

Actividad antiviral in vitro e in silico de ocho compuestos derivados halogenados de la tiramina frente a la infección por DENV-2/S16803, ZIKV/Col y CHIKV/Col

Laura Cristina Restrepo Méndez
Estudiante de la Maestría en Microbiología Cohorte
X

TUTOR

Marlén Martínez Gutiérrez^{1,3}

CO-TUTOR

Vanessa Loaiza Cano¹

COMITÉ TUTORIAL

Laura Milena Monsalve Escudero¹

Manuel Pastrana²

¹Grupo de Investigación en Ciencias Animales - GRICA. Universidad Cooperativa de Colombia.

²Grupo de Productos Naturales Marinos. Universidad de Antioquia.

³Grupo de Investigación en Microbiología Básica y Aplicada MICROBA. Universidad de Antioquia.

Diciembre de 2022

Medellín - Colombia

Tabla de contenido

Tabla de contenido.....	2
Índice de figuras.....	4
Índice de tablas.....	5
1. INTRODUCCION.....	7
1.1 Epidemiología.....	7
1.2 Agentes Etiológicos.....	8
1.2.1 Modelos de Flavivirus: DENV y ZIKV.....	8
1.2.2 Modelo Alfavirus: CHIKV.....	11
1.3 Estrategias de control para DENV, ZIKV y CHIKV.....	13
1.3.1 Antivirales contra DENV, ZIKV y CHIKV.....	14
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	15
3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4 METODOLOGIA.....	15
4.1 Síntesis de compuestos di-halogenados derivados de la tiramina.....	15
4.2 Células y cepas virales.....	16
4.3 Determinación de la viabilidad celular In Vitro.....	16
4.4 Estrategias antivirales In vitro.....	17
4.4.1 Estrategia de tratamiento combinado.....	17
4.4.2 Estrategia de actividad viricida (TRANS-tratamiento).....	17
4.4.3 Estrategia de tratamiento previo a la infección (PRE-tratamiento).....	17
4.4.4 Estrategia de tratamiento posterior a la infección (POST-tratamiento).....	17
4.5 Cuantificación de la infección.....	17
4.5.1 Cuantificación de partículas virales infecciosas.....	18
4.5.2 Cuantificación de proteínas virales.....	18
4.5.3 Cuantificación de genoma viral intracelular.....	18
4.6 Determinación del índice de selectividad (IS).....	19

4.7	Acoplamiento molecular	19
4.8	Análisis estadístico.....	19
5	RESULTADOS.....	19
5.1	Los compuestos dihalogenados derivados de la tiramina no afectaron la viabilidad de las células VERO. 19	
5.2	Los compuestos YDB-3M, YODC-3M y YODB-3M inhiben partículas virales infecciosas en células VERO infectadas por DENV-2/S16803.....	20
5.3	Solo el compuesto YDB-3M inhibió la producción de partículas virales infecciosas en la estrategia combinada frente a la infección del virus ZIKV/Col.	21
5.4	Los compuestos YDB-3M, YODC-2M y YODB-3M inhibieron las partículas virales infecciosas de CHIKV/Col mediante la estrategia combinada.....	21
5.5	El compuesto YDB-3M inhibe la producción de partícula viral infecciosa a diferentes concentraciones. 22	
5.6	El compuesto YDB-3M no tiene una actividad viricida en la partícula viral de DENV-2/S16803, ZIKV/Col y CHIKV/Col 23	
5.7	El tratamiento previo con el compuesto YDB-3M no inhibe la infección por Flavivirus, mientras que para el modelo Alfavirus inhibe producción de partículas virales infecciosas.	24
5.8	El compuesto YDB-3M inhibe la infección en células VERO en pasos posteriores a la infección por DENV-2/S16803, ZIKV/Col y CHIKV/Col.....	25
5.9	El compuesto YDB-3M presentó interacciones favorables con la proteína NS5 en los modelos Flavivirus, mientras que para el modelo Alfavirus la interacción favorable fue con el macrodominio de la proteína NSP3.....	26
6	DISCUSION	28
7	CONCLUSIÓN	31
8	Bibliografía	31

Índice de figuras

Figura 1 Clasificación de los compuestos sintetizados	16
Figura 2 Evaluación de la viabilidad de células VERO al ser tratadas con los compuestos	20
Figura 3 Tamizaje antiviral de los compuestos derivados de las tiraminas frente a la infección por DENV-2/S16803, ZIKV/Col y CHIKV/Col.....	22
Figura 4 Estrategia TRANS-tratamiento	24
Figura 5 Estrategia PRE-tratamiento	25
Figura 6 Estrategia POST-tratamiento	26
Figura 7 Interacciones in silico entre algunas proteínas virales y el ligando YDB-3M.....	28

Índice de tablas

Tabla 1 Valores de concentración citotóxica al 50 % (CC50), concentración efectiva al 50 % (EC50) e índice de selectividad (IS) del compuesto YDB-3M evaluados en células VERO infectadas con DENV- 2/S16803, ZIKV/Col y CHIKV/Col	23
Tabla 2 Interacciones in silico entre el compuesto YDB-3M y proteínas virales	27

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Hasta la fecha no existe un antiviral aprobado para DENV, ZIKV y CHIKV. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antiviral in vitro e in silico de compuestos derivados de las tiraminas contra la infección de estos tres arbovirus.

MATERIALES Y MÉTODOS

La viabilidad celular se determinó mediante ensayo MTT. Se realizó un tamizaje antiviral mediante la estrategia combinada frente a la infección por DENV-2/S16803, ZIKV/Col y CHIKV/Col. Para el compuesto con potencial antiviral más prometedor en los tres modelos virales, se realizaron estrategias antivirales individuales en células VERO. La infección se cuantificó por ensayo de placa, qPCR y Cell-ELISA. La interacción del compuesto con proteínas virales se evaluó mediante acoplamiento molecular con AutoDockVina®. Las interacciones se visualizaron con PyMoL y LigPlot+2.

RESULTADOS

La viabilidad celular fue superior al 80% a 250µM, concentración que se eligió para ensayos posteriores. En la estrategia combinada, el compuesto YODB-3M inhibió la infección por DENV-2/S16803 y CHIKV/Col, y YODC-3M solo en DENV-2/S16803. YDB-3M inhibió la infección in vitro de los tres arbovirus, por lo que se evaluó con estrategias individuales. En PRE-tratamiento este compuesto inhibió partícula viral infecciosa de CHIKV/Col. En la estrategia POST-Tratamiento inhibió partícula viral infecciosa y la proteína viral en los tres modelos virales e inhibió las copias genómicas/ml en ZIKV/Col y CHIKV/Col. Las mejores energías de unión in silico se obtuvieron con la proteína viral del macrodominio NSP3-CHIKV.

CONCLUSIONES

El compuesto YDB-3M demostró potencial antiviral in vitro contra tres arbovirus de importancia para la salud pública principalmente en etapas posteriores a la infección.

1. INTRODUCCION

Las enfermedades como Dengue, la fiebre del Zika y la fiebre del Chikunguña, hacen parte de los síndromes febriles transmitidos por vectores con mayor impacto a nivel mundial [1]. Los arbovirus (virus transmitidos por vectores) que causan estas enfermedades son el virus del Dengue (DENV), el virus del Zika (ZIKV) y el virus de Chikungunya (CHIKV), los cuales se transmiten por mosquitos (hembras hematófagas) del género *Aedes* (Ae.) principalmente *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, los cuales se encuentran en las regiones tropicales y subtropicales con altitudes hasta los 2200 metros sobre el nivel del mar (msnm) [2]. Factores como el cambio climático, la urbanización, la baja calidad en los servicios públicos y sanitarios, así como la falta de actualización de las directrices para el desarrollo de estrategias de control vectorial ha permitido la reaparición del mosquito y de la enfermedad en zonas donde previamente se había erradicado [3, 4]. De hecho, se ha reportado la diseminación del mosquito vector a nivel mundial en países donde no había sido reportada la infección previamente [5, 6] permitiendo la posible diseminación de la enfermedad a otras zonas geográficas. Teniendo en cuenta que comparten el mismo vector, se ha descrito una circulación simultánea de los tres arbovirus, dando como consecuencia el reporte de pacientes coinfectados en la región de las Américas [7] incluyendo Colombia [8, 9].

1.1 Epidemiología

En el año 2011, la Organización mundial de la salud (OMS) proporcionó un estimado de 125 países endémicos para dengue con una población de riesgo de 3.600 millones de personas [6]. Sin embargo, para el siguiente año (2012), Brady et al, estimó que a nivel mundial alrededor de 3.97 mil millones de personas que habitan en 128 países están en riesgo de infectarse por DENV [10]. Anualmente, se calcula que hay de 50 a 200 millones de infecciones por dengue, siendo de estos, 500.000 casos de dengue severo, de los cuales 20.000 personas tienen desenlaces letales al año [6]. En las Américas, para finales del año 2021 se notificaron 1.173.674 casos de dengue, de ellos 2.821 casos fueron clasificados con dengue grave llevando a 387 defunciones [11]. Para este mismo año, Colombia ocupó el tercer lugar con la tasa de incidencia más alta para la región de las Américas [11]. A nivel nacional, según el boletín epidemiológico correspondiente a la semana 45, durante el año 2022, se han notificado 57 885 casos probables de dengue, de los cuales el 46,6 % de los pacientes reportados no tienen signos de alarma, el 51,4 % tuvieron signos de alarma y 2,0 % se le diagnosticó dengue grave. Además, se han notificado 204 muertes probables por dengue, de los cuales 44 casos han sido confirmados [12].

El virus ZIKV tiene una propagación a nivel mundial con potencial pandémico en regiones como el Sudeste asiático, las islas del pacífico y las Américas [13]. Desde el año 2015 se reportaron los primeros casos en las Américas, principalmente en Brasil [14] y para el año 2016 se presentó el brote más grande en América Latina diseminándose hasta alrededor de 60 países [15]. A finales del 2015 se inició la vigilancia epidemiológica en Colombia por parte del Instituto Nacional de salud (INS) confirmando la transmisión autóctona del ZIKV [16]. Para las Américas, según la Organización Panamericana de la salud (OPS), en el año 2021 se notificaron 18.804 casos de los cuales dos (2) personas fallecieron. Los países que reportan un alto número de casos son Brasil (15.903) seguido por Guatemala y Paraguay con 1.902 y 475 casos respectivamente [11]. En Colombia, se reportó para la semana epidemiológica 45 un total de 135 casos el cual está por encima de lo reportado para esta misma semana para el año 2021 [12].

Al igual que DENV y ZIKV, CHIKV tiene una distribución mundial donde se ha identificado su transmisión en países de Asia [17], África [18], Oceanía [19], Europa [20] y para el 2013 en las Américas [21]. Para el año 2015 se registraron 42 países del Caribe y América latina que reportaron 25.000 casos confirmados por laboratorio [22]. A finales del año 2021, se reportaron 131.630 casos sospechosos de la enfermedad para

las Américas [11] mientras que para el presente año, se han reportado 242.924 casos. En Colombia, se reportó para la semana epidemiológica 45 del año 2022 un total de 97 casos, casi el doble de lo reportado en misma semana en el año 2021 siendo 46 casos.

1.2 Agentes Etiológicos

Los arbovirus causantes de las enfermedades descritas en el apartado anterior, son el DENV y ZIKV que pertenecen al género Flavivirus de la familia Flaviviridae; y el CHIKV que pertenece al género Alphavirus de la familia Togaviridae. Estos tres arbovirus poseen un genoma ARN monocatenario de polaridad positiva (ssRNA +) que da origen a proteínas estructurales y no estructurales. A continuación, se describirá cada modelo viral, incluyendo estructura genómica y proteica, ciclo replicativo, patogénesis y manifestaciones clínicas.

1.2.1 Modelos de Flavivirus: DENV y ZIKV

1.2.1.1 Estructura genómica y proteica

La partícula viral madura de DENV es envuelta y mide aproximadamente de 50 nanómetros (nm) de diámetro [23], mientras que ZIKV mide alrededor de 40 nm [24]. Micrografías electrónicas han revelado que ambos virus poseen una superficie relativamente lisa y con forma esférica [25], sin embargo, estudios previos describen la formación de partículas virales de superficie irregular en cepas como DENV1/ WestPac74 y DENV-2/NG, cuando se incuban entre 37°C a 40°C [26]. Como se mencionó anteriormente posee un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva (ssARN +) de una longitud aproximada de 11 Kb la cual posee un ORF (por sus siglas en inglés, Open Reading Frame) [27] flanqueado por dos regiones no traducidas (UTR- Untranslated Region, por sus siglas en inglés) 5' y 3' altamente estructuradas y conservadas [28], donde su extremo 5' no traducido (5' UTR) posee un cap de metilguanosa (5' Cap) [29]. Dado el sentido del genoma viral, este se comporta como un ARNm que codifica para una única poliproteína que se escinde en tres proteínas estructurales (la proteína de cápside (C), la proteína precursora de membrana (prM) y la proteína de envoltura (E)) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) que participan en el ciclo replicativo viral y son fundamentales para una infección efectiva [30].

