

UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS PUEBLA

ESCUELA DE CIENCIAS

DEPARTAMENTOS DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS



**TAMIZAJE DE COMPUESTOS EXTRAÍBLES DE PLANTAS MEXICANAS
COMO GUÍAS DE FÁRMACOS CONTRA LAS SERINA-PROTEASAS DE LOS
FLAVOVIRUS DEL DENGUE Y ZIKA.**

TESIS QUE, PARA COMPLETAR LOS REQUISITOS DEL PROGRAMA DE HONORES

PRESENTA LA ESTUDIANTE

ANGÉLICA PAOLA AGUT CADENA

165710

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

DRA. LUCILA ISABEL CASTRO PASTRANA

SAN ANDRÉS CHOLULA, PUEBLA.

VERANO, 2023

Hoja de firmas

Tesis que, para completar los requisitos del Programa de Honores presenta el
estudiante **Angélica Paola Agut Cadena ID 165710**

Director de Tesis

Dra. Lucila Isabel Castro Pastrana

Presidente de Tesis

Dr. Luis Ricardo Hernández

Secretario de Tesis

<<Dr. Julio Lenin Domínguez Ramírez>>

Tamizaje de compuestos extraíbles de plantas mexicanas como guías de fármacos contra las serina-proteasas de los flavovirus del dengue y Zika.

Resumen.

Las proteasas de los Flavivirus son cruciales en la maduración de los virus durante la infección. Esto se debe a que los Flavivirus traducen su genoma como una poliproteína que debe proteolizarse para poder ensamblar la capsida así como las enzimas que replican y expresan el genoma viral. En el presente estudio utilizamos una base de datos de compuestos derivados de plantas para identificar guías de fármacos que inhiban la actividad de las proteasas de Dengue y de Zika. Identificamos a varios compuestos glicosilados de derivados de curcubitano por su alta afinidad y la frecuencia con las que ADFR las identificó. Además, el docking flexible muestra que su afinidad depende de residuos del sitio catalítico.

Palabras clave: docking, Dengue, protease, fármacos, Zika, inhibición.

Introducción.

El género Flavivirus perteneciente a la familia Flaviviridae incluye más de 70 virus los cuales son transmitidos por artrópodos. Dentro de este género se encuentran el Dengue, el Zika, y el West Nile Virus. Actualmente, no hay una terapia antiviral aprobada contra la infección del dengue y el tratamiento usualmente es sintomático. El desarrollo de vacunas tetravalentes balanceadas contra los cuatro serotipos de este virus (DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4) es un gran reto debido al fenómeno conocido como amplificación dependiente de anticuerpos. En este proceso se generan anticuerpos incapaces de neutralizar al virus pero que causan que una infección posterior se manifieste de manera más severa (Samrat et al., 2022). Por ello, la búsqueda de fármacos contra estos virus es un reto con prioridad en Latinoamérica (Cattarino et al., 2020).

Los flavivirus son virus de ARN monocatenario positivo que consta de un solo marco de lectura abierto. Este RNA codifica para una poliproteína que después es escindida por las proteasas del hospedero y el complejo NS2B/NS3; el resultado es 3 proteínas estructurales (cápside, envoltura y membrana) y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, y NS5) (Chambers, 1990). Las proteasas de los flavivirus tienen una similitud significativa tanto a nivel estructural como de secuencia (Cruz-Arreola et al., 2022).

El dominio N-terminal de NS3 es una serina proteasa, NS2B es un cofactor que ancla a NS3 a la membrana del retículo endoplásmico y es esencial para activar la unión de NS3 a los sustratos (León-Juárez et al., 2016). El dominio C-terminal de NS3 funciona como helicasa. Los residuos del sitio catalítico son: histidina 51, aspártico 75 y serina 135 (figura 1, (Cruz-Arreola et al., 2022)). Estos residuos son altamente conservados.

En un sistema de cultivo celular se ha observado que los extractos metanólicos de las plantas *Taraxcum officinale* y *Urtica dioica* son capaces de inhibir la replicación del DENV2 (Flores-Ocelotl et al., 2018) y un estudio posterior *in silico* sugirió a la proteasa del dengue como un candidato molecular para la inhibición de los compuestos que forman parte de estos extractos metanólicos (Cruz-Arreola et al., 2022). En ese último estudio se identificaron varios compuestos derivados de quercetinas capaces de unirse a la proteasa del Dengue con afinidad superior a los controles negativos. En este estudio exploramos los productos de diversas plantas mexicanas (Mata et al., 2013) expandiendo el tamizaje previo a compuestos derivados de cumarinas, quercetinas, luteolinas, ácidos cafeicos, cromenos, y lactonas de sesquiterpenos. Esperamos así explorar un espacio químico mayor y otras posibles guías de fármacos.

