



Análisis de los sitios de unión de la ivermectina en la estructura de importinas α humanas

Analysis of ivermectin binding sites in the structure of human importins α

Elvio Gayozo^{1a}, Laura Rojas Aguadé^{2b}, Julio Barrios Leiva^{3c}

Recibido el
12 de diciembre de 2023
Aceptado
22 de mayo de 2024

¹Universidad Nacional de Asunción,
Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales, Departamento de Biología,
San Lorenzo, Paraguay.

²Universidad Nacional de Asunción,
Facultad de Ciencias Químicas,
Departamento de Microbiología
Industrial, San Lorenzo, Paraguay.

³Universidad Nacional de Asunción,
Facultad de Ciencias Exactas
y Naturales, Departamento de
Biotecnología, San Lorenzo, Paraguay.

^aMSc. en Ciencias en Biotecnología,
Licenciado en Ciencias Mención
Biología, Universidad Nacional de
Asunción.

<https://orcid.org/0000-0001-9309-7056>

^bMSc. en Biotecnología Industrial,
Ingeniera Química, Universidad
Nacional de Asunción.

<https://orcid.org/0000-0002-8341-7746>
mlrojasaguade@gmail.com

^cMSc. en Biomedicina, Licenciado
en Ciencias Mención Biología,
Universidad Nacional de Asunción.

<https://orcid.org/0000-0003-4120-4141>
biojulio@gmail.com

*Correspondencia:
Elvio Gayozo
Correo electrónico:
elviologo@gmail.com

Doi:
<https://doi.org/10.47993/gmb.v47i1.791>

Resumen

La ivermectina demostró importantes acciones antivirales ante varios virus con genoma de ARN, inclusive contra el SARS-CoV-2. Este fármaco inhibe la actividad del heterodímero importina $\alpha/\beta 1$, sin embargo, se desconoce los blancos específicos de interacción de la molécula. **Objetivos:** analizar *in silico* los blancos de interacción de la ivermectina en interacción con la estructura de la importina α humana, utilizando la estrategia del acoplamiento molecular. **Métodos:** se realizaron simulaciones del acoplamiento utilizando un modelo semiflexible y el algoritmo Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno entre las estructuras de ivermectina y la importina α . **Resultados:** los datos obtenidos revelan una mayor afinidad de interacción de la ivermectina a la región mayor de unión (armadillo ARM2-ARM4) de las importinas α humanas, con energías de unión favorables de -9,5 a -8,0 kcal.mol⁻¹. Los aminoácidos activos de importancia en las uniones fueron el Triptófano, Asparagina y Arginina, los cuales también son fundamentales para el reconocimiento de secuencias NLS (secuencias de localización nuclear) de las proteínas virales. También se registró afinidades por los dominios H1-ARM5, H2-ARM6 y H2-ARM7, con energía de unión de -7,5 kcal.mol⁻¹. **Conclusiones:** los hallazgos demuestran que la ivermectina presenta afinidades de unión favorables a la región mayor de unión (ARM2-ARM4) de las importinas α el cual es un sitio importante de unión a proteínas virales.

Palabras claves: antiparasitario, biología computacional, carioferinas, dominio proteico.

Abstract

Ivermectin has demonstrated significant antiviral actions against several RNA-genome viruses, including SARS-CoV-2. This drug inhibits the activity of the $\alpha/\beta 1$ importin heterodimer; however, the specific interaction targets of the molecule are unknown yet. **Objectives:** to analyze *in silico* the interaction targets of ivermectin interacting with the human α -importin structure using the molecular docking strategy. **Methods:** simulations of the molecular docking were carried out using a semi-flexible model and the Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno algorithm between the structures of ivermectin and importin α . **Results:** data obtained reveal a higher interaction affinity of ivermectin to the major binding region (armadillo ARM2-ARM4) of human importins α , with favorable binding energies of -9.5 to -8.0 kcal.mol⁻¹. The active amino acids of importance in the bindings were Tryptophan, Asparagine and Arginine, which are also critical for the recognition of NLS sequences (nuclear location sequences) of viral proteins. Affinities for H1-ARM5, H2-ARM6 and H2-ARM7 domains were also recorded, with binding energy of -7.5 kcal.mol⁻¹. **Conclusions:** the findings demonstrate that ivermectin exhibits favorable binding affinities to the major binding region (ARM2-ARM4) of importins α which is an important viral protein binding site.