La proteína E, con un peso molecular de aproximadamente 53 kDa y tres dominios (EI, EII y EIII), es el principal determinante antigénico de la partícula viral además de estar implicada en la unión a los receptores celulares [31]. Por otra parte, se ha descrito que deleciones en la proteína E están asociadas a la neurovirulencia descrita para ZIKV [32] y a la clasificación en los serotipos y genotipos para DENV [33]. La proteína C con un peso aproximado de 11 a 12 kDa, está conformada por cuatro hélices alfa (α 1- α 4). Esta proteína es necesaria para el ensamblaje y la encapsidación del genoma del virus, siendo la hélice α 1, la que interactúa con el ARN recién sintetizado para formar la nucleocápside que protege al genoma viral [34]. Adicionalmente, la hélice 2 (α 2), recluta pequeñas gotas lipídicas (lipid droplets) en el citoplasma siendo importante en el ensamblaje de la partícula viral [35]. Por su parte, la proteína prM tiene un peso molecular aproximado de 26 kDa. La función principal de esta proteína es evitar que la proteína E adquiera su forma fusogénica en su paso por transgolgi, de igual manera, participa en etapas finales del ciclo replicativo al ser escindida por furina formando el péptido pr y la proteína M, dándose un cambio conformacional de la proteína E lo que permite la maduración de las partículas virales [36]. Estudios previos han reportado que mutaciones en esta proteína aumentan la infección en células neuronales fetales en infecciones por ZIKV [37].

En cuanto a las proteínas no estructurales, la glicoproteína NS1 pesa aproximadamente 46 kDa y se ha descrito como un antígeno soluble al ser secretada en el suero, participando en la evasión del sistema inmune [38]. También se ha encontrado que la ausencia de esta proteína afecta la replicación del genoma viral en

otros miembros del género flavivirus, como el virus del Nilo occidental, el virus de la encefalitis japonesa entre otros [39]. Por otro lado, las proteínas NS2A y la NS2B son proteínas hidrófobas que pesan 22 kDa y 14 kDa, respectivamente. Estudios previos han demostrado que mutaciones en la proteína NS2A interfieren en la síntesis y el ensamblaje de la partícula viral afectando el ciclo replicativo de DENV y ZIKV [40] [41]. Por su parte, la NS2B actúa como cofactor al interactuar con el dominio proteasa de la proteína NS3 creando el complejo NS2B/NS3 [42]. La proteína NS3 pesa aproximadamente 70 kDa y cuenta con dos dominios. En el extremo N-terminal está el dominio proteasa (NS3pro) que como se mencionó con anterioridad necesita de la proteína NS2B para su actividad enzimática [43]; en el extremo C-terminal posee actividad trifosfatasa de nucleótidos estimulada por ARN (NTPasa) y helicasa (NS3Hel) implicada en la replicación viral [44]. Las proteínas NS4A y NS4B de naturaleza hidrofóbica, pesan 16 kDa y 27 kDa, respectivamente. Investigaciones previas han demostrado la participación de NS4A y NS4B en el complejo de replicación, en la síntesis del genoma viral y la modulación del dominio helicasa de la proteína NS3 [45].

Finalmente, la proteína NS5 con un peso molecular de 104 kDa, al igual que la NS3, tiene dos dominios. En el extremo N-terminal, el dominio metiltransferasa (MTasa) implicado en la metilación del extremo 5' del genoma viral importante en la traducción y estabilidad del ARNm [46], mientras en el extremo C-terminal posee el dominio ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp - RNA dependent RNA polymerase, por sus siglas en inglés) [42].

1.2.1.2 Ciclo replicativo

El ciclo replicativo inicia con la interacción del dominio III de la proteína E con receptores de la célula hospedera, dentro de los cuales se han descrito, para el caso de DENV el receptor para la laminina (LAMR1) [47], proteínas de adhesión celular como ICAM-3 o DC-SIGN (DCs, dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin, por sus siglas en inglés) [48], glicosaminoglicanos (como el heparán sulfato y lectinas) [49], el receptor de manosa (MR) en macrófagos, receptor de lipopolisacáridos (LPS) y proteínas de choque térmico 70 y 90 [50], entre otros [51-53]. Por su parte, para ZIKV se han reportado otros receptores como los receptores de lectina tipo C (CLR) [54], los receptores de la familia tirosina quinasa TAM (receptores Tyro3, Axl, and Mer) y receptores tipo TIM (receptores de la inmunoglobulina de células T y dominio de mucina). Posterior a la adhesión la partícula viral es internalizada. Para DENV se ha reportado que en células VERO la internalización se puede dar por la vía endocítica no clásica independiente de clatrina, caveolas o lípidos [55], mientras que para ZIKV la principal vía es por endocitosis mediada por clatrina [56]. Durante el proceso de endocitosis, aumenta la concentración de iones de hidrógeno a través de la actividad de la bomba de protones dependientes de ATP (V-ATPasa) del endosoma lo que conlleva a su acidificación [57] permitiendo que haya cambios conformacionales de la proteína E [31]. En un primer momento, el homodímero de esta proteína E se reordena en trímeros exponiendo el péptido de fusión ubicado en el dominio E II [50], permitiendo la fusión de la envoltura lipídica viral con la membrana de la del endosoma, para la liberación de la nucleocápside al citoplasma [50, 58, 59].

En el citoplasma, por el proceso de ubiquitinación la proteína C se disocia del ARN viral [60], el cual es traducido en una poliproteína que será procesada mediante proteasas virales y celulares [58, 61]. En la etapa de la replicación del genoma la RdRp produce una cadena negativa complementaria que va a ser usada como plantilla para la formación del ARN de sentido positivo [58]. Estudios previos, describen la interacción entre los extremos 5'UTR y 3'UTR para circularización del genoma viral facilitando el proceso de replicación [62]. Esta etapa, junto con el ensamblaje se dan en el retículo endoplásmico (RE), lo que permite la interacción del ARN genómico y la proteína C con pequeñas gotas de lípidos para darse la formación de la nucleocápside [35]. También en el RE se inicia la glicosilación de la proteína E [61]. Las proteínas prM y E están en forma de espícula proteica en la partícula viral inmadura [63]. Una vez ensamblada la partícula viral,

esta transita desde el RE por vía endosomal, hasta la red trans-golgi, donde se expone al pH ácido de esta organela induciendo el reordenamiento de la proteínas E [64], y al mismo tiempo la escisión de la proteína prM por la Furina, formando el péptido pr y la proteína M; donde pr se libera a pH neutro cuando la partícula viral madura es liberada por exocitosis [58]

1.2.1.3 Patogénesis de DENV y ZIKV

1.2.1.3.1 Patogénesis de DENV

La patogénesis de la infección por DENV depende de factores virales (tropismo celular, serotipo y genotipo viral) y de factores del hospedero (edad, genética o comorbilidades tales como enfermedad renal o diabetes) [65, 66]. La infección por DENV inicia con la picadura del mosquito infectando células de Langerhans inmaduras que irán a los ganglios linfáticos locales, donde infecta sus principales células diana: monocitos y macrófagos [67]. Luego hay una diseminación del DENV (viremia primaria) infectando células dendríticas [68], macrófagos del bazo y células de Kupffer [69]. El hígado es uno de los principales órganos afectados. Como se mencionó anteriormente las células de Kupffer son unos de los principales objetivos de la infección por DENV. En infecciones secundarias, se han encontrado histológicamente, lesiones hepáticas a causa de una apoptosis celular [70]. Además, se ha descrito infección en células del bazo y médula ósea en modelos animales [71]. La formación de inmunocomplejos en infecciones secundarias aumenta la infección de células mononucleares permitiendo la secreción de citoquinas, como interleucina (IL)-2, IL-6, factor de necrosis tumoral (TNF)- α e interferón (IFN)- además de IL-4, IL-5 e IL-10 [69].

Uno de los principales mecanismos estudiados en el desarrollo de las formas graves de la enfermedad, es el fenómeno de inmunopotenciación mediada por anticuerpo (ADE, por sus siglas en inglés Antibody- Dependent Enhancement). Este fenómeno se basa en la afinidad reducida de los anticuerpos dirigidos no solamente contra la proteína E, sino también, contra la proteína prM de las partículas virales inmaduras dada la heterogeneidad de las partículas virales secretadas. Estudios previos han demostrado que a pesar de la poca neutralización de los anticuerpos anti prM estos promueven en gran parte el fenómeno de ADE [72]. Estos anticuerpos generados en una primera infección por uno de los cuatro serotipos no son capaces de neutralizar el virus en una infección secundaria heterotípica; es decir, cuando se infecta con un serotipo diferente al de la primera infección [73, 74]. Sin embargo estos anticuerpos se unen a las partículas virales promoviendo la entrada del virus en células que expresan receptores Fc γ R (monocitos, macrófagos, DCs) aumentando la carga viral y promoviendo la liberación potenciada de citoquinas (IL-4, IL-6, IL-8 y IL-17) llevando a formas graves de la enfermedad [75].

Además, en las manifestaciones hemorrágicas presentadas también en los pacientes con dengue severo, los anticuerpos dirigidos a NS1 pueden afectar la funcionalidad del endotelio por medio de la reacción cruzada con células endoteliales y plaquetas, lo que conlleva a agregación plaquetaria y fragilidad capilar [76]. Hasta el momento se siguen estudiando los diferentes mecanismos implicados en la patogénesis de la infección por DENV. El serotipo de DENV, la carga viral e inmunidad previa entre otras, son factores claves a la hora del desarrollo de formas graves de la enfermedad.

1.2.1.3.2 Patogénesis de ZIKV

Luego de la picadura del vector, las primeras células que se exponen a la infección son fibroblastos o DC- SIGN. Posterior a esto, se da la migración del virus a ganglios linfáticos locales y torrente sanguíneo [56]; y a células de la placenta (trofoblastos), células neuronales (astrocitos), células del tejido ocular y células del sistema reproductivo [77]; permitiendo así el desarrollo de complicaciones y secuelas descritas como la

microcefalia en recién nacidos de madres previamente infectadas [78] dado el aumento y la exposición de interleucinas (IL-6, IL-8) y factor de crecimiento endotelial vascular proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) al cerebro fetal provocando daños en su desarrollo [79]. Por otra parte, la reacción cruzada de los anticuerpos neutralizantes producidos contra ZIKV en células del sistema nervioso periférico (tales como células gliales o astrocitos) reduce la formación de mielina permitiendo el desarrollo del síndrome de Guillain-Barré (SGB) [80].

1.2.1.4 Manifestaciones clínicas

1.2.1.4.1 Manifestaciones clínicas de DENV

Debido al amplio espectro de manifestaciones clínicas presentadas durante la enfermedad, que incluyen pacientes asintomáticos, pacientes que pueden auto-resolver la infección con un curso no severo o que, en algunos casos, progresan a una etapa grave de la enfermedad o la muerte; la Organización mundial de la salud (OMS) para el año 2009 planteó tres categorías para su clasificación. La primera categoría es dengue (D), común en personas que viven en zonas endémicas; es una enfermedad considerada incapacitante, caracterizada por una sintomatología febril inespecífica (cefalea intensa, dolor retro-orbital, mialgias, artralgias y erupciones cutáneas). La segunda categoría es dengue con signos de alerta (DW-dengue with warning signs, por sus siglas en inglés), que comprende dolor abdominal intenso y continuo, acumulación de líquidos, sangrado de mucosas y vómito. Finalmente, dengue severo (SD- severe dengue, por sus siglas en inglés) donde el paciente cursa con choque por extravasación del plasma y acumulación de líquido con dificultad respiratoria, sangrado profuso y compromiso grave de órganos, con complicaciones hepáticas y cardíacas que pueden llevar a la muerte [81].

1.2.1.4.2 Manifestaciones clínicas de ZIKV.

El trascurso clínico de la infección por ZIKV, suele ser asintomático, sin embargo, se puede presentar una enfermedad leve y autolimitada en solo alrededor del 20 al 25% de las personas infectadas con un período de incubación entre 4 a 10 días [13]. Al ser un síndrome febril, la manifestación clínica principal es la fiebre; adicional a esto, se ha reportado cefalea, dolor articular y la presencia de sarpullido característico de la infección por ZIKV [15]. Entre las manifestaciones clínicas descritas menos comunes están a hemospermia, trombocitopenia y hemorragia subcutánea [13]

Por otra parte, se han descrito complicaciones neurológicas asociados a la infección por ZIKV, entre las que se destacan la microcefalia en recién nacidos y el desarrollo de síndrome de Guillain-Barré (SGB) en población adulta [82]. Este último, se presenta entre los 6 y 10 días luego de los síntomas iniciales en adultos mayores de 40 años según estudios realizados en Brasil [83], Colombia [84] y la polinesia francesa [85]. También se puede presentar debilidad en las extremidades inferiores, parálisis fácil y disautonomía [82]. Por su parte la microcefalia asociada a la transmisión vertical por ZIKV se ha descrito desde el 2015 [86].