El trabajo de Cruz-Arreola sugiere que este tipo de tamizaje y, por la naturaleza bioquímica de los compuestos probados, los resultados tendrán que ser modificados para poder ser probables fármacos. Sin embargo, como guías pueden ser útiles para reducir el espacio tridimensional de búsqueda, así como establecer esqueletos novedosos.

Para este propósito usaremos el sistema de docking molecular AutodockFR (Ravindranath et al., 2015) el cual es una modificación y mejora reciente al método de docking por algoritmos genéticos lamarkianos (Morris et al., 1998) que además incluye mejoras a la implementación de flexibilidad del receptor mediante la variación de la conformación de cadenas laterales en el receptor proteico (Morris et al., 2009). Además, permite seleccionar los resultados relevantes usando dos criterios: la afinidad, un criterio común a todos los programas de docking, y la mayor frecuencia (tamaño de cluster). Este criterio permite evaluar y seleccionar resultados representativos para evitar falsos positivos.

Métodos.

Las estructuras de las proteasas fueron obtenidas de la base de datos RCSB (Berman et al., 2000): 3L6P para Dengue serotipo 1 (DENV1), 5YVV para Dengue serotipo 4 (DENV4) y 5YOD para Zika (ZIKV). Las estructuras fueron procesadas en UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004); en el caso único de la estructura 3L6P, se utilizó el programa Modeller (Eswar et al., 2007) para crear dos regiones de dos bucles faltantes en la estructura.

Estos bucles se seleccionaron en función del score de DOPE y visualmente, evitando nudos (Eswar et al., 2007) y seleccionando como suficientes los resultados de DOPE más negativo, RMSD menor y “overlap” mayor.

Los ligandos fueron tomados de un artículo seminal donde se cataloga el uso de la herbolaria mexicana como antidiabéticos (Mata et al., 2013). Los ligandos se dibujaron en MarvinSketch (Marvin versión 21.17.0, ChemAxon (<https://www.chemaxon.com>) y en Avogadro (Hanwell et al., 2012) se llevó a cabo la minimización de energía de las moléculas para obtenerlas en formato mol2 con coordenadas tridimensionales. Este proceso se llevó a cabo con un total de 67 ligandos distintos. Los ligandos generados para este trabajo fueron depositados en un repositorio de GitHub, <https://github.com/leninkelvin/CHEMICAL>. Como controles negativos se usaron 8 co-solutos comunes en las soluciones de cristalización: 2-propanol, acetato, citrato, formato, HEPES, imidazol, fosfato y tris. Las estructuras de los controles se obtuvieron de la base de datos UCSF Zinc (Sterling & Irwin, 2015).

El docking rígido se realizó con AutoDockFR (Ravindranath et al., 2015), el cual es un programa de acoplamiento ligando-proteína. Los receptores y ligandos se procesan con scripts incluidos en ADFR para producir archivos en formato PDBQT (prepare_receptor y prepare_ligand). Las rejillas de docking se prepararon con la interfaz gráfica AGFRGUI (Ravindranath & Sanner, 2016), usando el ligando de la estructura 5YOD como referencia del sitio catalítico. La caja de docking se generó para todas las estructuras con el centro -35, -28, 24 (x, y, z) y con dimensiones 90, 75, 90. Con el fin de hacer este proceso altamente reproducible, todas las proteasas se sobrepusieron a la estructura 5YOD. De esta manera, todas comparten las mismas coordenadas relativas y las rejillas de cada una tendrán la misma ubicación en el espacio. El espaciamiento de la rejilla fue 1.0 angstrom en todos los experimentos.

El archivo del ligando se lee en formato PDBQT y el archivo del receptor en formato trg. El docking se realizó en el Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste (LNS) CentOS con 500 ejecuciones (resultados) por ligando y un máximo de 2.5 millones de evaluaciones.

Para el docking flexible con AutoDockFR se utilizó el ácido benzoico cocrystalizado con la proteasa del virus del Zika como referencia al sitio de unión y se permitieron los cambios conformacionales de los residuos a 3 angstroms del ligando de referencia (*vide supra*). El análisis se realizó seleccionando los mejores resultados con los siguientes criterios: la afinidad más alta y la mayor frecuencia del cluster de resultados. En casos donde el ligando tiene muchos grados de libertad (ie. clusters menores al 10% del número de ejecuciones) sólo se consideraron los primeros 10 clusters para su posterior evaluación. La visualización se realizó con UCSF Chimera.