Keywords: antiparasitic agents, computational biology, karyopherins, protein domains.

Muchos virus de ARN pertenecientes principalmente a las familias Flaviviridae, Coronaviridae, Arteriviridae y Paramyxoviridae, entre los que podemos citar los virus del Dengue (DENV), virus de la encefalitis japones (JEV), virus Nilo Occidental, virus Hepatitis C, virus gastroenteritis transmisible (TGEV), SARS-CoV, virus infecciosa de la bronquitis y virus respiratorio sincitial, en su mayoría con ciclos replicativos predominantemente citoplasmáticos, sin embargo presentan también una etapa en la que se realiza el transporte de material proteico viral al nucleoplasma celular para bloquear la respuesta antiviral del hospedero^{1,2}. La mayoría de estos virus emplean esta vía de translocación de manera directa, sin embargo, el virus SARS-CoV también es capaz de interactuar de forma indirecta con esta vía de translocación proteica por acción de la proteína viral 6 (ORF-6), la cual interactúa específicamente con las importinas α que se unen a su vez a las importinas $\beta 1$, disminuyendo de esta manera su disponibilidad citoplasmática, promoviendo así de forma eficiente al bloqueo de las respuestas antivirales de las células hospederas, es importante destacar que el virus SARS-CoV-2, también sintetiza dicha proteína, por lo que podrían compartir el mismo mecanismo de acción³⁻⁸.

El tráfico de material proteico dentro del núcleo celular es mediada principalmente por las importinas α y las importinas $\beta 1$, también denominadas como carioferinas, estas proteínas junto con la proteína a ser transportada (carga), conforman el complejo importina $\alpha/\beta 1$ -carga, donde las importinas α son las encargadas de reconocer una secuencia específica de residuos

conocida como secuencias NLS (Señal de Localización Nuclear), que se encuentra en las proteínas que poseen como destino final el núcleo, donde cumplirán con sus funciones. Dentro de la estructura de las importinas α se identificaron dos sitios posibles de interacción, un sitio mayor de unión y un sitio menor de unión^{9,10}. A su vez, las importinas β 1, poseen la función de reconocer y unirse al complejo formado importina α -carga, también es la encargada de interaccionar el complejo del nucleoporo al momento del ingreso al núcleo celular¹⁰. Debido a la importancia que representa esta vía de translocación proteica a estos virus, en los últimos años los investigadores han puesto la vista en ella con la finalidad de hallar moléculas que puedan intervenir o bloquear el proceso de translocación y de esta manera disminuir el éxito de replicación viral^{11,12}.

Estudios *in vitro* recientes han demostrado que la ivermectina, un conocido fármaco con acciones antiparasitarias, posee también actividades antivirales ante infecciones con los virus de la Chikungunya (CHIKV), virus de la influenza, virus del dengue (DENV), virus del Zika (ZIKV), virus de HIV-1 y el virus del Nilo Occidental¹²⁻¹⁵. Caly y colaboradores en el año 2020¹⁶, demostraron que la ivermectina también presenta actividades antivirales *in vitro* ante el SARS-CoV-2, los autores sugieren un bloqueo del tráfico nucleoplasma-citoplasma de proteínas virales. Azam y colaboradores en el año 2020¹⁷, mediante análisis computacionales describen que la molécula de ivermectina presenta afinidades de interacción con la región mayor de unión de la carioferina α de *Mus musculus*. Yang y colaboradores (2020)¹², expusieron que las moléculas de ivermectina interaccionan con los dominios ARM (armadillo) de la importina α , evitando de esta manera la formación del complejo importina α/β 1, también se registraron interacciones con el heterodímero de la importina α/β , promoviendo su disociación, sin embargo, se desconoce los sitios de mayor afinidad y de mayor probabilidad de interacción de la ivermectina en las importinas α humanas.