1.2.2 Modelo Alfavirus: CHIKV

1.2.2.1 Estructura genómica y proteica de CHIKV

CHIKV es un virus envuelto que mide alrededor de 70 nm [87] y como se mencionó anteriormente, tiene un genoma viral ARN monocatenario de polaridad positiva que mide aproximadamente 12 Kb. Este a diferencia de los flavivirus mencionados, posee dos ORF, los cuales van a codificar para cuatro proteínas no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3, y NSP4) y seis proteínas estructurales (Cápside, E1, E2, E3,6K y TF) a partir de un ARN subgenómico [88].

La proteína NSP1 posee 535 aminoácidos y cuenta con tres dominios funcionales: N-terminal (NT), el dominio medio de unión a membrana (MB) y el dominio C-terminal (CT). Esta proteína está relacionada con la metilación y la protección de la región 5' del ARN mediante la actividad guanidiltransferasa y metiltransferasa. Por su parte a la proteína NSP2 se le han descrito diferentes funciones como la actividad helicasa, nucleósido trifosfatasa (NTP); y junto con la proteína NSP1 están implicadas en la en la formación de la caperuza del ARNm [89].

La proteína NSP3 está conformada por dos dominios ubicados en las regiones N-terminal y C-terminal. El macrodominio está ubicado en la región conservada N-terminal; mientras que la región C-terminal es menos conservada y se ha descrito su participación en la síntesis del ARN [90]. En general, a esta proteína se le ha descrito su participación en la transcripción en etapas tempranas de la infección [91] y en la síntesis del genoma viral donde previamente se ha demostrado que mutaciones en esta proteína afectan la formación de ARN subgenómico. Finalmente, la proteína NSP4 es la polimerasa dependiente de ARN (RdRp) [92].

La proteína de la cápside (C) posee 261 aminoácidos y se ha descrito su participación en la interacción con el genoma viral permitiendo la formación de la nucleocápside [93]. Por su parte, las glicoproteínas E2 y E1 hacen parte de la envoltura viral fundamentales en la unión al receptor y fusión de la membrana, respectivamente [94] mientras que la proteína E3 evita la exposición del péptido de fusión y de la heterodimerización de E1 y E2 [88]. Aún se desconoce el papel de las proteínas 6K y la TF, sin embargo estudios previos han identificado la participan en la gemación y liberación de la partícula viral [95].

1.2.2.2 Ciclo replicativo de CHIKV.

El ciclo replicativo de CHIKV comienza con la interacción de la proteína E2 y receptores celulares tales como prohibitina (PHB), DC-SIGN, integrantes de la familia TIM o receptores PVEER (Phosphatidyl Serine Mediated Virus Entry Enhancing Receptors) [96]. Posterior a la adhesión, se internaliza la partícula viral principalmente por endocitosis mediada por clatrina [97] donde la acidificación del pH disocia el heterodímero E2-E1 promoviendo la exposición del péptido de fusión ubicada en E1, permitiendo así la unión de la envoltura viral y la membrana del endosoma para liberar el ARN viral [98]. Este genoma será traducido a una poliproteína (NPS1234) que será escindida en P123 y nsP4 [88]. Las proteínas NSP4 y la NSP2 participan en la formación del ARN de sentido negativo, el cual a su vez sirve como plantilla para la formación de ARN genómico (49S) y subgenómico (26S); y son necesarias en la síntesis de la poliproteína C-pE2-6K-E1 [93]. La proteína C queda libre por un proceso autocatalítico para la formación de la nucleocápside viral mientras que la poliproteína pE2-6K-E1 se integra en la membrana del retículo endoplasmático para ser procesada y llevada a la membrana celular. Las proteínas E2 y E1 forman heterodímeros, donde la furina escinde y libera E2 y E3 paso importante en la maduración de la partícula viral. Finalmente, se da el ensamblaje de las proteínas virales junto con el ARN sintetizado para ser liberado el virus mediante gemación obteniendo así su envoltura [93].

1.2.2.3 Patogénesis de CHIKV

Una vez inoculado el CHIKV mediante la picadura del mosquito vector, se ha descrito como blancos iniciales, las células del epitelio (melanocitos y queratinocitos). La infección de estas células se ha asociado a la erupción cutánea. Luego de una primera ronda de replicación las células del endotelio, los fibroblastos y macrófagos, interactúan con las partículas virales permitiendo la diseminación de la infección, a través de los vasos linfáticos y el torrente sanguíneo, a órganos blanco de la infección. Se ha descrito que el aumento de la síntesis de interleucinas-1b (IL-1B) o TNF-alfa en la fase virémica está asociado a la aparición de la

fiebre presentada en esta etapa de la infección [99] Debido a la infección de células fibroblásticas, el principal órgano afectado es el músculo y la cavidad articular (sionoviocitos) [100], donde se da una replicación primaria generando una respuesta inflamatoria mediada por citoquinas (IL-1b, IL-6 y TNF-a). El interferón (INF) secretado por los fibroblastos infectados, induce el aumento de la expresión de prostaglandinas permitiendo la activación de nociceptores reportadas en la fisiopatología de la artrosis. Por otra parte, también se han reportado manifestaciones oculares, como lauveítis, debido a la infección de tejidos musculares motores oculares, la córnea o la esclerótica [99]. Luego de la fase aguda de la enfermedad, entre el 25% y 40 % de los pacientes presentan artritis crónica, incluyendo artralgia o artritis franca [101]. La cronicidad de la infección está mediada por la infiltración de macrófagos, monocitos o linfocitos dentro del líquido sinovial promoviendo la secreción de IL-6, IL-8 y MCP-1 generando así una inflamación prolongada [88].

1.2.2.4 Manifestaciones clínicas

El periodo de incubación dura entre 3 y 7 días seguido de la presentación de fiebre, cefalea, escalofríos, náuseas y/o erupciones cutáneas característico de la fase aguda de la enfermedad, lo cual puede dificultar el diagnóstico clínico diferencial al momento de la consulta [102]. Luego de esta fase, el transcurso de la enfermedad se vuelve crónico, incluyendo dolor articular bilateral, simétrico y debilitante [103]. Previamente se ha descrito que entre el 43 % y el 75 % de los pacientes sigue presentando síntomas como dolor articular, fatiga y neuritis luego de 10 meses. Así mismo, se ha encontrado que el 50% de las personas infectadas por CHIKV manifiestan dolor crónico en articulaciones [102]. Finalmente, se han reportado efectos más críticos como encefalopatía, miocarditis y compromiso hepático que causantes de muerte [88].

1.3 Estrategias de control para DENV, ZIKV y CHIKV

Hasta el momento el principal mecanismo de control usado está relacionado con el vector. Estudios previos han demostrado que con las políticas correctas se podría intervenir exitosamente la transmisión de estos arbovirus [104]. No obstante, factores sociodemográfico, la inadecuada implementación de políticas públicas y la adquisición de resistencia a insecticidas por parte del vector han facilitado la emergencia y remergencia de DENV, ZIKV y CHIKV [105]. Por otra parte, se cuenta con el desarrollo de vacunas como estrategia de prevención y control [106], sin embargo, hasta el momento solo DENV cuenta con una vacuna aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) la cual se llama Dengvaxia® CYD-TDV. Esta se ha aprobado en niños mayores de 9 años y adultos hasta la edad de 45 años por las agencias reguladoras de medicamentos internacionales registrándose en 20 países endémicos [107]. Sin embargo, la eficacia reportada es dependiente de serotipo viral donde para DENV-1, DENV-3 y DENV-4 fue del 61,2%, 81,9% y 90,0%, respectivamente, mientras que para DENV-2 fue del 3,5% [108] considerándose baja, si se compara con la eficacia de otras vacunas como la del virus de la fiebre amarilla o la del virus de hepatitis B que pueden llegar hasta una eficacia del 95,0 % [108]. Así mismo, se ha reportado que la administración de la vacuna en pacientes seronegativos puede llevar a desarrollo de dengue severo causado por el mecanismo de ADE descrito previamente [3, 109]. Recientemente se aprobó el uso de la vacuna QDENGGA® en la Unión Europea en personas mayores a 4 años de edad, la cual previene el 84% de los casos de dengue severo tanto en pacientes seronegativos como en seropositivos [110]. Sin embargo, aún no se cuenta con el acceso a otras regiones endémicas de importancia en salud pública como las Américas, reduciendo el acceso a la población general. De igual manera, se cuenta con dos candidatos a vacunas en fase III (DENVax, US CDC/Inviragen/Takeda y TV003/TV005; US NIH) y tres en fase I (Purified formalin-inactivated virus-PIV, V180 y TLAV-prime/PIV) [111, 112]. Hasta el momento para ZIKV, se han desarrollado alrededor de 50 vacunas que se encuentran en fases preclínicas y clínicas [113]. Se destacan

las vacunas VRC-ZKADNA090-00-VP, que se encuentra en ensayo clínico fase II en personas entre los 18 a 35 años que no presentan sintomatología, al igual que la vacuna VCR-ZKADNA085-00-VP [15]. Por otra parte, para CHIKV se cuentan con ocho vacunas en fases clínicas I, II y III. La vacuna desarrollada por PaxVax, denominada PXVX0317 se encuentra en fase III en la que se presentaron algunos efectos adversos como malestar general y artralgia [114].

Teniendo en cuenta lo anterior, el desarrollo de otras estrategias terapéuticas o preventivas se hace necesario para estas arbovirosis. En tal sentido, se han venido investigando compuestos sintetizados químicamente [115] extractos naturales [116] o fármacos de segundo uso [117] para el tratamiento de las infecciones por DENV, ZIKV y CHIKV.

1.3.1 Antivirales contra DENV, ZIKV y CHIKV

Entre los compuestos que se han estudiado con actividad antiviral contra DENV se destacan fármacos de segundo uso (fármacos aprobados por las agencias reguladoras con otra indicación) como cloroquina, prednisolona, celgosivir y lovastatina que han llegado a estudios clínicos fase I o II sin obtener los resultados esperados [118]. El profármaco Balapiravir ha dado resultados prometedores en estudios *in vitro* frente a la infección por DENV, sin embargo, en ensayos clínicos no mejoró las medidas virológicas, inmunológicas o clínicas de los pacientes que comenzaron el tratamiento dentro de las primeras 48 horas de su enfermedad [119]. Algunas moléculas, como la metiladenosina ha demostrado que *in vitro* e *in vivo* causa inhibición de la viremia, disminuyendo la mortalidad en ratones infectados por ZIKV [120]. Nucleósidos como el 2'-C-metilo, demostró actividad antiviral en células VERO [121] al igual que compuestos como la duramicina, la suramina [122] y la nanchangmicina [123] que afectan etapas tempranas del ciclo replicativo. Estudios *in vivo* demostraron que el inhibidor de péptido sintético Z2 tiene actividad intraplacentaria inhibiendo la transmisión vertical por ZIKV [124]. Hasta la fecha la ribavirina es el único fármaco aprobado en humanos que tuvo un resultado favorable en pacientes infectados con CHIKV [125]. Otros compuestos como el Arbidol inhibe la infección por CHIKV en células MRC-5 al igual que dos análogos de este [126]. Finalmente, hasta el momento no hay ningún antiviral reportado para DENV, ZIKV o CHIKV de los 186 antivirales aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamento (FDA) [127], en tal sentido, la atención clínica de la enfermedad es paliativo para la sintomatología presentada por el paciente, con uso de analgésicos, reposición de líquidos y reposo absoluto [128, 129].

1.3.1.1 Compuestos derivados de las tiraminas y análogos

Dada la necesidad de encontrar compuestos con actividad biológica, en los últimos años se ha planteado el uso de recursos naturales como fuentes de moléculas bioactivas. En tal sentido, se ha evaluado el potencial de las esponjas colombianas como fuentes de compuestos que tuvieran actividad biológica [130]. Para ello se aislaron moléculas de tipo bromotirosinas a partir de *Verungula rígida* y *Aiolochroia crassa* que habían presentado actividad antiparasitaria [130] y antiviral. Se reportó que seis de los compuestos aislados, incluyendo un análogo de la tiramina disminuyeron la infección del VIH-1 actuando en pasos del ciclo replicativo como la entrada, transcripción inversa e importación nuclear de ADN retroviral [131]. Por otra parte, la molécula aislada aeroplilina-1, ha presentado potencial terapéutico frente a los cuatro serotipos de DENV [132].