Resultados.

Las secuencias alineadas de las proteasas de DENV1, DENV4 y ZIKV se muestran en la figura 1, esta secuencia corresponde a la NS3. Excluye a la helicasa y a la proteína NS2B. El alineamiento se realizó desde UCSF Chimera; se muestra que los residuos catalíticos (la triada H, D, S) están conservados, así como algunos residuos alrededor (entre 6 y 8). El residuo D es el único que está flanqueado por residuos no idénticos. Las identidades globales de secuencia son bajas, sin embargo, la estructura cuaternaria (proteínas NS2 y NS3) exhibe estructuras casi idénticas, con RMSDs de 1.2 a 1.4 angstroms (figura 2A a C, medidos usando los carbonos alfa). Un ejemplo de las cajas de docking se muestra en la figura 2D; el tamaño de la caja puede parecer desproporcionado pero ligandos como el peonidin YGM-3 (65 en Chart 4 de (Mata et al., 2013)) son elongados y requieren una caja que los contenga y permita la variación conformacional del ligando durante el docking.

CLUSTAL W ALN saved from UCSF Chimera/MultAlignViewer

```

3L6P    GAHMADLSLEKAAEVSWEEEAEHSGASHNILVEVQDDGTMKIKDEERDDT 50
5YVV    .....
5YOD    .....G 1

3L6P    LGGGGSGGGSGVLDTPSPGIYRILQRGLLGRSQVGVGVFQEGVFHTMW 100
5YVV    .....EGVYRIMQRGSSGKTQVGVGIHMEGVFHTMW 31
5YOD    SGALWDVPAPKEVKKGETTDGVYRVMTRRLLGSTQVGVGVMQEGVFHTMW 51
          *:***:: * * :*****: *****

3L6P    HVTRGAVLMYQGKRLEPSWASVKKDLISYGGGWRFQGSWNAGEEVQVIAV 150
5YVV    HVTRGSVICHETGRLEPSWADVRNDMISYGGGWRLGDKWDKEEDVQVLAI 81
5YOD    HVTKGAALRSGEGRLDPYWGDVKQDLVSYCGPWKLDAAWDGLSEVQLLAV 101
          ***:*.:: **:* *..*::*::** * *:: * : .:***::*

3L6P    EPGKNPKNVQTAPGTFKTPEGEVGAIALDFKPGTSGSPIVNREGKIVGLY 200
5YVV    EPGKNPKHVQTKPGLFKTLTGEIGAVTLDFKPGTSGSPIINKKGKIVGLY 131
5YOD    PPGERAKNIQTLPGIFKTKDGDIGAVALDYPAGTSGSPILDKSGRVIGLY 151
          **:..*::** ** *** *::***::** : .********:::*.::**

3L6P    GNGVVTTSPTYVSAIAQAKASQEGPLPEIEDEVFRK..... 236
5YVV    GNGVVTKSGDYVSAITQAERIGE.PDYEVDEDI FRK..... 180
5YOD    GNGVVIKNGSYVSAITQ GKREEETPVE..... 178
          ***** ..* *****:*.: * *

```

Figura 1. Alineamiento de secuencia las proteasas de Dengue serotipo 1 y 4, y Zika. Las secuencias se extrajeron de los archivos de PDB usados para el docking. Dengue serotipo 1 (PDBID 3L6P), Dengue serotipo 4 (5YVV) y Zika (5YOD), tienen una identidad de 45.7 a 51.69 %. La triada catalítica, H51, D75 y S137, se muestra en letras negritas. El segmento amino de Dengue 1 discrepa de la secuencia depositada en el Uniprot pues fue modificada para la determinación estructural. El código del alineamiento muestra asteriscos para los residuos idénticos, dos puntos para residuos conservados, un punto para residuos distantes y vacío para residuos distintos.