En este estudio, realizamos el análisis de los sitios de unión de la ivermectina en la estructura de la importina α humana (*Homo sapiens*), determinando los aminoácidos activos y las interacciones intermoleculares presentes en los complejos resultantes según las propiedades biofísicas y bioquímicas de las moléculas evaluadas.

Materiales y métodos

Simulaciones de acoplamiento molecular

La importina α humana (PDB: 4WV6) se obtuvo de Protein Data Bank¹⁸, se procedió a eliminar estructuras químicas que no sean propia de la importina (moléculas de agua y otros péptidos unidos), para ello se empleó el programa Discovery Studio Visualizer v. 20¹⁹.

El archivo de la estructura molecular de la ivermectina (CID: 6321424) se obtuvo de PubChem²⁰. Se aplicaron campos de fuerza MMFF94 (Merck Molecular Force Field) con un paso total de 200, y el algoritmo de optimización de gradientes conjugados con una convergencia energética de $0,001 \text{ kcal.mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-1}$, para ello se empleó el programa Avogadro²¹.

Los archivos fueron transformados al formato PDBQT y se agregaron cargas considerando átomos de hidrógeno (H) presentes empleando para ello el programa UCSF Chimera 1,17²². Las pruebas de acoplamiento del tipo proteína-ligando (molécula pequeña) entre la importina α y la ivermectina fueron realizadas generando una grilla de acoplamiento de $47 \times 77 \times 81 \text{ \AA}^3$, utilizando para ello los programas PyRx²³ y Autodock Vina²⁴.

La visualización de los complejos resultantes, así como la determinación y la caracterización del sitio de unión, identificación de residuos activos en la importina α y las fuerzas de interacciones involucradas en la estabilización de la estructura, todo esto se llevó a cabo con Discovery Studio Visualizer v. 20¹⁹.

Resultados

La estructura de las importinas α se encuentra conformado por varios dominios proteicos funcionales, en el dominio N-Terminal se encuentran la región de unión a las importinas β y también el segmento de autoinhibición. En la mayor parte de la estructura se encuentran los dominios armadillo (ARM), agrupados en diez dominios ARM, los cuales a su vez cada uno se conforma por tres α -hélices (H1, H2 y H3) donde por regla general, las hélices H1 y H2 son de menor longitud y la H3 de mayor longitud, el dominio ARM1 carece de la hélice H1 y el dominio ARM5 posee las hélices H1 y H2 fusionados por lo que se observa un dominio del tipo HEAT en dicho dominio²⁵ (Figura 1.A,B).

Las simulaciones de acoplamiento evidenciaron la formación de cuatro modelos de complejos con energías de unión favorables comprendidos en $-9,5$ a $-7,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (Figura 1.C-F).

El primer complejo formado presentó el menor valor de energía libre de acoplamiento $-9,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$, donde la ivermectina demostró afinidades de interacción a los dominios ARM2-ARM4 (Figura 1.C). Los aminoácidos activos fueron la Asn 146, Trp 142, Asn 235, Trp 231, Trp 184 y Arg 227. Se detectaron puentes de hidrógeno entre la ivermectina y la Asn 146, Trp 142, Asn 235 y Trp 231 con distancias entre ligando y receptor de $4,28 \text{ \AA}$, $5,19 \text{ \AA}$ y $5,15 \text{ \AA}$ respectivamente.

También se registraron interacciones de orbitales Pi y Sigma con los residuos Trp 184, Trp 142 y Trp 231 con distancias de $4,90 \text{ \AA}$, $4,59 \text{ \AA}$ y $4,19 \text{ \AA}$, respectivamente, interacciones entre grupos alquilo con el residuo Arg 227 con distancia de $4,35 \text{ \AA}$, e interacciones de orbitales Pi y grupo alquilo del residuo Trp 231 con distancia de $5,61 \text{ \AA}$. El bolsillo de unión se encuentra conformado por los residuos Gln 181, Thr 145, Asn 188, Ser 149, Arg 238, Tyr 277, Gly 181, Asp 270, Glu 266, Gly 224, Asn 228, Glu 107 y Ser 105 que interaccionan con el ligando mediante fuerzas de van der Waals (Figura 2.A, Tabla 1).