Teniendo en cuenta que las fuentes naturales de estos compuestos son limitadas, se llevó a cabo síntesis química obteniendo una serie de compuestos derivados de la L-tirosina con sustituciones y halogenaciones en la posición 3 y 5 del anillo fenólico [133]. La principal diferencia entre la estructura química de los compuestos derivados de la L-tirosina y los derivados de las tiraminas, es que mientras los primeros poseen un grupo carboxilo, los segundos poseen un grupo amino convirtiéndose en análogos estructurales.

Finalmente, entre la actividad antiviral reportada para los compuestos sintetizados derivados de L-tirosinas, se publicó recientemente la actividad *in vitro* frente a la infección por ZIKV/Col y CHIKV/Col [134].

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Teniendo en cuenta que hay una circulación y co-circulación de los tres virus en las Américas, incluyendo Colombia, que los mecanismos de control vectorial y las opciones terapéuticas no son eficaces, y que, hasta el momento no hay antivirales aprobados contra DENV, ZIKV o CHIKV, se hace necesario la identificación de moléculas que puedan ser usadas como posibles fármacos antivirales. Además, es importante que el mecanismo de acción de los antivirales pueda inhibir alguna o varias de las etapas dentro del ciclo replicativo viral sin afectar la viabilidad celular. Dada la actividad antiviral reportada *in vitro* por compuestos análogos a los derivados de la tiramina, se propuso como objetivo de este trabajo evaluar el efecto antiviral *in vitro* e *in silico* de compuestos derivados de las tiraminas contra la infección por DENV-2/S16803, ZIKV/Col y CHIKV/Col.

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de ocho compuestos derivados dihalogenados de la tiramina sobre la viabilidad de células VERO.
2. Identificar el compuesto con mejor actividad antiviral sobre la infección por DENV-2/S16803, ZIKV/Col y CHIKV/Col
3. Determinar el posible mecanismo de acción del compuesto más promisorio mediante las estrategias antivirales *in vitro*
4. Proponer un posible mecanismo de acción del compuesto más promisorio derivado de la tiramina mediante herramientas *in silico* con algunas proteínas virales

4 METODOLOGIA

4.1 Síntesis de compuestos di-halogenados derivados de la tiramina

Los compuestos fueron sintetizados por el grupo de productos naturales marinos de la Universidad de Antioquia. Para ello se realizaron halogenaciones en la posición 3 y 5 del anillo fenólico, además, sustituciones en el grupo amino (NH₂) y/o grupo hidroxilo (-OH). Se hizo la caracterización molecular de los compuestos como se describe previamente [135, 136]. Se clasificaron los ocho compuestos en dos grupos según la sustitución en el grupo hidroxilo (-OH) por un grupo Metilo (-CH₃). De esta manera, cada grupo se subclasificó según el halógeno adicionado por orden de posición en la tabla periódica, siendo el grupo IA y IIA las tiraminas cloradas y los grupos IB y IIB las tiraminas bromadas. Finalmente, en cada grupo se asociaron los compuestos según las sustituciones en el grupo amino (figura 1).

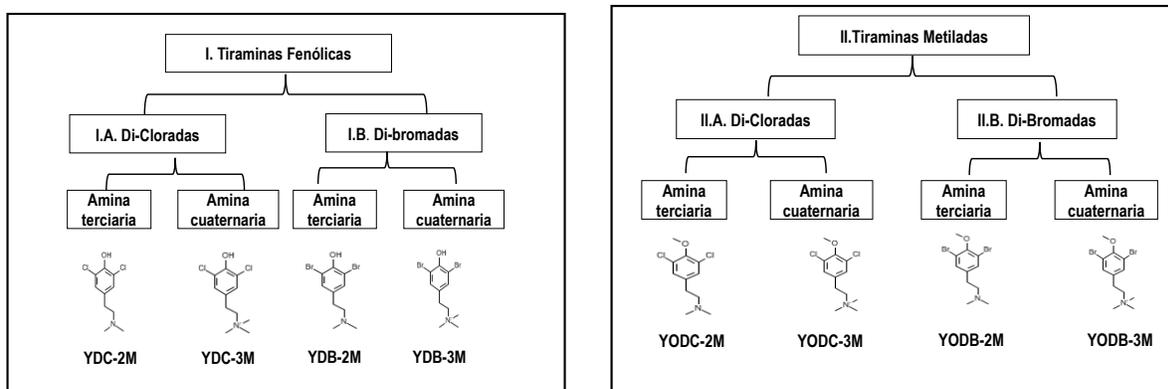


Figura 1 Clasificación de los compuestos sintetizados. Se obtuvieron ocho compuestos di halogenados derivados de la Tiramina, clasificándolos en dos grupos según la sustitución del grupo hidroxilo por un grupo metilo (-CH₃): I tiraminas fenólicas y II: tiraminas metiladas. Cada grupo se subdividió (A y B) según el grupo halógeno (Cloro o Bromo) en la posición 3 y 5 de anillo fenólico. Finalmente, cada subgrupo, tiene un compuesto según la sustitución en el grupo amino.

4.2 Células y cepas virales

Se usó la línea celular VERO (ATCC® CCL-81™); derivada de células epiteliales de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), para los diferentes experimentos in vitro. Estas células fueron cultivadas y mantenidas con DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO®, Grand Island, NY, EE. UU.) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 2% (GIBCO®) y antibiótico/antifúngico al 1% (estreptomina 10mg/mL, penicilina 10 000U/mL y anfotericina B 0,025mg/mL, GIBCO®). Las células fueron desprendidas con tripsina-EDTA (GIBCO®), centrifugadas a 1800 rpm por 5 minutos (min), resuspendidas con DMEM suplementado con SFB al 10% y contadas para las siembras. Todas las condiciones de incubación se hicieron a 37°C con 5% de CO₂ y atmósfera húmeda exceptuando las descritas explícitamente en los ensayos.

Para las estrategias antivirales se usó, en el caso de DENV, una cepa de referencia DENV-2/S16803, y para el caso de ZIKV y CHIKV, dos aislados clínicos colombianos obtenidos por el grupo de investigación, ZIKV/Col [134] y CHIKV/Col [137]. En todos los casos, para las infecciones de las estrategias antivirales, se usó una multiplicidad de infección (MOI por sus siglas en inglés Multiplicity of infection) de 5.

4.3 Determinación de la viabilidad celular In Vitro

Se evaluó la viabilidad de las células VERO tratadas con los compuestos usando el ensayo MTT (bromuro de tetrazolio azul de tiazolilo, Sigma-Aldrich®) descrito previamente [134]. Esta técnica permite evaluar la viabilidad celular mediante la formación de formazán a partir de 3-4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2H-bromuro de tetrazol metabolizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. Para esto se realizó la siembra de 3×10^4 células VERO por pozo en platos de 96 pozos llevándose a incubar por 24h. Las monocapas fueron tratadas con cada uno de los ocho compuestos con concentraciones seriadas en base dos desde 7.8µM hasta 500µM. Tras 48h de incubación se retiraron los sobrenadantes, se realizaron lavados con PBS 1X, se agregaron 50µL de MTT (0.5mg/mL) y se llevaron a incubar las células por 2h protegidas de la luz. Finalizado este tiempo se adicionaron 50µL de dimetilsulfóxido (DMSO) y luego de 10min a temperatura ambiente se cuantificó la absorbancia en el equipo Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific) a 450nm. Los porcentajes de viabilidad fueron calculados en base a la absorbancia de los controles sin compuesto (100% de viabilidad). Se identificó la concentración más alta de los compuestos a la cual la viabilidad celular fuera igual o mayor del 80% (asumiendo como 100% de viabilidad la absorbancia obtenida en los cultivos control sin tratamiento). Esta concentración se usó en las diferentes estrategias antivirales realizadas posteriormente.

4.4 Estrategias antivirales *In vitro*

4.4.1 Estrategia de tratamiento combinado

Se realizó la siembra de $6,0 \times 10^4$ células VERO/pozo en platos de 48 pozos y se incubaron durante 24h. Pasado el tiempo de incubación, se retiraron los sobrenadantes y se agregaron los compuestos a la concentración definida en el ensayo de MTT para llevarse a incubar por 24h (PRE-tratamiento). Pasado este tiempo, se prepararon mezclas 1:1 de virus con cada compuesto y se llevaron a incubar por 1h a 4°C. Luego de esta incubación se agregaron las mezclas y se llevaron a 37 °C por 2h (TRANS-tratamiento). Finalizado ese tiempo, se adicionaron nuevamente los compuestos, para ser incubadas por 24h adicionales (POST-tratamiento). Al siguiente día, se recolectaron y se almacenaron los sobrenadantes a -80° C para ser procesados mediante el ensayo de plaqueo. Los controles sin compuesto (CSC) fueron células infectadas sin adición de compuestos.

4.4.2 Estrategia de actividad viricida (TRANS-tratamiento)

Se realizaron mezclas 1:1 del virus con el compuesto que fue definido como más promisorio en la estrategia y se llevaron a incubar 1h a temperatura ambiente. Tras el tiempo de incubación, se hicieron diluciones seriadas en base 10 de las mezclas para titular mediante la técnica de plaqueo en células VERO. Se usó la radiación ultravioleta (UV) como control de inhibición teniendo en cuenta que tiene una acción directa en la partícula viral específicamente en el material genético [138]. Los controles sin compuesto (CSC) fueron infectados y posterior a 2h de incubación, el inóculo fue remplazado por carboximetilcelulosa (CMC) al 1,5% con DMEM 1X suplementado al 2% de SFB.

4.4.3 Estrategia de tratamiento previo a la infección (PRE-tratamiento)

Se sembraron $3,0 \times 10^4$ células VERO/pozo en platos de 96 pozos y tras 24h de incubación se retiraron los sobrenadantes para agregar el compuesto más promisorio llevándose a incubar nuevamente. Al siguiente día se retiró el tratamiento y, se inocularon las monocapas y se incubaron por 2h. Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el inóculo para agregar medio DMEM 1X suplementado con 2% de SFB y se llevó a incubar nuevamente por 24h. Finalizado este tiempo, los sobrenadantes y las monocapas fueron recolectadas y almacenadas a -80°C (para ser procesadas por ensayo de plaqueo y RT-qPCR, respectivamente); mientras que monocapas hermanas fueron fijadas y almacenadas a 4°C para ser procesadas por (cell-ELISA). Para esta estrategia se eligió cloroquina (Sigma-Aldrich®) como control de inhibición.

4.4.4 Estrategia de tratamiento posterior a la infección (POST-tratamiento)

Se realizó la siembra de $3,0 \times 10^4$ células VERO/pozo en platos de 96 pozos y luego de 24h de incubación se infectaron las monocapas por 2h. Posterior a la infección, se retiró el inóculo y se añadió el compuesto más promisorio para incubar nuevamente por 24h. Pasado el tiempo de incubación los sobrenadantes y las monocapas fueron evaluados por ensayo de plaqueo y RTqPCR respectivamente fueron recolectadas y almacenadas a -80°C mientras que las monocapas evaluadas por Cell-ELISA fueron fijadas y almacenadas a 4°C. En esta estrategia se usó ribavirina (Sigma-Aldrich®, SigmaAldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EE. UU.) como control de inhibición.

4.5 Cuantificación de la infección

A partir de los sobrenadantes y monocapas recolectadas o fijadas, se realizó la cuantificación de la infección usando tres diferentes: ensayo de placa, RT-qPCR y Cell-ELISA. En todos los casos el porcentaje de infección fue calculado a partir de la relación del resultado obtenido sobre el control sin compuesto (CSC) el cual tomamos como el 100% de infección.

4.5.1 Cuantificación de partículas virales infecciosas

Para la cuantificación de partículas virales infecciosas se realizó la titulación por formación de placa descrita previamente [134]. Se realizaron diluciones seriadas en base 10 de los sobrenadantes previamente recolectados de cada estrategia antiviral y se adicionaron por duplicado sobre monocapas de células VERO sembradas 24h previas a la infección. Luego de 2h de incubación, se retiraron los inóculos y se agregó CMC al 1,5% con DMEM 1X suplementado al 2% de SFB. Tras los días de incubación correspondientes a cada modelo viral (DENV-2 12 días, ZIKV/Col 7 días y CHIKV/Col 3 días), se retiró el medio semisólido y se hicieron lavados con PBS 1X para finalmente fijar la monocapa con paraformaldehído (PFA) al 4%. Posteriormente se retiró el PFA y se tiñeron las monocapas con cristal violeta. Luego se lavaron con PBS y se determinaron las unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL) a partir del conteo de placas obtenidas en cada condición.