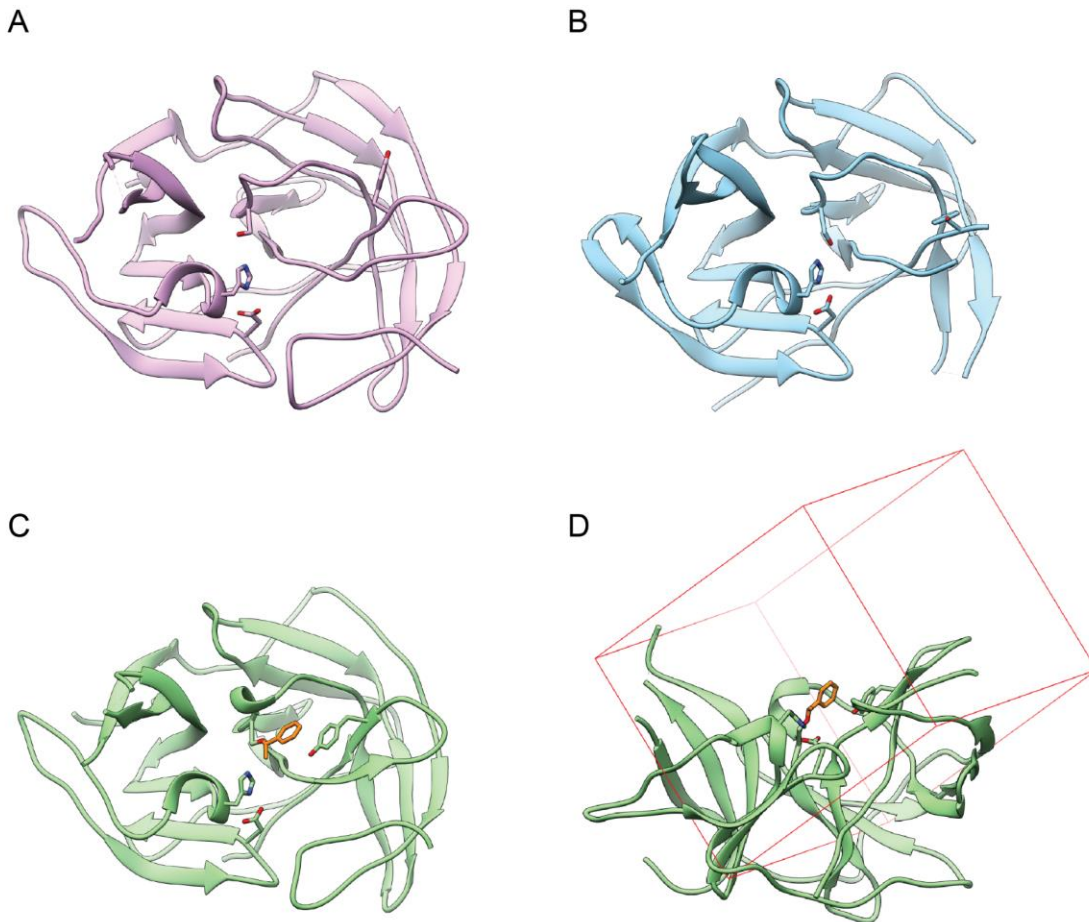


Figura 2. Estructura terciaria y cuaternaria de la proteasa de Dengue. Se muestran las estructuras de los archivos de PDB usados para el docking: dengue serotipo 1 (PDBID 3L6P, A), Dengue serotipo 4 (5YVV, B) y Zika (5YOD, C); un alineamiento estructural muestra RMSDs de 1.2 a 1.4 angstroms. La caja para docking (D), se centró en el ligando (ácido benzóico, en naranja).

La figura 3 muestra los resultados del docking de receptor rígido y receptor flexible. El box plot permite analizar las características generales de los resultados: en la parte superior de la gráfica, más allá de la primera desviación estándar, se encuentran los controles negativos (coprecipitantes de cristalización). La media de los resultados de los tres receptores está alrededor de -7 kcal/mol. Los mejores resultados para los tres receptores se encuentran entre -8.7 a -10 kcal/mol.