El segundo complejo reveló con un valor de energía libre de unión de $-8,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$, donde la ivermectina presenta

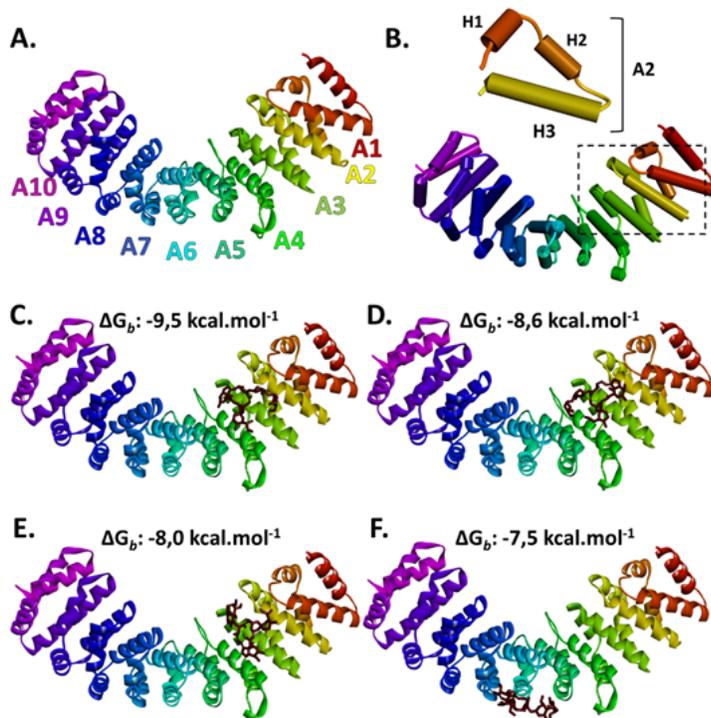


Figura 1. A. Representación de la estructura de las importinas α . A: ARM. B. Composición estructural de los dominios repetitivos ARM. H: α -Hélice. C-F. Modelos de acoplamiento importina α :ivermectina con energía de unión favorables. C. Modelo 1. D. Modelo 2. E. Modelo 3. F. Modelo 4. ΔG_b : Energía libre de unión.

afinidades por los dominios ARM2-ARM5 (Figura 1.D). Los aminoácidos activos fueron el Trp 184, Ser 149 y Trp 231. Se registró puentes de hidrógeno entre la ivermectina y el Trp 184, con una distancia de 5,35 Å.

También se pudo identificar interacciones de orbitales Pi-Sigma con el Trp 231, exhibiendo 4,69 Å de distancia, e interacciones de orbitales Pi y grupos alquilo del Trp 184, con una distancia de 6,62 Å entre ellos. El sitio bolsillo de unión del complejo se encuentra conformado por los residuos Asn 228, Arg 227, Asn 235, Asp 270, Arg 238, Tyr 277, Ser 234, Trp 273, Ser 149, Asn 188, Glu 107, Asn 146 y Ser 105, los cuales interactúan mediante uniones de van der Waals (Figura 2.B, Tabla 1).

El tercer modelo de complejo formado reveló un aumento en el valor de energía libre de unión igual a $-8,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$, donde la ivermectina se sitúa en los dominios ARM2-ARM4 (Figura 1.E). Los residuos activos fueron la Ser 149 y la Gly 150, con los cuales solo se detectaron la formación de puentes de hidrógeno con distancias de 4,49 Å y 3,31 Å, respectivamente. El sitio bolsillo de unión se encuentra conformado por los residuos Trp 231, Asn 228, Arg 227, Gly 224, Trp 184, Asn 188, Asn 235, Gly 191, Asn 146, Arg 106, Thr 155, Ala 148, Asp 192, Leu 104 y Pro 110 interactuando con la ivermectina mediante fuerzas de van der Waals (Figura 5.C, Tabla 1).

El cuarto modelo obtenido de las pruebas presenta un aumento mayor en la energía de unión con valor de $-7,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$, demostrando afinidades por los dominios ARM5-ARM7, donde la molécula se encuentra orientada hacia las α -hélices H1 del dominio ARM5, y las α -hélice H2 de los dominios ARM6 y ARM7 (Figura 1.F).