4.5.2 Cuantificación de proteínas virales

Para la cuantificación de proteína viral se realizó Cell-ELISA de las monocapas previamente fijadas con PFA [134]. Se usó Triton X-100 al 0.1% por 30min para permeabilizar las monocapas, seguido de la inactivación de la acción de las peroxidasas celulares con 0.3% de H₂O₂ preparado en metanol al 10% diluido en PBS 1X. Luego de 30m a temperatura ambiente se lavaron las monocapas y se bloquearon los sitios inespecíficos con SFB al 10% diluido en PBS y se llevaron a incubar 30min a temperatura ambiente. Se agregaron los anticuerpos primarios de ratón anti-NS1 para detección de ZIKV, anti-E2 para detección de CHIKV (ClonA54Q y EA88, respectivamente; Thermo Fisher Scientific®) y anti-E para detección de DENV preparados en SFB al 5% y se dejaron incubando toda la noche a 4°C. Al siguiente día, las monocapas fueron lavadas para adicionar el anticuerpo secundario anti-ratón IgG acoplado a peroxidasa (BioRad®), el cual se incubó por 30min. Se realizaron lavados a las monocapas nuevamente para adicionar finalmente TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina). La lectura de las absorbancias se hizo a 620 nm en el lector de ELISA Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific®).

4.5.3 Cuantificación de genoma viral intracelular

Para la cuantificación absoluta de copias genómicas, se realizó la extracción y purificación del ARN viral de las monocapas mediante el kit de extracción MGIEasy Nucleic Acid Extration, de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante. La calidad y cantidad de ARN se determinó en un espectrofotómetro NANODROP™ ONE/ONEC (Thermo Fisher Scientific®). Primero se realizó la síntesis de ADNc con el kit High Capacity cDNA reverse transcription (Thermo Fisher Scientific®) según las instrucciones del fabricante. Finalmente, para la qPCR se utilizó el kit PowerUp™ SYBR Green Master Mix (ThermoFisher Scientific®) usando protocolos y cebadores descritos anteriormente [134, 139]. Para DENV-2/S16803, se utilizaron cebadores específicos dirigidos que amplifican un fragmento de 119pb de la región C-prM (mD1-F-5'-TCA ATA TGC TGA AAC GCG AGA GAA ACC G-3' y mTS2-F-5'-CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG TTT-3'); el perfil térmico utilizado fue 95°C por 5min, 35 ciclos de 30 s a 95°C, 45s a 55°C y 45 s a 72°C, con una extensión final a 72°C por 10min. Para ZIKV/Col se usaron cebadores específicos que amplifican un fragmento de 76 pb de la proteína E (1086F 5'-CCGCTGCCCAACACAAG-3' y 1162c 5'-CCACTAAYGTTCTTTGCAGACAT-3'); mientras que para CHIKV se usaron cebadores para amplificar un fragmento de 125pb de la proteína NSP4 (6856F 5' TCACTCCCTGTTGACTTGATAGA 3' y 6981c 5' TTGACGAACAGAGTTAGGAACATACC 3'); ambos con un perfil térmico de un ciclo de un ciclo de 50°C por 2min y 95°C por 10min, 40 ciclos de 95°C por 15s y una extensión final de 60°C por 1min. La cuantificación

absoluta de las copias genómicas se realizó mediante el uso de curvas obtenidas a partir de plásmidos clonados con las regiones específicas para cada virus [134, 140].

4.6 Determinación del índice de selectividad (IS)

El índice de selectividad con el compuesto más promisorio se calculó a partir de la relación entre la concentración citotóxica al 50% (CC50) y la concentración efectiva 50% (EC50). Para la determinación del CC50 se realizó usando el ensayo MTT descrito previamente en la sección 4.3. Para el EC50 se usó una estrategia de tratamiento combinado (descrita en la sección 4.4.1) en dosis/respuesta usando concentraciones en base 2 desde 15,6 μM hasta 250 μM del compuesto. Se recolectaron los sobrenadantes para la evaluación de la partícula viral infecciosa mediante en ensayo de plaqueo. Los valores de EC50 y CC50 se calcularon a partir de un modelo de regresión no lineal (logístico logarítmico) mediante el programa R Studio.

4.7 Acoplamiento molecular

El compuesto más prometedor se modeló en el software ACD/ChemSketch® 12.01. Se realizó la búsqueda y selección de proteínas virales estructurales y no estructurales de DENV, ZIKV y CHIKV que tuvieran una resolución menor a 3.0 Å. Todas las estructuras de las proteínas así como el compuesto fueron tratadas en el software Python Molecular Viewer (PMV) [141]. Este tratamiento consistió en la eliminación de moléculas de agua, adición de átomos polares y el cálculo de las cargas de Gasteiger-Marsili, para minimizar la energía del sistema [116]. Se hizo la selección de los mejores sitios de unión proteína-ligando mediante la plataforma Peptimap [140] o mediante bibliografía previamente publicada. Por último, se corrió el acoplamiento molecular por triplicado usando el software Autodock vina® con una exhaustividad de 10. El archivo de salida se visualizó junto con la proteína; y para obtener las interacciones formadas se usaron programas como PMV (diagramas en 3D) o LigPlot® (diagramas bidimensionales) [140].

4.8 Análisis estadístico

Se determinó la normalidad de los datos usando la prueba de Shapiro Wilk. Para los datos que presentaron una distribución normal se utilizó t-Student y para los datos que presentaron una distribución no normal se realizó la prueba de U de Mann Whitney. En todos los análisis estadísticos se consideró $p < 0.05$ como una diferencia estadísticamente significativa respecto al control de células sin compuesto.

5 RESULTADOS

5.1 Los compuestos dihalogenados derivados de la tiramina no afectaron la viabilidad de las células VERO.

Se evaluó el efecto de ocho compuestos dihalogenados derivados de la tiramina sobre la viabilidad de células VERO mediante el ensayo MTT a concentraciones seriadas en base dos. En los compuestos del grupo IA, el porcentaje de viabilidad celular con el compuesto YDC-2M fue del 73,1% a la mayor concentración evaluada de 500 μM , a diferencia del compuesto YDC-3M que obtuvo un porcentaje del 83,9%. A la menor concentración evaluada (7,8 μM), el porcentaje de viabilidad obtenido en los cultivos tratados con estos dos compuestos fue de 101,2% y 101,4% respectivamente. Por otra parte, a 500 μM , la viabilidad celular presentada por los compuestos del grupo IB fue del 61,9% y del 83,8% para los compuestos YDB-2M y YDB-3M; mientras que, a la concentración mínima evaluada, se obtuvo una viabilidad celular del 99,0% y 105,1%, respectivamente (figura 2).

A la concentración de 500 μM se obtuvo un porcentaje de viabilidad celular superior al 95 % para los compuestos YODC-2M y YODB-3M, similar al porcentaje de viabilidad obtenido a la concentración de 7,8 μM que fue del 103,5 % y del 97,13%. La viabilidad en las células para las tiraminas metoxiladas de tipobromadas (grupo II.A.) fue de 76,8% y 82,3 % respectivamente para YODB-2M y YODB-3M a la concentración de 500 μM mientras que a la menor concentración fue de 95,2% y 97,7% respectivamente.

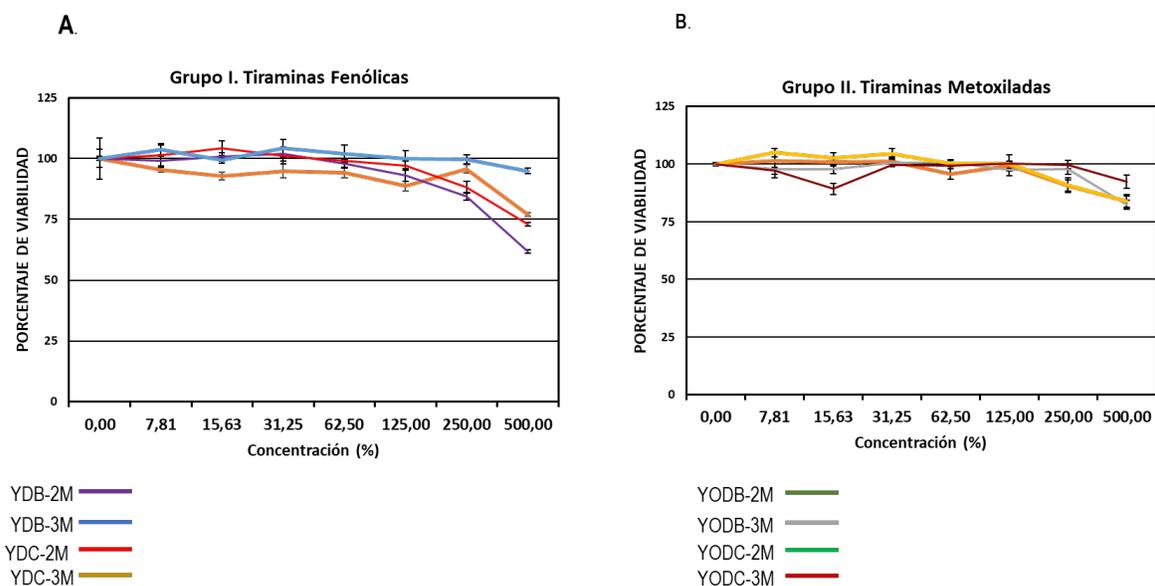


Figura 2 Evaluación de la viabilidad de células VERO al ser tratadas con los compuestos. Se evaluaron concentraciones seriadas en base 2 desde 7.8 μM hasta 500 μM. A concentración de 250 μM de los compuestos. Se obtuvieron viabilidades superiores al 80% en todos los compuestos. En todos los casos, la concentración cero (0) el control sin compuesto se asumió como 100% de viabilidad, Las barras de error indican el error estándar de la media (n:6).

Para todas las concentraciones evaluadas, los porcentajes de viabilidad obtenidos en células VERO fueron dependientes de concentración de cada compuesto. Teniendo en cuenta que la concentración máxima la cual los ocho compuestos obtuvieron un porcentaje de viabilidad superior o igual al 80% fue 250 μM, se decidió usar esta concentración para los ensayos antivirales posteriores. Para los controles de inhibición de cada estrategia, se seleccionó la concentración reportada previamente [134].

5.1 Los compuestos YDB-3M, YODC-3M y YODB-3M inhiben partículas virales infecciosas en células VERO infectadas por DENV-2/S16803.

Se realizó un tamizaje antiviral mediante la estrategia de tratamiento combinada para la identificación de compuestos que inhiban la producción de partículas virales infecciosas de DENV-2/S16803 (figura 3A). Con los compuestos de tipo fenólicos clorados (grupo IA), se obtuvo un aumento estadísticamente significativo de las partículas virales infecciosas frente al control sin compuesto ($1,18 \times 10^6$ UFP/mL). Con el compuesto YDC-2M se obtuvo un porcentaje del 815,6% ($1,15 \times 10^7$ UFP/mL), así como con el compuesto YDC-3M se obtuvo un porcentaje de infección del 122,3% ($1,00 \times 10^6$ UFP/mL). De igual manera sucedió con uno de los compuestos de tipo fenólico bromados (IB), el compuesto YDB-2M, con el cual se obtuvo un porcentaje de infección del 943,3% ($1,75 \times 10^7$ UFP/mL); mientras que su compuesto análogo, el compuesto YDB-3M si disminuyó el porcentaje de infección de manera significativa (16% de infección y $1,55 \times 10^5$ UFP/mL) (figura 3B).

Entre los compuestos del grupo II, con el compuesto YODC-2M se obtuvo un porcentaje de infección del 96,7% ($1,20 \times 10^6$ UFP/mL) no estadísticamente significativo; mientras que con el compuesto YODC-3M, la infección se redujo significativamente en un 54,9% ($5,38 \times 10^3$ UFP/mL). Por su parte, con el compuesto YODB-2M se obtuvo un porcentaje de infección del 325,5% ($1,90 \times 10^6$ UFP/mL) a diferencia de su análogo estructural YODB-3M que presentó un porcentaje de infección del 59,9% ($5,88 \times 10^3$ UFP/mL) los dos

conresultados estadísticamente significativos (figura 3B). Finalmente, se observó una reducción de la infección estadísticamente significativo con ribavirina, el cual fue usado como control de inhibición (2,4%, $1,00 \times 10^4$ UFP/mL).

5.1 Solo el compuesto YDB-3M inhibió la producción de partículas virales infecciosas en la estrategia combinada frente a la infección del virus ZIKV/Col.