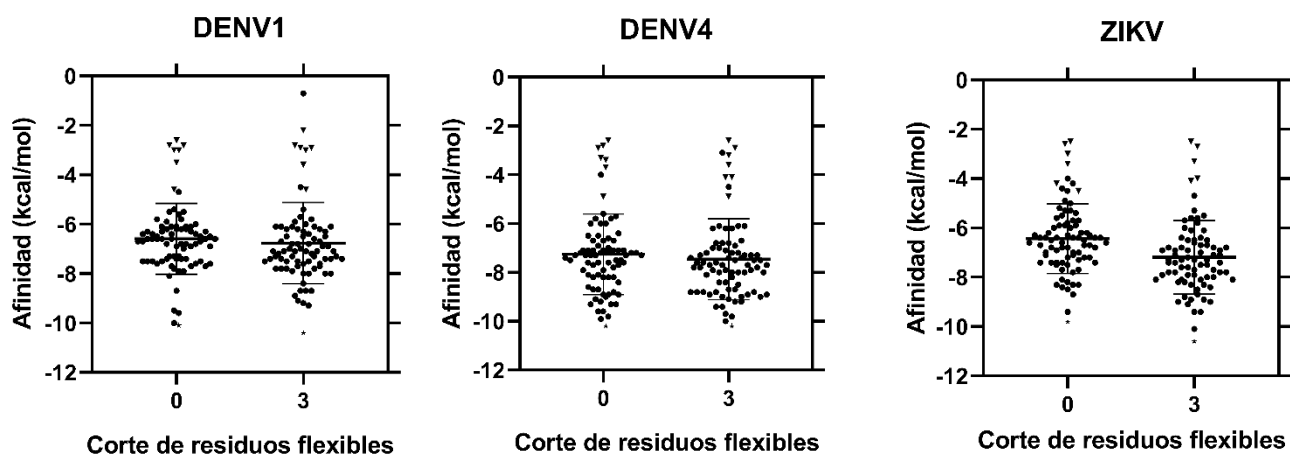


Figura 3. Docking de receptor rígido y con residuos flexibles vs. afinidad (kcal/mol) para DENV1, DENV4 y ZIKV. Las gráficas muestran las mejores afinidades por debajo de la desviación estándar (en forma de estrella), mientras que los controles negativos tienen las afinidades más bajas (en forma de triángulo invertido). Las gráficas se obtuvieron utilizando GraphPad Prism v. 8.

Se revisaron los resultados obtenidos del docking rígido (0) y flexible (3), solo se eligió un resultado de afinidad para cada ligando siendo este el que tuviera el “cluster size” más alto. El “cluster size” puede ser definido como la probabilidad de obtener el mismo resultado de afinidad en 500 experimentos para ese ligando. Se puede observar que los resultados fueron similares para el docking rígido y el flexible (Figura 3). Es decir, el permitir el cambio de la conformación de los residuos a 3 angstroms del ligando no mejora significativamente la afinidad obtenida con el receptor rígido. Sin embargo, debe realizarse la observación de la geometría (Figure 4).

Con los criterios mencionados en los Métodos se observó lo siguiente:

Para DENV1 mejores los resultados son **28, 53, 56, 61, 63, 64**. Para DENV4 son **5, 15, 20, 28, 46, 47, 54, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 63, 64**, y **67**. ZIKV mostró afinidad por los compuestos **54, 55, 58, 61**, y **64**. Tomando esta energía de interacción, se catalogaron los mejores resultados buscando ligandos individuales o familias de ligandos con alta afinidad y frecuencia en los tres receptores. La racional tras esta decisión es que ya se ha explorado la afinidad de las quercetinas y luteolinas por los diferentes serotipos de Dengue, es decir, en el presente estudio buscamos ligandos de una familia química distinta con potencial de ser guía de fármacos.

Los ligandos con estas características fueron **61, 64**. Estos son representantes del grupo formado por **58 y 61 a 64**, los cuales contienen un esqueleto de momordicosido y una glicosilación de alopiranososa o glicopiranososa, respectivamente (Tabla 1). El ligando 56 es un resultado interesante, pero tiene un parecido mayor con los ciclopentanoperhidrofenantrenos asociados al colesterol. Por ello no lo consideramos dentro de nuestros resultados. Por otro lado, la familia del compuesto **58 al 64** contienen un anillo éter extra que lo diferencia. En la Tabla 2 se muestran los porcentajes (cuando el 100 % son las 500 ejecuciones) de resultados con la mayor afinidad, como se describe en Métodos.

La Tabla 1 muestra que los ligandos **61, 63, y 64** tienen buenas afinidades en docking rígido que en ocasiones mejoran al usar docking flexible. Esto es alentador pues, en particular para la proteasa de Zika, donde la afinidad sube de -8.4 a -9.4 para el compuesto **63** y -8.7 a -10.6 para el compuesto **64**. En la Tabla 2 se puede apreciar una frecuencia baja de algunos resultados. Por ejemplo, el 42% del compuesto **61** en docking rígido contra DENV4 es un valor ideal. En el docking flexible este porcentaje baja a 11.8%. Estas frecuencias bajas reflejan la complejidad de los compuestos usados como ligandos. Es posible que se deba principalmente a los sustituyentes glucosídicos que presentan muchos grados de libertad en sus enlaces glicosídicos y los hidroxilos que contienen.

Un caso extremo es el del compuesto **64**, que tuvo una frecuencia de 15.6% a 4.4 % entre docking rígido a docking flexible, respectivamente.