Los aminoácidos activos fueron la Lys 300 y la Gly 303. Se registró puentes de hidrógeno con la Lys 300 y la Gly 303, con distancias de 6,27 Å y 3,44 Å, respectivamente. También se detectaron interacciones no convencionales de carbono-hidrógeno con la Lys 300, donde un átomo de carbono unido a un átomo de hidrógeno presenta carga parcial positiva y el hidrógeno es capaz de interactuar el átomo de oxígeno adyacente de la ivermectina, la distancia con el ligando fue de 5,06 Å. Uniones hidrofóbicas también se observaron entre grupo alquilo de la ivermectina y la Lys 300, registrándose 5,60 Å de distancia.

Es importante destacar que se evidenciaron interacciones no favorables con la Gln 297 entre grupos químicos donadores de hidrógeno en puentes de hidrógeno, evidenciándose entre ellos una distancia de 5,34 Å. Los residuos que se encuentran interactuando mediante

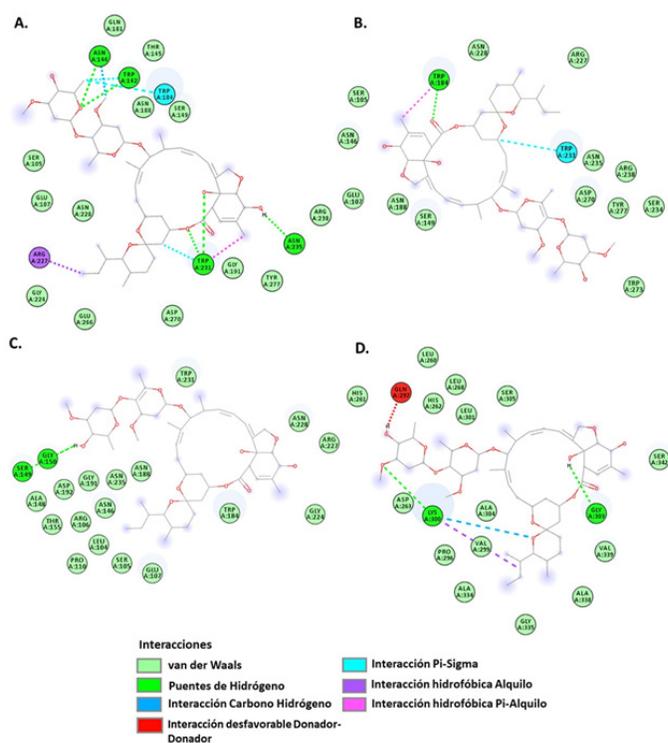


Figura 2. Representación bidimensional del sitio de acoplamiento de la ivermectina en la estructura de la importina α . A. Modelo 1. B. Modelo 2. C. Modelo 3. D. Modelo 4.

Tabla 1. Aminoácidos activos identificados en los modelos y longitud de interacciones (Angstrom, Å).

Modelos	Puentes de hidrógeno	Interacción Pi-Sigma	Interacción Alquilo-Alquilo	Interacción Pi-Alquilo
Complejo 1	Asn 146 (4,28)			
	Trp 142 (5,19)	Trp 184 (4,90)		
	Asn 235 (4,07)	Trp 142 (4,59)	Arg 227 (4,35)	Trp 231 (5,61)
	Trp 231 (5,55)	Trp 231 (4,19)		
	Trp 231 (5,15)			
Complejo 2	Trp 184 (5,35)	Trp 231 (4,69)	–	Trp 184 (6,62)
Complejo 3	Ser 149 (4,49)	–	–	–
	Gly 150 (3,31)			
	Lys 300 (6,27)			
Complejo 4	Gly 303 (3,44)	–	Lys 300 (5,60)	–
	Lys 300 (5,06)*			

*Interacciones de carbono-hidrógeno no convencionales.

interacciones de van der Waals son la His 261, Leu 260, His 262, Leu 301, Ser 305, Ser 342, Val 339, Ala 338, Gly 335, Ala 334, Pro 296, Val 299, Ala 304 y Asp 263 (Figura 2.D, Tabla 1).