Para identificar los compuestos que inhiban la producción de partículas virales infecciosas de ZIKV/Col, se realizó un tamizaje antiviral mediante la estrategia de tratamiento combinada (Figura 3A). Para los compuestos fenólicos clorados (grupo IA), se obtuvieron porcentajes de infección del 94,4% ($1,0 \times 10^2$ UFP/m) y del 114,6 ($2,0 \times 10^2$ UFP/mL) con los compuestos YDC-2M y YDC-3M, sin diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin compuesto ($1,20 \times 10^3$ UFP/mL). En los compuestos del grupo IB, con el compuesto YDB-2M se aumentó significativamente el número de partículas virales infecciosas en un 770,8% ($8,0 \times 10^3$ UFP/mL); mientras que su compuesto análogo de tipo sales de amina cuaternaria YDB-3M, redujo significativamente el porcentaje de infección al 4,2% ($5,00 \times 10^1$ UFP/mL). Por su parte, con los compuestos YODC-2M y YODC-3M se obtuvieron porcentajes de infección de 109,9% ($1,65 \times 10^3$ UFP/mL), 112,0% ($1,55 \times 10^3$ UFP/mL), respectivamente. De manera similar, con los compuestos bromados YODB-2M y YODB-3M se observaron porcentajes de infección del 121,4% ($5,50 \times 10^2$ UFP/mL) y 101,0% ($2,50 \times 10^3$ UFP/mL). En los últimos cuatro casos, no se hubo diferencias estadísticamente significativas. Por último, la ribavirina presentó un porcentaje de infección del 9,4% (UFP/mL) siendo estadísticamente significativo (figura 3C)

5.2 Los compuestos YDB-3M, YODC-2M y YODB-3M inhibieron las partículas virales infecciosas de CHIKV/Col mediante la estrategia combinada.

Se identificaron los compuestos que inhibieron la producción de partículas virales infecciosas de CHIKV/Col mediante un tamizaje antiviral a través de la estrategia de tratamiento combinada al igual que con los modelos virales de flavivirus del presente estudio (Figura 3A).

Para los compuestos del grupo IA, es decir, los compuestos fenólicos clorados YDC-2M y YDC-3M se obtuvo un aumento en la producción de partículas virales infecciosas de un 261,8% ($3,30 \times 10^6$ UFP/mL) y un 292,7% ($4,90 \times 10^6$ UFP/mL) al igual que el compuesto del grupo IIB, YDB-2M, que aumentó la infección en un 333,0% ($5,00 \times 10^6$ UFP/mL) con respecto al control sin compuesto ($1,25 \times 10^6$ UFP/mL) siendo estadísticamente significativos. Por su parte, con el compuesto YDB-3M, se redujo significativamente el porcentaje de infección en un 53,8% ($3,10 \times 10^5$ UFP/mL) (figura 3D).

En cuanto a los compuestos del grupo IIA, con los compuestos de tipo metoxilados clorados, se obtuvo un porcentaje de infección del 91,5% ($1,35 \times 10^5$ UFP/mL) y del 136,6% ($1,35 \times 10^6$ UFP/mL) para los compuestos YODC-2M y YODC-3M, respectivamente. Por otra parte, los compuestos del grupo IIB, es decir, las tiraminas metoxiladas bromadas, se encontró un aumento en el porcentaje de infección en un 323,6% ($1,65 \times 10^5$ UFP/mL) para el compuesto YODB-2M, mientras que el compuesto YODB-3M, redujo el porcentaje de infección al 23,7% ($3,50 \times 10^5$ UFP/mL), ambos estadísticamente significativos respecto al control sin compuesto (figura 3D). Finalmente, con la ribavirina se obtuvo un porcentaje de infección del 13,5% (UFP/mL).

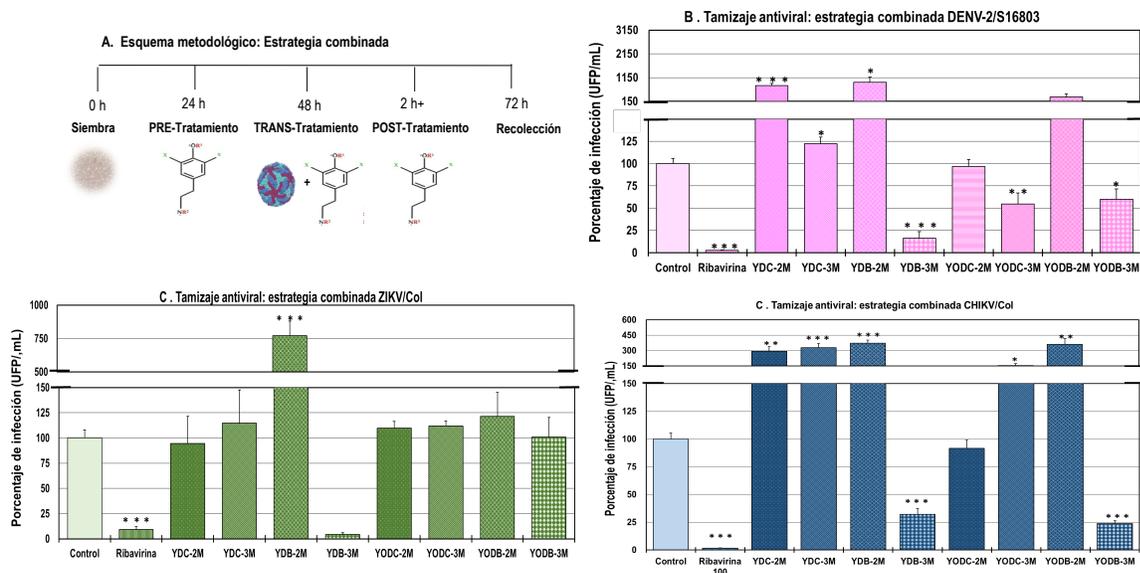


Figura 3. Tamizaje antiviral de los compuestos derivados de las tiraminas frente a la infección por DENV-2/S16803, ZIKV/Col y CHIKV/Col.

Se realizó un tamizaje antiviral mediante una estrategia combinada. El compuesto YDB-3M inhibió la formación de UFP en los tres modelos virales evaluados. En todos los casos, el control representa el control sin compuesto, que se asumió como 100% de infección. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control sin compuesto ($p < 0.05$, $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$; t-Student) y las barras de error indican el error estándar de la media ($n:4$).

5.3 El compuesto YDB-3M inhibe la producción de partícula viral infecciosa a diferentes concentraciones.

Teniendo en cuenta que solo con el compuesto YDB-3M inhibió significativamente los tres modelos virales, se decidió evaluar este compuesto a concentraciones en base dos desde $15,6\mu\text{M}$ hasta $250\mu\text{M}$ mediante la estrategia combinada anteriormente descrita. A la concentración de $250\mu\text{M}$ la producción de partículas virales infecciosas se redujo en un 11,0%, 0,0% y 7,4% respectivamente para DENV-2/S16803, ZIKV/Col y CHIKV/Col y a la mínima concentración evaluada de $15,6\mu\text{M}$ se obtuvo el mayor porcentaje de infección siendo para DENV-2/S16803 del 57,3%, para ZIKV/Col del 41,6% y finalmente para CHIKV/Col del 41,4%. En todas las concentraciones hubo inhibición estadísticamente significativa en relación con el control sin compuesto ($p < 0,05$). La concentración citotóxica al 50% para el compuesto YDB-3M fue de $1447,19\mu\text{M}$. Para cada uno de los virus se obtuvo una concentración efectiva al 50% mayores a $10\mu\text{M}$ (tabla 1). A partir de estos valores se calculó el índice de selectividad los cuales fueron 58,2; 69,0 y 142,8 para DENV- 2/S16803, ZIKV/Col y CHIKV/Col, respectivamente (tabla 1).

Finalmente, teniendo en cuenta que a la concentración de $250\mu\text{M}$ se mantuvo el mejor porcentaje de inhibición del compuesto YDB-3M, se decidió usar esta concentración para las estrategias antivirales individuales (PRE-tratamiento, TRANS-tratamiento y POST-tratamiento) frente a la infección por DENV- 2/S16803, ZIKV/Col y CHIKV/Col.

Tabla 1 Valores de concentración citotóxica al 50 % (CC50), concentración efectiva al 50 % (EC50) e índice de selectividad (IS) del compuesto YDB-3M evaluados en células VERO infectadas con DENV-2/S16803, ZIKV/Col y CHIKV/Col

		CC50 (μM)	CE50 (μM)	IS
YDB-3M	DENV-2/S16803	1447,2	24,8	58,3
	ZIKV/Col	1447,2	21,0	69,0
	CHIKV/Col	1447,2	10,1	142,8

5.1 El compuesto YDB-3M no tiene una actividad viricida en la partícula viral de DENV-2/S16803, ZIKV/Col y CHIKV/Col

Mediante la estrategia TRANS-tratamiento se evaluó la actividad viricida de la tiramina YDB-3M frente a las partículas virales de DENV-2/S16803, ZIKV/Col y CHIKV/Col (figura 4A). Se obtuvieron porcentajes de infección del 85,3% ($7,25 \times 10^4$ UFP/mL) para DENV-2/S16803 (figura 4B) y del 112,1% ($8,50 \times 10^4$ UFP/mL) para ZIKV/Col (figura 4C) con relación a sus controles sin compuesto ($8,50 \times 10^4$ UFP/mL y $7,58 \times 10^4$ UFP/mL, respectivamente), porcentajes que no fueron estadísticamente significativos. Por su parte, para CHIKV/Col, se evidenció un aumento de la producción de partículas virales infecciosas en un 161,9% ($3,06 \times 10^4$ UFP/mL) siendo estadísticamente significativo frente al control sin compuesto ($1,89 \times 10^4$ UFP/mL) (figura 4D).

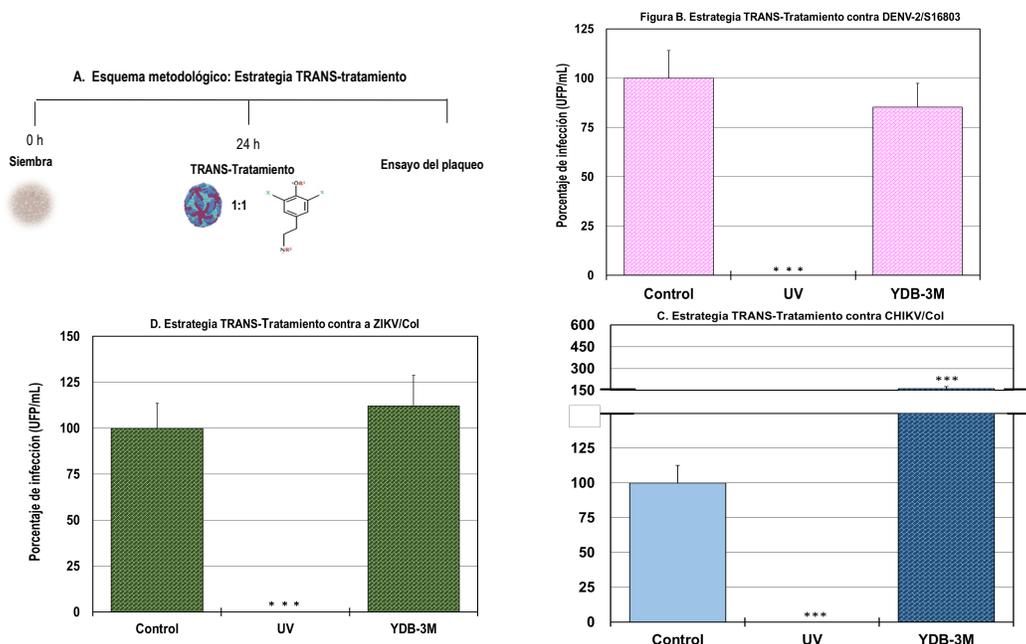


Figura 4 Estrategia TRANS-tratamiento. Se realizó una estrategia TRANS-tratamiento para la evaluación de la posible actividad viricida del compuesto YDB-3M. No se obtuvo actividad directa del compuesto en las partículas virales de DENV- 2/S16803, ZIKV/Col y CHIKV/Col. En todos los casos, el control representa el control sin compuesto, que se asumió como 100% de infección. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control sin compuesto ($p < 0.05$, $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$; t-Student) y las barras de error indican el error estándar de la media (n:4).

5.1 El tratamiento previo con el compuesto YDB-3M no inhibe la infección por Flavivirus, mientras que para el modelo Alfvirus inhibe producción de partículas virales infecciosas.

Se realizó una estrategia PRE-tratamiento para evaluar si el compuesto YDB-3M tenía actividad previa a la infección por DENV-2/S16803, ZIKV/Col y CHIKV/Col lo cual indicaría una asociación a etapas iniciales al ciclo replicativo viral o a factores celulares (figura 5A). Para esto, se cuantificó el porcentaje de infección mediante ensayo de placa, Cell-ELISA y RT-qPCR.