Ligando	Clase	DENV1 0	DENV1 3	DENV4 0	DENV4 3	ZIKV 0	ZIKV 3
13	Fenilcumarina					-8.1	
15	Fenilcumarina			-9.3	-9.4		-9.4
17	Fenilcumarina					-8.3	
18	Fenilcumarina					-8.3	-8.9
19	Fenilcumarina			-10.2			
20	Fenilcumarina			-9.9			-9
21	Fenilcumarina						-8.9
24	Ácido ursólico				-9.7		
4	Cucurbitacina			-9.6			
55	Cucurbitano		-8.7				-8.8
56	<i>Estigmasterol</i>	-9.5	-9.2		-9.8	-8.5	-9.1
58	Cucurbitano					-9.8	-10.1
5	Cucurbitacina			-9.2			
60	Estigmasterol		-8.7	-9.2			
61	<i>Cucurbitano</i>	-9.3	-9.1	-9.3	-10.2	-9.4	-9
63	<i>Cucurbitano</i>	-10	-9.3	-9.3	-9.1	-8.4	-9.4
64	<i>Cucurbitano</i>	-10.1	-10.4	-9.8	-9.7	-8.7	-10.6
6	Cucurbitacina					-8.3	

Tabla 1. Comparación de afinidades. Se comparan los resultados de docking rígido y flexible de los ligandos con las afinidades únicamente por debajo de la desviación estándar. La abreviación del virus (DENV1, DENV4 y ZIKV) se usa con un número:

0 (docking rígido) o 3 (docking flexible). Las celdas se dejaron vacías cuando la afinidad obtenida por docking fue peor que -8.2 kcal/mol.

Ligando	Clase	DENV1 0	DENV1 3	DENV4 0	DENV4 3	ZIKV 0	ZIKV 3
13	Fenilcumarina					74.80%	
15	Fenilcumarina			65.20%	23.80%		23.60%
17	Fenilcumarina					84.00%	
18	Fenilcumarina					74.40%	8.80%
19	Fenilcumarina			9.60%			
20	Fenilcumarina			9.80%			7.00%
21	Fenilcumarina						8.60%
24	Ácido ursólico				57.40%		
4	Cucurbitacina			36.40%			
55	Cucurbitano		3.80%				2.20%
56	<i>Estigmasterol</i>	15.00%	14.60%		26.40%	12.20%	11.00%
58	Cucurbitano					35.00%	8.80%
5	Cucurbitacina			23.20%			
60	Estigmasterol		17.60%	23.20%			
61	<i>Cucurbitano</i>	11.14%	13.00%	42.00%	11.80%	25.60%	13.20%
63	<i>Cucurbitano</i>	16.80%	10.40%	9.60%	6%	10.60%	11.20%
64	<i>Cucurbitano</i>	30.00%	25.60%	15.60%	4.4%	10.00%	6.40%
6	Cucurbitacina					20.60%	

Tabla 2. Comparación de tamaño de cluster. Se comparan las probabilidades de obtener la afinidad mostrada en la tabla 1 para cada ligando en docking rígido y flexible. La abreviación del virus (DENV1, DENV4 y ZIKV) se usa con un número:

0 (docking rígido) o 3 (docking flexible). Al igual que en la Tabla 1, las celdas se dejaron vacías cuando la afinidad obtenida por docking fue peor que -8.2 kcal/mol.

La geometría de los resultados de docking se muestran en la Figura 4 centrándose en el compuesto **64**. Al observar el resultado de la Tabla 1 en el receptor rígido se aprecia que el compuesto se ubica en el sitio catalítico, cerca de la triada catalítica (Figura 4A). El glucósido está orientado hacia la Y161, residuo importante para la unión de los sustratos naturales. Esto se observa de manera similar en el docking rígido contra DENV4 (Figura 4C) pero es distinto para ZIKV. En este último caso, es el extremo alifático del compuesto **64** el cual se orienta en el sitio catalítico (Figure 4E). El docking flexible tiene muy diversos efectos sobre los resultados, además de los ilustrados en la Tabla 2. Para el DENV1, no se apreció ningún cambio (Figura 4B). En DEV4, el docking flexible cambia la orientación del ligando 180 grados, orientando el glucósido al extremo opuesto de la proteasa (Figure 4D); en ZIKV, el glucósido se inserta entre los residuos catalíticos H51 y D75. La flexibilidad en el docking mostrado en la Figura 4B, D, y F desplazó de manera mínima (<20 grados) a la H51 y D75 catalítica pero no a la S135. La afinidad se mejora en el docking flexible (Tabla 1) para DENV1 y ZIKV. Es posible que se hayan alcanzado los límites de cambio de conformación que se pueden explorar con estos métodos.

