27(23), 3906-3923. <https://doi.org/10.2174/0929867326666190111115132>
- Lin, H., Yip, B., Huang, L., & Wu, S. (2018). Zika virus structural biology and progress in vaccine development. *Biotechnology Advances*, 36(1), 47-53. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.004>
- Lee, M. F., Wu, Y. S., & Poh, C. L. (2023). Molecular Mechanisms of Antiviral Agents against Dengue Virus. *Viruses*, 15(3), 705. <https://doi.org/10.3390/v15030705>
- Leier, H. C., Weinstein, J. B., Kyle, J. E., Lee, J. Y., Bramer, L. M., Stratton, K. G., Kempthorne, D., Navratil, A. R., Tafesse, E. G., Hornemann, T., Messer, W. B., Dennis, E. A., Metz, T. O., Barklis, E., & Tafesse, F. G. (2020). A global lipid map defines a network essential

- for Zika virus replication. *Nature Communications*, 11(1).
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-17433-9>
- Martínez, J. D., Garza, J. A. C., & Cuellar-Barboza, A. (2019). Going Viral 2019: Zika, Chikungunya, and Dengue. *Dermatologic clinics*, 37(1), 95–105.
<https://doi.org/10.1016/j.det.2018.07.008>
- Mirza, M. U., Alanko, I., Vanmeert, M., Muzzarelli, K. M., Salo-Ahen, O. M. H., Abdullah, I., Kovari, I. A., Claes, S., De Jonghe, S., Schols, D., Schinazi, R. F., Kovari, L. C., Trant, J. F., Ahmad, S., & Froeyen, M. (2022). The discovery of Zika virus NS2B-NS3 inhibitors with antiviral activity via an integrated virtual screening approach. *European Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 175, 106220.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2022.106220>
- Modis Y. (2013). Class II fusion proteins. *Advances in experimental medicine and biology*, 790, 150–166. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7651-1_8
- Morita, E., & Suzuki, Y. (2021). Membrane-Associated Flavivirus Replication Complex-Its Organization and Regulation. *Viruses*, 13(6), 1060. <https://doi.org/10.3390/v13061060>
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal Of Computational Chemistry*, 30(16), 2785-2791.
<https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Mwaliko, C., Nyaruaba, R., Zhao, L., Atoni, E., Karungu, S., Mwau, M., Lavillette, D., Xia, H., & Yuan, Z. (2020). Zika virus pathogenesis and current therapeutic advances. *Pathogens And Global Health*, 115(1), 21-39.
<https://doi.org/10.1080/20477724.2020.1845005>
- Nasar, S., Rashid, N., & Iftikhar, S. (2020). Dengue proteins with their role in pathogenesis, and strategies for developing an effective anti-dengue treatment: A review. *Journal of medical virology*, 92(8), 941–955. <https://doi.org/10.1002/jmv.25646>
- Neufeldt, C. J., Cortese, M., Acosta, E. G., & Bartenschlager, R. (2018). Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nature reviews. Microbiology*, 16(3), 125–142. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.170>
- Neveu, V., Perez-Jimenez, J., Vos, F., Crespy, V., Du Chaffaut, L., Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D., & Scalbert, A. (2010). Phenol-Explorer: an online

- comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database*, 2010(0), bap024. <https://doi.org/10.1093/database/bap024>
- Ntie-Kang, F., Onguéné, P. A., Fotso, G. W., Andrae-Marobela, K., Bezabih, M., Ndom, J. C., Ngadjui, B. T., Ogundaini, A. O., Abegaz, B. M., & Meva'a, L. M. (2014). Virtualizing the p-ANAPL Library: A Step towards Drug Discovery from African Medicinal Plants. *PLoS One*, 9(3), e90655. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090655>
- Onguéné, P. A., Ntie-Kang, F., Mbah, J. A., Lifongo, L. L., Ndom, J. C., Sippl, W., & Mbaze, L. M. (2014). The potential of anti-malarial compounds derived from African medicinal plants, part III: an in silico evaluation of drug metabolism and pharmacokinetics profiling. *Organic And Medicinal Chemistry Letters*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s13588-014-0006-x>
- Pergolizzi, J., Jr, LeQuang, J. A., Umeda-Raffa, S., Fleischer, C., Pergolizzi, J., 3rd, Pergolizzi, C., & Raffa, R. B. (2021). The Zika virus: Lurking behind the COVID-19 pandemic? *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 46(2), 267–276. <https://doi.org/10.1111/jcpt.13310>
- Petersen, L. R., Jamieson, D. J., Powers, A. M., & Honein, M. A. (2016). Zika virus. *New England Journal Of Medicine/ The New England Journal Of Medicine*, 374(16), 1552-1563. <https://doi.org/10.1056/nejmra1602113>
- Phoo, W. W., Zhang, Z., Wirawan, M., Chew, E. J. C., Chew, A. B. L., Kouretova, J., Steinmetzer, T., & Luo, D. (2018). Structures of Zika virus NS2B-NS3 protease in complex with peptidomimetic inhibitors. *Antiviral research*, 160, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.10.006>
- Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T., & Klebe, G. (1996). A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *Journal Of Molecular Biology/Journal Of Molecular Biology*, 261(3), 470-489. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0477>
- Rehman, H. M., Sajjad, M., Ali, M. A., Gul, R., Irfan, M., Naveed, M., Bhinder, M. A., Ghani, M. U., Hussain, N., Said, A. S. A., Haddad, A. H. I. A., & Saleem, M. (2023). Identification of NS2B-NS3 Protease Inhibitors for Therapeutic Application in ZIKV Infection: A Pharmacophore-Based High-Throughput Virtual Screening and MD Simulations Approaches. *Vaccines*, 11(1), 131. <https://doi.org/10.3390/vaccines11010131>