Para DENV-2/S16803, se obtuvo un aumento del porcentaje de infección del 650,4% ($5,00 \times 10^4$ UFP/mL) de la producción de partículas virales infecciosas al igual que las copias genómicas que aumentaron un 293,8% ($1,19 \times 10^5$ copias genómicas/mL) de manera estadísticamente significativa frente al control sin compuesto. Por otro lado, la cantidad de proteína viral cuantificada fue de un 101,4% sin diferencia estadísticamente significativa en relación con el control (figura 5B). Para ZIKV/Col, se obtuvo un porcentaje de infección de 216,0% ($1,26 \times 10^3$ UFP/mL) el cual fue un aumento estadísticamente significativo frente al control sin compuesto ($5,84 \times 10^2$ UFP/mL). Este mismo comportamiento se observó en la cuantificación de copias genómicas, dado que el compuesto aumentó el porcentaje de infección a un 659% ($2,37 \times 10^6$ copias genómicas/mL); caso contrario al porcentaje de expresión de proteína viral, en donde el porcentaje de infección del 94,8 % sin ser estadísticamente significativo frente al control sin compuesto (figura 5C). En el modelo de infección de CHIKV/Col, se redujo el porcentaje de producción de partícula viral infecciosa en un 69,7% ($1,38 \times 10^6$ UFP/mL) estadísticamente significativo respecto al control sin compuesto ($1,97 \times 10^6$ UFP/mL) mientras que se aumentó la expresión de proteína viral en un 118,7% siendo estadísticamente significativo. Por último, para la cuantificación de copias genómicas, se obtuvo un porcentaje de infección del 85,2% ($5,83 \times 10^6$ copias genómicas/mL) el cual no fue estadísticamente significativo (figura 5D).

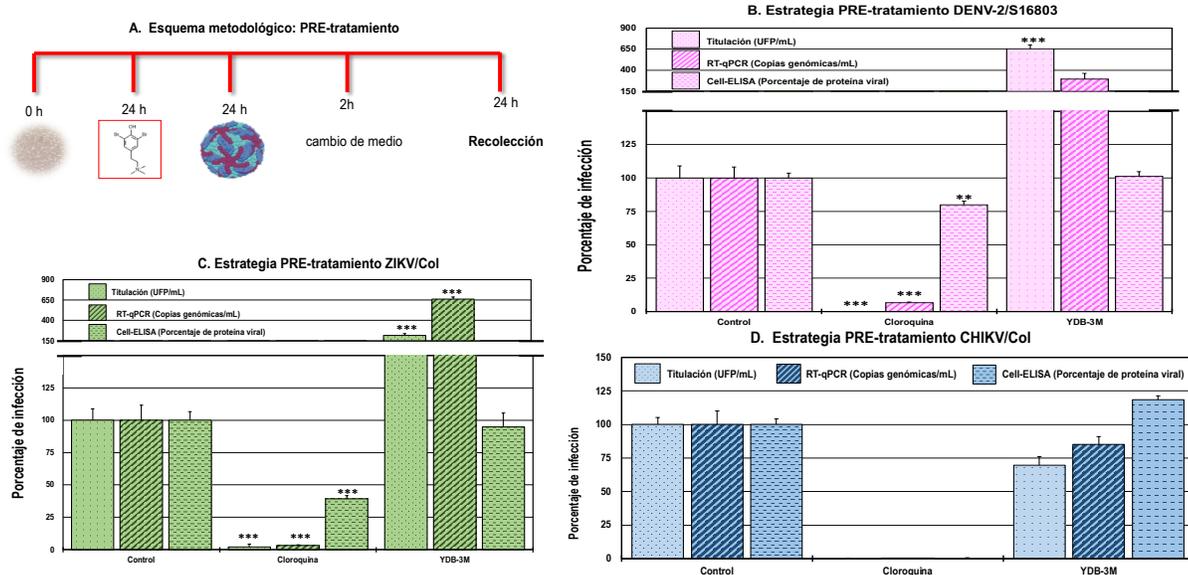


Figura 5 Estrategia PRE-tratamiento. Se realizó una estrategia PRE-tratamiento para la evaluación de la posible actividad antiviral del compuesto YDB-3M en etapas previas a la infección. No se obtuvo actividad antiviral del compuesto YDB-3M en etapas previas a la infección en los modelos Flavivirus evaluados. Se obtuvo una reducción de las UFP/mL en el modelo Alfavirus. En todos los casos, el control representa el control sin compuesto, que se asumió como 100% de infección. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control sin compuesto ($p < 0.05$, $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$; t-Student) y las barras de error indican el error estándar de la media (n:4).

5.2 El compuesto YDB-3M inhibe la infección en células VERO en pasos posteriores a la infección por DENV-2/S16803, ZIKV/Col y CHIKV/Col.

Se realizó una estrategia POST-tratamiento para evaluar si el compuesto YDB-3M tiene actividad posterior a la infección por DENV-2/S16803, ZIKV/Col y CHIKV/Col asociado a etapas del ciclo replicativo viral, como traducción, síntesis de copias genómicas (figura 6A). Para esto, se cuantificó el porcentaje de infección mediante ensayo de placa, Cell-ELISA y RT-qPCR.

Para los cultivos infectados con DENV-2/S16803, se redujo la producción de partículas virales infecciosas en un 10,8% ($1,25 \times 10^3$ UFP/mL) estadísticamente significativo frente al control sin compuesto ($1,16 \times 10^4$ UFP/mL); así como la inhibición de la expresión de la proteína viral la cual fue de 17,8%. Sin embargo, este compuesto no inhibió copias genómicas en monocapas infectadas (82,6%; $4,66 \times 10^4$ copias genómica/mL) (figura 6B). Para ZIKV/Col, se observó una disminución estadísticamente significativa del porcentaje de infección al 8.2% ($3,75 \times 10^1$ UFP/mL); al igual que el porcentaje de expresión de proteína viral, donde se obtuvo un porcentaje de infección del 82,1%. Por último, el compuesto YDB-3M inhibió la síntesis de copias genómicas en un 98,5% ($2,20 \times 10^7$ copias genómicas/mL) estadísticamente significativo con respecto al control sin compuesto ($1,51 \times 10^9$ copias genómicas/mL) (figura 6C). Finalmente, para CHIKV/Col, con el compuesto YDB-3M se obtuvo la disminución del porcentaje de producción de partículas virales infecciosas en un 36,3% ($1,36 \times 10^6$ UFP/mL) al igual que la expresión de proteína viral, la cual obtuvo un porcentaje de infección del 75,4%. Finalmente, este compuesto también reduce el porcentaje de copias genómicas a un 51,2% ($3,55 \times 10^6$ copias genómicas/mL). Todos los resultados fueron estadísticamente significativos frente al control sin compuesto (figura 6D).

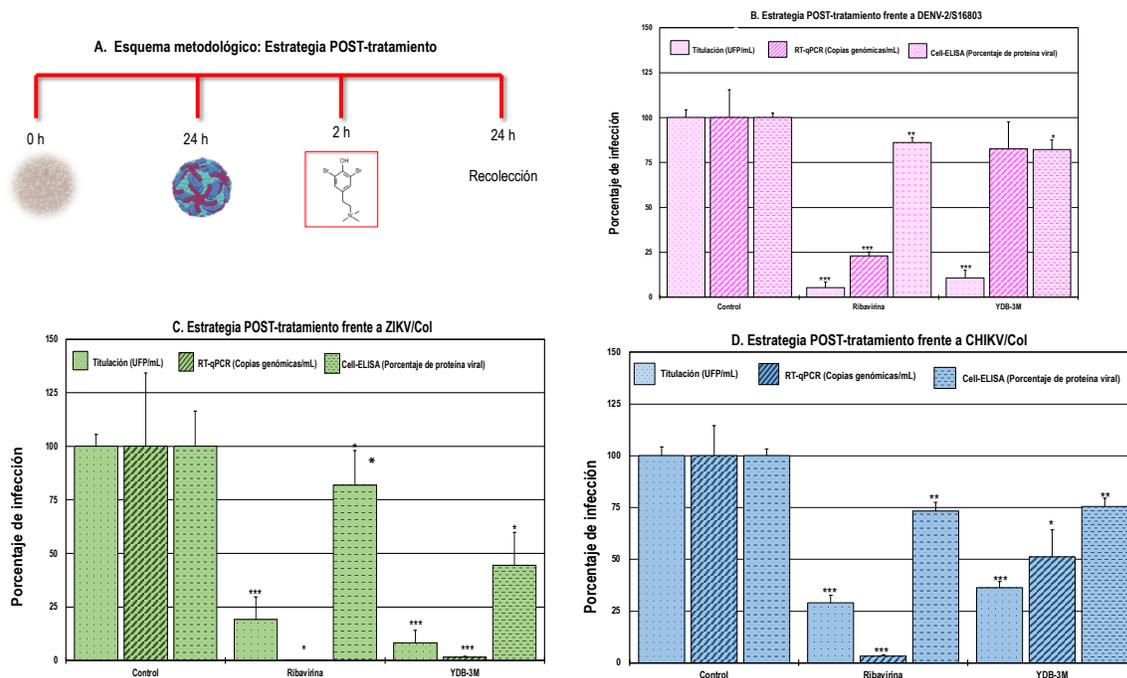


Figura 6 Estrategia POST-tratamiento. Se realizó una estrategia POST-tratamiento para la evaluación de la posible actividad antiviral del compuesto YDB-3M en etapas posteriores a la infección. Se obtuvo actividad antiviral del compuesto YDB-3M en los tres modelos virales evaluados. En todos los casos, el control representa el control sin compuesto, que se asumió como 100% de infección. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control sin compuesto ($p < 0.05$, $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$; t-Student) y las barras de error indican el error estándar de la media (n:4).

5.1 El compuesto YDB-3M presentó interacciones favorables con la proteína NS5 en los modelos Flavivirus, mientras que para el modelo Alfavirus la interacción favorable fue con el macrodominio de la proteína NSP3.

Con el fin de proponer un posible mecanismo de acción del compuesto YDB-3M se utilizaron herramientas *in silico*. En la tabla 2 se muestran las interacciones entre este compuesto y algunas proteínas virales.

Para DENV se obtuvo la mejor energía de unión con la proteína NS5 dominio metiltransferasa ($-5,57 \pm 0,06$ kcal/mol), donde se formaron dos puentes de hidrógeno con THR104 y LYS105 con distancias de 2,81 y 3,10 Å; además de la formación de 2 interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos ILE147 y PHE133. Por otro lado, para ZIKV la proteína NS3 dominio helicasa y NS5 dominio polimerasa obtuvieron las mejores energías de unión siendo $-5,30 \pm 0,00$ kcal/mol, para ambos casos. Sin embargo, para el primer complejo (YDB-3M/NS3) se formó un puente de hidrógeno con el aminoácido ASP410 con una distancia de 3,02 Å con dos interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos PHE289 e HIS486; mientras que para el complejo YDB-3M y NS5pol se obtuvo un puente de hidrógeno con el aminoácido ASP665 a una distancia de 2,98 Å con tres interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos LEU683, LYS688 y ASN616. Finalmente, para CHIKV, este compuesto obtuvo la mejor energía de unión de $-5,63 \pm 0,23$ kcal/mol con la proteína NSP3 macrodominio; con seis interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos ALA22, VAL113, GLY30, ASN24, TYR114, ASP31.

Tabla 2 Interacciones in silico entre el compuesto YDB-3M y algunas proteínas virales.