Discusión

Desde mediados del año 2012, varios investigadores han reportado pruebas en las que se demuestra que la ivermectina presenta efectos antivirales *in vitro* contra virus como VIH-1, DENV, Virus Chikungunya (CHIKV) y otros flavivirus, los mismos sugirieron como posible blanco de acción de la ivermectina al complejo proteico importina $\alpha/\beta 1$ y por ende la vía en la que está implicada el complejo^{14,15,26,27}.

Recientemente, Yang y colaboradores (2020)¹² en un estudio realizado con moléculas de importinas α e importinas $\beta 1$ de *Mus musculus*, expresadas en sistemas *in vitro* y expuestas a moléculas de ivermectina, han revelado que la misma posee la capacidad de interactuar con el complejo proteico importina $\alpha/\beta 1$, ocasionando la disociación de la mismas en cada uno de sus componentes, también los autores describen la capacidad que posee la ivermectina de evitar la formación del complejo importina $\alpha/\beta 1$, mediante la interacción de esta molécula con la importina α , demostrando efectos sobre la termoestabilidad y en la α -helicidad de estas proteínas.

Los datos obtenidos evidenciaron modelos de unión entre la ivermectina y las importinas α humanas con valores de energía libre de unión de entre -9,5 a -7,5 kcal.mol⁻¹ (Figura 1). A su vez, el análisis computacional llevado a cabo por Azam y colaboradores (2020)¹⁷, empleando la estructura de la importina de la especie *Mus musculus* y la ivermectina, registraron valores de energía de acoplamiento de entre -6,90 kcal.mol⁻¹ y -16,02 kcal.mol⁻¹, empleando diferentes algoritmos para dicha estimación, es importante destacar que estos valores son menores a los reportado en este estudio, por lo que esta interacción se da de manera más favorable en estas importinas de ratones.

Azam y colaboradores (2020)¹⁷ también describieron la participación activa de residuos de Trp 184, Arg 227, Trp 231, Ser 149, Asn 228, Trp 231 y Arg 238 de la importina α , los cuales son importantes para los puentes de hidrógeno y uniones hidrofóbicas con la ivermectina. Los resultados reportados en esta investigación también evidenciaron al Trp 184, Trp 231 y Arg 227 como residuos activos en el modelo del Complejo 1, demostrándose una marcada afinidad por la región mayor de unión (ARM2-ARM4) (10,25) (Figura 2, Tabla 1).

Es importante resaltar también que, en ambos casos, los complejos del tipo receptor-ligando formados con la importina α y la ivermectina, presentaron en común la participación de residuos de Triptófano (Trp) y Asparagina (Asn) que son sumamente importantes para la identificación de secuencias NLS presentes en el proteoma viral¹⁰. Además, se registró afinidades por regiones no activas (α -hélices H1 y H2) del sitio menor de unión de las importinas α (ARM5-ARM7), lo cual podrían favorecer a la inestabilidad de las uniones proteínas virales y heterodímeros, importina $\alpha/\beta 1$ promoviendo la disociación^{10,12,25}.

La inhibición reportada por la interacción de la ivermectina con las importinas $\alpha/\beta 1$, además de afectar la estabilidad del complejo, ocasiona un bloqueo directo del ingreso de las proteínas virales al interior del núcleo, esto se ha visto con la proteína NS5 del virus serotipos Dengue 1 y 2 (DENV-1, DENV-2), proteínas de la cápside del virus de la encefalitis equina venezolana, las integrasas del VIH-1, así como proteínas no estructurales 3 NS3 (helicadas) de flavivirus^{13,15,28,29}. También se ha registrado que

la molécula de ivermectina, es capaz de inhibir el ingreso de la polimerasa viral UL42 de la Pseudorrabia virus (PRV) e inclusive la ADN polimerasa del virus del Herpes Bovino 1 (BoHV-1), todo esto mediante el bloqueo del tráfico nucleocitoplasmático^{30,31}.