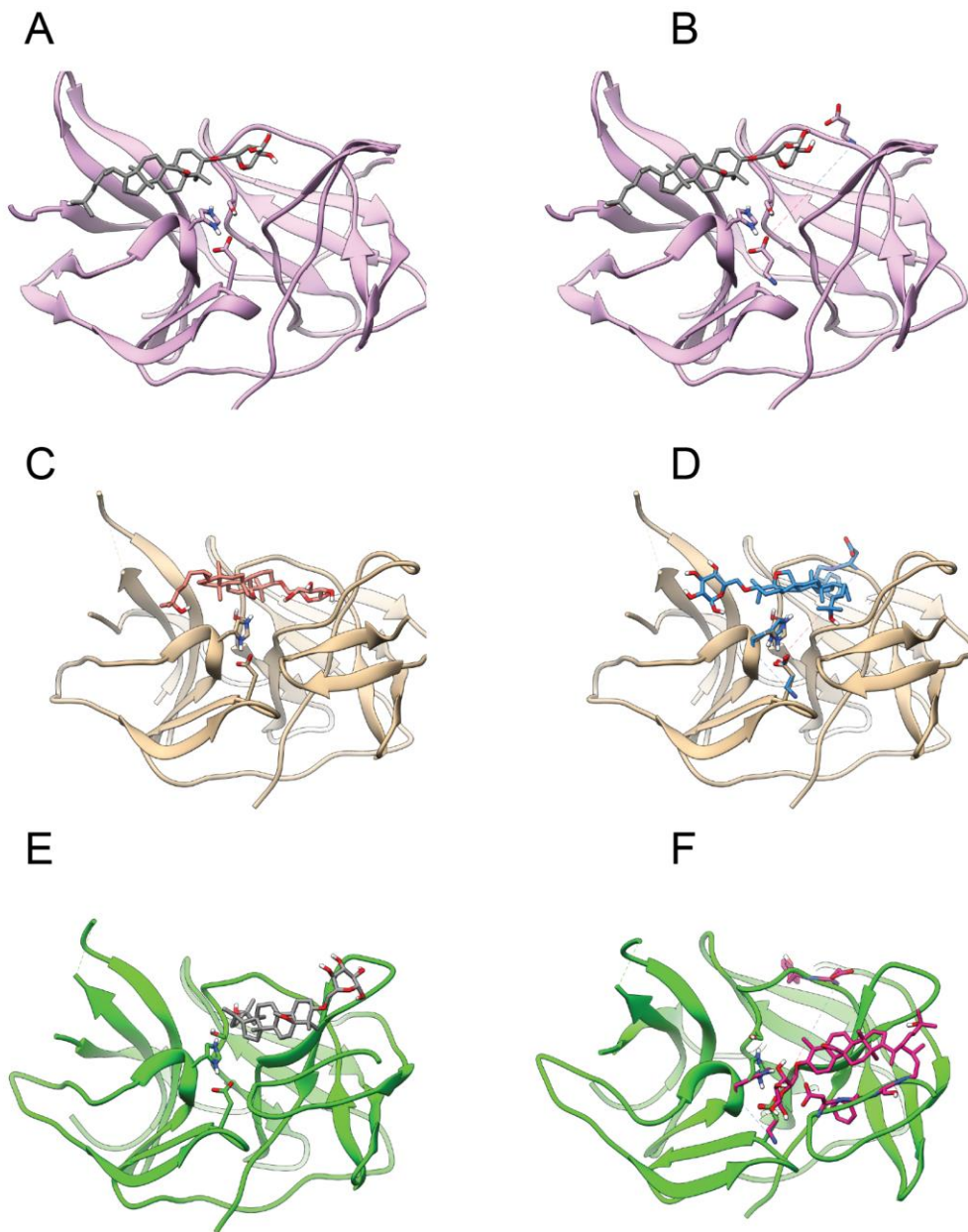


Figura 4. Visualización de la geometría de los resultados de docking. Los resultados ilustrados muestran a las proteasas de DENV1 (A y B), DENV4 (C y D) y, ZIKV (E y F) con el compuesto 64. A, C, y E muestran los resultados de docking rígido mientras que B, D, y F muestran resultados de docking flexible.

Conclusiones.

En el contexto de la salud actual, el desarrollo de tratamientos contra el Dengue, y otros padecimientos causados por Flavivirus es una prioridad de la investigación científica. México posee numerosas especies de plantas de las cuales se han obtenido extractos que se han usado tradicionalmente para tratar la diabetes. En el presente estudio utilizamos una base de datos de estos compuestos que convertimos a estructuras tridimensionales, y realizamos docking contra las proteasas de serina del Dengue serotipos 1 y 4 así como de Zika. Los resultados muestran que el docking con ADFR identificaron compuestos derivados glicosilados del curcubitano como candidatos de guía de fármacos. Estos compuestos son químicamente semejantes al colesterol, pero tienen un anillo éter extra. En nuestras manos, estos compuestos tienen alta afinidad en docking rígido y en docking flexible. Esto da mayor certidumbre a los resultados. Sin embargo, hay cierta ambigüedad en la posición del ligando relativo al sitio catalítico. Estudios posteriores deberán hacer uso de métodos de dinámica molecular que permitan evaluar más finamente la energía de interacción y si la interacción es estable en el tiempo.