- Shiryayev, S. A., Cieplak, P., Cheltsov, A., Liddington, R. C., & Tersikh, A. V. (2023). Dual function of Zika virus NS2B-NS3 protease. *PLOS Pathogens*, *19*(11), e1011795. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011795>
- Shiryayev, S. A., Farhy, C., Pinto, A., Huang, C. T., Simonetti, N., Elong Ngonu, A., Dewing, A., Shresta, S., Pinkerton, A. B., Cieplak, P., Strongin, A. Y., & Tersikh, A. V. (2017). Characterization of the Zika virus two-component NS2B-NS3 protease and structure-assisted identification of allosteric small-molecule antagonists. *Antiviral research*, *143*, 218–229. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.04.015>
- Shin, H. J., Kim, M., Lee, J., Hwang, I., Yoon, G. Y., Kim, H. S., Kwon, Y., Ahn, D., Kim, K., Kim, B., Kim, S., & Kim, C. (2021). Structure-Based Virtual Screening: Identification of a Novel NS2B-NS3 Protease Inhibitor with Potent Antiviral Activity against Zika and Dengue Viruses. *Microorganisms*, *9*(3), 545. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030545>
- Silva, N. M., Santos, N. C., & Martins, I. C. (2020). Dengue and Zika Viruses: Epidemiological History, Potential Therapies, and Promising Vaccines. *Tropical Medicine And Infectious Disease*, *5*(4), 150. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed5040150>
- Starvaggi, J., Previti, S., Zappalà, M., & Ettari, R. (2024). The Inhibition of NS2B/NS3 Protease: A New Therapeutic Opportunity to Treat Dengue and Zika Virus Infection. *International Journal Of Molecular Sciences*, *25*(8), 4376. <https://doi.org/10.3390/ijms25084376>
- Velandia, M. L., & Castellanos, J. E. (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*, *15*(1), 33-43. [https://doi.org/10.1016/s0123-9392\(11\)70074-1](https://doi.org/10.1016/s0123-9392(11)70074-1)
- Virus*. (s. f.). Genome.gov. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Virus>
- Yildiz, M., Ghosh, S., Bell, J. A., Sherman, W., & Hardy, J. A. (2013). Allosteric inhibition of the NS2B-NS3 protease from dengue virus. *ACS chemical biology*, *8*(12), 2744–2752. <https://doi.org/10.1021/cb400612h>
- Zhang, Z., Li, Y., Loh, Y. R., Phoo, W. W., Hung, A. W., Kang, C., & Luo, D. (2016). Crystal structure of unlinked NS2B-NS3 protease from Zika virus. *Science*, *354*(6319), 1597-1600. <https://doi.org/10.1126/science.aai9309>

9. Anexos

Anexo 1

Información complementaria a la tabla 5 del estudio. Aparecen los identificadores (ID) de las respectivas moléculas de cada librería, el valor de la energía de acoplamiento, y la farmacosimilitud.

Nº	ID	Energía de acoplamiento [kcal/mol]	Farmacosimilitud
1	Afro_Ma_UB_AYI_003.mol2	8.290	3.717
2	Afro_Ma_UB_AYI_010.mol2	8.149	3.711
3	p-ANAPL_P106.mol2	9.057	3.099
4	Phenol_496.mol2	8.111	2.235
5	p-ANAPL_Lg11-7.mol2	9.536	0.444
6	p-ANAPL_NCH2.mol2	8.844	0.440
7	Phenol_902.mol2	8.057	0.406
8	p-ANAPL_F-7.mol2	9.477	0.403
9	p-ANAPL_DME1.mol2	8.638	0.403
10	Afro_Ma_AYI_GOD_UB_006.mol2	8.090	0.359
11	p-ANAPL_P74.mol2	9.199	0.282
12	p-ANAPL_DMT13.mol2	8.634	0.265
13	Phenol_898.mol2	8.060	0.240
14	Phenol_896.mol2	8.007	0.240
15	p-ANAPL_SN4.mol2	9.546	0.185
16	p-ANAPL_LG12-4.mol2	9.116	0.053
17	Phenol_723.mol2	8.325	0.036
18	Phenol_771.mol2	8.097	-0.104
19	Afro_Ma_AYI_GOD_UB_008.mol2	7.999	-0.377
20	p-ANAPL_P83.mol2	9.030	-0.601
21	Phenol_568.mol2	9.052	-0.989
22	Phenol_549.mol2	8.035	-0.989
23	p-ANAPL_RCE2.mol2	8.766	-1.054
24	Phenol_546.mol2	8.584	-1.056
25	Phenol_567.mol2	8.175	-1.056
26	p-ANAPL_TRAL1.mol2	9.296	-1.454
27	p-ANAPL_DprMAA4.mol2	9.342	-3.061
28	p-ANAPL_HP39-3.mol2	8.728	-3.660

Anexo 2

Estructura química de las moléculas 28 resultantes, representadas mediante *SwissADME*.