La ivermectina, además de poseer como blanco de interacción el heterodímero importina $\alpha/\beta 1$, se ha reportado la capacidad de interacción a proteínas de virus. Azam y colaboradores (2020)¹⁷, hacen mención a la proteína no estructural 9 (Nsp9) del SARS-CoV-2, con la cual se registró una marcada estabilidad de unión. En otro estudio también se ha reportado la interacción de la ivermectina con la polimerasa RdRP del SARS-CoV-2, con la cual se registraron energías de $(-9,2 \text{ kcal.mol}^{-1})$ ³².

En otra investigación se ha revelado de que la molécula de ivermectina presenta afinidades de unión a la estructura proteica de la espiga (S) de SARS-CoV-2, perfilando un potencial de interferencia del reconocimiento entre la proteína viral S y la proteína ACE2 humana³³.

Los resultados registrados en este estudio, revelan que la ivermectina presenta afinidades de interacción molecular predominante a la región mayor de unión de la importina α humana, correspondientes a los dominios ARM2-ARM4, los cuales demostraron magnitudes favorables de energías de unión y la participación activa del Triptófano (Trp), la Asparagina (Asn) y la Arginina (Arg) de este dominio, los cuales cumplen funciones importantes la identificación molecular de secuencias NLS en proteomas virales. También se pudo determinar afinidades en regiones no activas de la importina (H1-ARM5, H2-ARM6, H2-ARM7), lo cual podría ejercer inestabilidad en las uniones con la importina $\beta 1$ o con las secuencias NLS.

Declaración de conflictos de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

Referencias bibliográficas

- Timani KA, Liao Q, Ye L, Zeng Y, Liu J, Zheng Y, et al. Nuclear/nucleolar localization properties of C-terminal nucleocapsid protein of SARS coronavirus. *Virus Res.* 2005;114(1):23-34. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.05.007>
- Wulan WN, Heydet D, Walker EJ, Gahan ME, Ghildyal R. Nucleocytoplasmic transport of nucleocapsid proteins of enveloped RNA viruses. *Front Microbiol.* 2015;6. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00553>
- Ye Z, Wong CK, Li P, Xie Y. A SARS-CoV protein, ORF-6, induces caspase-3 mediated, ER stress and JNK-dependent apoptosis. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 2008;1780(12):1383-1387. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.07.009>
- Frieman M, Yount B, Heise M, Kopecky-Bromberg SA, Palese P, Baric RS. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus ORF6 Antagonizes STAT1 Function by Sequestering Nuclear Import Factors on the Rough Endoplasmic Reticulum/Golgi Membrane. *J Virol.* 2007;81(18):9812-9824. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/jvi.01012-07>
- Zhao J, Falcón A, Zhou H, Netland J, Enjuanes L, Breña PP, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Protein 6 Is Required for Optimal Replication. *J Virol.* 2009;83(5):2368-73. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/jvi.02371-08>
- Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J Adv Res.* 2020;24:91-98. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.005>
- Kannan S, Shaik Syed Ali P, Sheeza A, Hemalatha K. COVID-19 (Novel Coronavirus 2019) - recent trends. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020;24(4):2006-2011. Disponible en: https://doi.org/10.26355/eurrev_202002_20378
- Li JY, Liao CH, Wang Q, Tan YJ, Luo R, Qiu Y, et al. The ORF6, ORF8 and nucleocapsid proteins of SARS-CoV-2 inhibit type I interferon signaling pathway. *Virus Res.* 2020;286:198074. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198074>
- Mosammamarast N, Pemberton LF. Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends Cell Biol.* 2004;14(10):547-556. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.09.004>
- Chook Y, Blobel G. Karyopherins and nuclear import. *Curr Opin Struct Biol.* 2001;11(6):703-715. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(01\)00264-0](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(01)00264-0)
- Caly L, Wagstaff KM, Jans DA. Nuclear trafficking of proteins from RNA viruses: Potential target for antivirals?. *Antiviral Res.* 2012;95(3):202-206. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.06.008>
- Yang SNY, Atkinson SC, Wang C, Lee A, Bogoyevitch MA, Borg NA, et al. The broad spectrum antiviral ivermectin targets the host nuclear transport importin $\alpha/\beta 1$ heterodimer. *Antiviral Res.* 2020;177:104760. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104760>
- Mastrangelo E, Pezzullo M, De Burghgraeve T, Kaptein S, Pastorino B, Dallmeier K, et al. Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: new prospects for an old drug. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(8):1884-1894. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jac/dks147>
- Varghese FS, Kaukinen P, Gläsker S, Bespalov M, Hanski L, Wennerberg K, et al. Discovery of berberine, abamectin and ivermectin as antivirals against chikungunya and other alphaviruses. *Antiviral Res.* 2016;126:117-124. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.12.012>
- Wagstaff KM, Sivakumaran H, Heaton SM, Harrich D, Jans DA. Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. *Biochem J.* 2012;443(3):851-856. Disponible en: <https://doi.org/10.1042/BJ20120150>
- Caly L, Druce JD, Catton MG, Jans DA, Wagstaff KM. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral Res.* 2020;178:104787. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104787>
- Azam F, Taban IM, Eid EEM, Iqbal M, Alam O, Khan S, et al. An in-silico analysis of ivermectin interaction with potential SARS-CoV-2 targets and host nuclear importin α . *J Biomol Struct Dyn.* 2022; 40(6), 2851-2864. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1841028>
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(1):235-242. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Visualizer, version 20.1, San Diego: Dassault Systèmes, 2019.
- Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, et al. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:D1202-D1213. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv951>
- Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR.

- Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminformatics*. 2012;4(1):1-17. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
22. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004;25(13):1605-1612. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
23. Dallakyan S, Olson AJ. Small-Molecule Library Screening by Docking with PyRx. En: Hempel JE, Williams CH, Hong CC, editores. *Chemical Biology: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer; 2015. p. 243-50. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7_19
24. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*. 2010;31(2):455-461. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
25. Pumroy R, Cingolani G. Diversification of importin- α isoforms in cellular trafficking and disease states. *Biochem J*. 2015; 466(1): 13-28. Disponible en: <https://doi.org/10.1042/BJ20141186>
26. Ōmura S, Crump A. Ivermectin: panacea for resource-poor communities?. *Trends Parasitol*. 2014;30(9):445-455. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.07.005>
27. Jans DA, Martin AJ, Wagstaff KM. Inhibitors of nuclear transport. *Curr Opin Cell Biol*. 2019;58:50-60. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.01.001>
28. Tay MYF, Fraser JE, Chan WKK, Moreland NJ, Rathore AP, Wang C, et al. Nuclear localization of dengue virus (DENV) 1–4 non-structural protein 5; protection against all 4 DENV serotypes by the inhibitor Ivermectin. *Antiviral Res*. 2013;99(3):301-306. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.06.002>
29. Lundberg L, Pinkham C, Baer A, Amaya M, Narayanan A, Wagstaff KM, et al. Nuclear import and export inhibitors alter capsid protein distribution in mammalian cells and reduce Venezuelan Equine Encephalitis Virus replication. *Antiviral Res*. 2013;100(3):662-672. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.10.004>
30. Lv C, Liu W, Wang B, Dang R, Qiu L, Ren J, et al. Ivermectin inhibits DNA polymerase UL42 of pseudorabies virus entrance into the nucleus and proliferation of the virus in vitro and vivo. *Antiviral Res*. 2018;159: 55-62. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.09.010>
31. Raza S, Shahin F, Zhai W, Li H, Alvisi G, Yang K, et al. Ivermectin Inhibits Bovine Herpesvirus 1 DNA Polymerase Nuclear Import and Interferes With Viral Replication. *Microorganisms*. 2020;8(3):409. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030409>
32. Dagher Janabi AH. Effective Anti-SARS-CoV-2 RNA Dependent RNA Polymerase Drugs Based on Docking Methods: The Case of Milbemycin, Ivermectin, and Baloxavir Marboxil. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2020;12(4):246-250. Disponible en: PMID: 33014317
33. Lehrer S, Rheinstein PH. Ivermectin Docks to the SARS-CoV-2 Spike Receptor-binding Domain Attached to ACE2. *In Vivo*. 2020; 34(5): 3023-3026. Disponible en: <https://doi.org/10.21873/invivo.12134>