Vale la pena remarcar que estos compuestos deben ser considerados guías de fármacos. Si uno considera el blanco por el que fueron seleccionados en el trabajo de Rachel Mata (Mata et al., 2013), el alfa-glucosidasa, estos compuestos actuarían en el lumen del intestino. Es decir, no es necesario que se absorban al torrente sanguíneo. Este no es el caso para los tratamientos del Dengue, el cual requerirá un compuesto que se absorba al torrente sanguíneo y esté biodisponible. Los curcubitanos son moléculas hidrófobas que se tendrían que modificar para absorberse efectivamente. Aun así, son buenos puntos de partida.

Agradecimientos.

El presente trabajo de investigación se realizó gracias a:

Las facilidades prestadas por el Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México (LNS) y el laboratorio de cómputo CN-208 del departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad de las Américas Puebla.

Referencias.

- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242.
- Cattarino, L., Rodriguez-Barraquer, I., Imai, N., Cummings, D. A. T. & Ferguson, N. M. (2020). Mapping global variation in dengue transmission intensity. *Science Translational Medicine*, 12(528).
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aax4144>
- Chambers, T. (1990). Flavivirus Genome Organization, Expression, And Replication. *Annual Review of Microbiology*, 44(1), 649–688. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.44.1.649>
- Cruz-Arreola, O., Orduña-Díaz, A., Domínguez, F., Reyes-Leyva, J., Vallejo-Ruiz, V., Domínguez-Ramírez, L. & Santos-López, G. (2022). In silico testing of flavonoids as potential inhibitors of protease and helicase domains of dengue and Zika viruses. *PeerJ*, 10, e13650. <https://doi.org/10.7717/peerj.13650>
- Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen, M.-Y., Pieper, U. & Sali, A. (2007). Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Current Protocols in Protein Science / Editorial Board, John E Coligan [et Al], Chapter 2*, Unit 2.9-2.9.31.
<https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0209s50>
- Flores-Ocelotl, M. R., Rosas-Murrieta, N. H., Moreno, D. A., Vallejo-Ruiz, V., Reyes-Leyva, J., Domínguez, F. & Santos-López, G. (2018). Taraxacum officinale and Urtica dioica extracts inhibit dengue virus serotype 2 replication in vitro. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 95.
<https://doi.org/10.1186/s12906-018-2163-3>

Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E. & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 4(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>

León-Juárez, M., Martínez-Castillo, M., Shrivastava, G., García-Cordero, J., Villegas-Sepulveda, N., Mondragón-Castelán, M., Mondragón-Flores, R. & Cedillo-Barrón, L. (2016). Recombinant Dengue virus protein NS2B alters membrane permeability in different membrane models. *Virology Journal*, 13(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0456-4>

Mata, R., Cristians, S., Escandón-Rivera, S., Juárez-Reyes, K. & Rivero-Cruz, I. (2013). Mexican antidiabetic herbs: valuable sources of inhibitors of α -glucosidases. *Journal of Natural Products*, 76(3), 468–483. <https://doi.org/10.1021/np300869g>

Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K. & Olson, A. J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, 19(14), 1639–1662. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-987x\(19981115\)19:14<1639::aid-jcc10>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-987x(19981115)19:14<1639::aid-jcc10>3.0.co;2-b)

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>

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>

Ravindranath, P. A., Forli, S., Goodsell, D. S., Olson, A. J. & Sanner, M. F. (2015). AutoDockFR: Advances in Protein-Ligand Docking with Explicitly Specified Binding Site Flexibility. *PLoS Computational Biology*, 11(12), e1004586. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004586>

Ravindranath, P. A. & Sanner, M. F. (2016). AutoSite: an automated approach for pseudo-ligands prediction-from ligand-binding sites identification to predicting key ligand atoms. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 32(20), 3142–3149. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw367>

Samrat, S. K., Xu, J., Li, Z., Zhou, J. & Li, H. (2022). Antiviral Agents against Flavivirus Protease: Prospect and Future Direction. *Pathogens*, *11*(3), 293. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030293>

Sterling, T. & Irwin, J. J. (2015). ZINC 15--Ligand Discovery for Everyone. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *55*(11), 2324–2337. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00559>

Trott, O. & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, *31*(2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>