Virus	Proteína	Código PDB	Energía libre de unión (Kcal/mol)	Cantidad de puentes de hidrógeno	Aminoácidos implicados en la formación de los puentes de hidrogeno	Distancia de los puentes de hidrógenos (Å°)	cantidad de interacciones hidrofóbicas	Aminoácidos que hacen parte de las interacciones hidrofóbicas
ZIKV	Envoltura	5JHM	-4,50 ± 0,00	1	LYS373	2,87	4,00	GLY145, VAL364, MET374, SER146
ZIKV	Cápside	5YGH	-4,67 ± 0,06	N/A	N/A	N/A	3,00	ARG45, PHE84, ALA49
ZIKV	NS5	5U04	-5,30 ± 0,00	2	ASP665, ARG542	2,98	3,00	LEU683, LYS688, ASN616
ZIKV	NS1	5K6K	-3,80 ± 0,00	N/A	N/A	N/A	5,00	THR301, GLY328, ARG324, PRO281, CYS329
ZIKV	NS2B/NS3 proteasa	5GJ4	-4,33 ± 0,06	N/A	N/A	N/A	6,00	ASP129, SER160, ALA127, ASN70, LEU128, GLY69
ZIKV	NS3 Helicasa	5MFX	-5,30 ± 0,00	1	ASP410	3,02	2,00	PHE289, HIS486
DENV	Envoltura	3UZV	-4,40 ± 0,00	1	GLY349	2,83	2,00	MET301, LEU351
DENV	NS5-pol	5K5M	-5,57 ± 0,06	1	SER796	3,28	7,00	LEU512, HIS711, MET761, LEU734, ARG737, TYR758, THR794
DENV	NS5-GTP	2P41	-4,80 ± 0,00	N/A	N/A	N/A	3,00	PHE25, SER150, LEU17
DENV	NS5-SAM	2P41	-5,97 ± 0,06	2	THR104, LYS105	2,81 - 3,10	3,00	ILE147, Phe133, GLU149
DENV	NS2B/NS3	2FOM	-5,77 ± 0,06	N/A	N/A	N/A	6,00	LEU18, PHE46, HIS60, LEU58, ILE25, TYR23
CHIKV	E2B	3N44	-5,33 ± 0,06	1	ALA41	2,90	6,00	ASP132, ASN39, LYS245, HIS130, LYS241, PRO134
CHIKV	C proteasa	5H23	-4,33 ± 0,06	N/A	N/A	N/A	2,00	GLU163, PHE154
CHIKV	NS2P proteasa	3TRK	-5,20 ± 0,00	2	TYR1047, TRP1084	2,82 - 3,07	4,00	ALA1046, LEU1205, MSE1242, TYR1079
CHIKV	NSP2 helicasa	6JIM	-5,50 ± 0,00	N/A	N/A	N/A	5,00	ALA165, VAL92, HIS258, PHE286, GLU95
CHIKV	NSP3 macrodominio	3GPG	-5,63 ± 0,23	N/A	N/A	N/A	6,00	ALA22, VAL113, GLY30, ASN24, TYR114, ASP31

Por otro lado, en la figura 7 se muestran las representaciones de las posibles interacciones *in silico* del compuesto YDB-3M con las poses del compuesto y las proteínas con las cuales se obtuvo las mejores energías de unión en cada modelo viral.

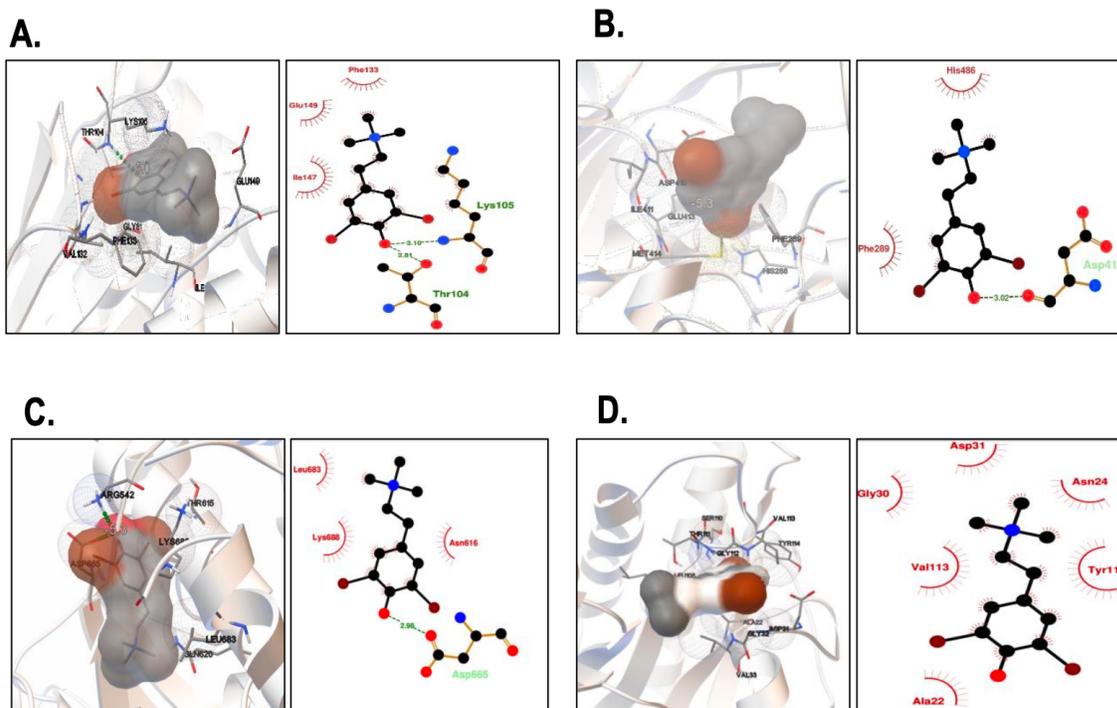


Figura 7 Interacciones *in silico* entre algunas proteínas virales y el ligando YDB-3M. Imágenes obtenidas con PMV (izquierda) y LigPlot2+ (derecha), donde se muestran las representaciones de las posibles interacciones *in silico* del compuesto YDB-3M con las poses del compuesto y las proteínas con las cuales se obtuvo las mejores energías de unión en cada modelo viral, siendo NS5 dominio SAM en el caso de DENV-2 (A), NS3 dominio helicasa y NS5 dominio polimerasa en el caso de ZIKV (B y C, respectivamente) y NSP3 macrodominio en el caso de CHIKV (D).

6 DISCUSION

Los virus DENV, ZIKV y CHIKV representan una preocupación en la salud pública a nivel mundial [142]. Se ha reportado la capacidad de estos virus de co-infectar permitiendo que a nivel asistencial sea complejo el diagnóstico basado en sintomatología [8, 143]. A lo anterior, se le suma la falta de un tratamiento antiviral específico por lo que es necesario el estudio de compuestos con posible actividad antiviral [127]. En este estudio se evaluaron ocho compuestos sintetizados químicamente derivados de la tiramina (figura 1) como posibles candidatos a la inhibición de la infección por DENV, ZIKV y CHIKV.

Para la identificación de los compuestos con potencial antiviral y su posible mecanismo de acción se realizaron diferentes estrategias antivirales reportadas previamente [134]. En un primer momento, se determinó la viabilidad celular de los ocho compuestos en células VERO para elegir la concentración de uso. Posterior a esto, se realizó un tamizaje antiviral mediante una estrategia combinada donde se seleccionaron los compuestos que tuvieron una actividad antiviral para cada modelo viral. Estos se evaluaron usando estrategias antivirales individuales: tratamiento previo a la infección (estrategia PRE-tratamiento) tratamiento posterior a la infección (estrategia POST-tratamiento), o un efecto directo a la partícula viral o actividad viricida (estrategia TRANS-tratamiento). Se usaron técnicas como ensayo de placa, RT-qPCR y CELL-ELISA para la cuantificación del porcentaje de infección. Por último, se realizaron estrategias *in silico* de cada compuesto con diferentes proteínas virales previamente descritas.

Se obtuvieron porcentajes de viabilidad en células VERO mayor al 80% evaluada por MTT a una concentración de 250 μ M descartando la posibilidad de un efecto citotóxico significativo de los compuestos como explicación a la inhibición viral en las estrategias antivirales usadas. Por otro lado, a esta misma concentración, se ha reportado que compuestos análogos estructuralmente derivados de la L-tirosina la viabilidad fue superior al 90% en células VERO y mayor al 78% en células U937 [134]. En células U937-MAGI, el compuesto 3,5-dibromoN,N,N,O-tetramethyltyraminium que es estructuralmente similar a YDB-3M obtuvo un porcentaje alrededor del 50 % a concentraciones de 40 μ M [144]. Evidenciando que la viabilidad de estos compuestos es dependiente del modelo celular evaluado.

Para el tamizaje antiviral mediante la estrategia combinada, el compuesto YDB-3M inhibió la partícula viral infecciosa en células VERO en los tres modelos virales evaluados. Para los modelos virales de flavivirus *Flavivirus* evaluados se reportó el aumento del porcentaje de infección con un compuesto análogo estructural derivado de la L-tirosina [134]. Posiblemente la ausencia del grupo carboxilo en la estructura química esté implicado en el mecanismo antiviral de este compuesto frente a la infección de *Flavivirus*. Sin embargo, estudios previos demostraron la participación del grupo carboxilo influye positivamente en la actividad antiviral en DENV, debido a la interacción entre las cargas negativas proporcionada por los grupos carboxilos con las cargas positivas de la glicoproteína viral [145]; por lo que la relación de estructura y la actividad antiviral no se podría determinar basado en este grupo funcional.

En este estudio se reportó por primera vez la actividad antiarboviral del compuesto YDB-3M frente a DENV- 2/S16803, ZIKV/Col y CHIKV/Col. De la misma forma, se determinó una CC50 superior a la CE50, por lo que se espera que, en un contexto terapéutico, se necesite una concentración muy alta para generar un efecto citotóxico en las células. Hasta el momento existe reporte de IS de compuestos derivados sintetizados derivados de la tiramina, sin embargo, como se mencionó previamente, compuestos estructuralmente similares obtuvieron concentraciones CC50 menores a las obtenidas en este estudio [146]. Lo anterior pudo haber sido por el uso de una línea celular diferente a VERO.

El tratamiento previo con el compuesto YDB-3M frente a la infección por DENV-2/S16803 y ZIKV/Col aumentó significativamente el número de partículas virales infecciosas y de copias genómicas. Cabe resaltar que esta estrategia evalúa la posibilidad de interacción del compuesto con proteínas celulares implicadas en el ciclo replicativo de cada modelo viral. Teniendo en cuenta lo anterior, se ha descrito que la enzima L-dopa descarboxilasa está implicada en la biosíntesis de trazas de aminas, como lo son las tiraminas [147]. En

el ciclo replicativo de DENV, se reportó que la inhibición de esta proteína favorece la replicación y síntesis de la progenie viral [148]. Por lo que el compuesto YDB-3M probablemente está interactuando con la proteína DCC dando una posible explicación a los resultados obtenidos en los modelos de Flavivirus evaluados. Como control positivo de inhibición se usó la Cloroquina, dado que su principal mecanismo de acción es dirigido al hospedero (HDA), relacionado al aumento del pH afectando pasos iniciales al ciclo replicativo como lo es la fusión de la envoltura viral con la membrana de la endosoma descrita previamente para los tres modelosvirales [149-151]

En cuanto a CHIKV/Col, se ha reportado previamente la disminución del título viral en células VERO tratadas previamente con arbidol [126], un compuesto de tipo molécula pequeña como lo es YDB-3M, La inhibición de las partículas virales infecciosas previas al tratamiento también ha sido reportado por compuestos derivados de la L-tirosina, donde los compuestos TDC-2M-ME y TDB-2M-ME obtuvieron un porcentaje de inhibición del 9,6% UFP/mL en células VERO; mientras que en otras líneas celulares como U937 estos compuestos relacionados estructuralmente con YDB-3M, no mostraron inhibición de las partículas virales infecciosas [134]. En ese sentido, sería interesante y necesario evaluar el comportamiento del compuesto YDB-3M en líneas células humanas. Por otra parte, se observó la inhibición no estadísticamente significativa de copias genómicas mientras que hay una acumulación significativa de proteína viral cuantificada. Estadiferencia puede estar basada en el blanco de cada metodología usada, en la que se detectó NSP4 paraevaluar la síntesis de genoma viral mientras que el blanco a detectar en la cuantificación viral es una proteína estructural (E2). Ambas proteínas se expresan a partir de dos ORF diferentes por lo que el compuesto YDB- 3M podría estar modulando la actividad de la RdRp sin afectar la síntesis de proteínas estructurales como la E2 [152]; Estas diferencias encontradas entre la replicación de genoma y síntesis de proteína se ha reportado para CHIKV/Col con otros compuestos pequeños como la rupicolina, donde en células A549 infectadas por CHIKV inhibió la síntesis de la proteína viral E2 sin afectar la replicación del genoma viral [140].

En la evaluación del compuesto YDB-3M posterior a la infección por estos tres modelos virales, se encontró inhibición en la formación de partículas virales infecciosas y en la síntesis de proteína viral en células VERO infectadas por DENV-2/S16803, observado de igualmente en ZIKV/Col y CHIKV/Col donde estos dos últimos incluyen la inhibición de copias genómicas intracelulares. Por lo que se podría postular que el principal mecanismo de acción de este compuesto está en pasos posteriores a la entrada y liberación del genomaviral. Como control de inhibición se usó la Ribavirina, dado que su mecanismo es la inhibición de la guanilación ARN mensajero viral disminuyendo las reservas de los nucleótidos, afectando la traducción y posterior síntesis de proteínas del virus [153, 154].

Se determinaron las interacciones y energías de unión entre el compuesto más promisorio y proteínas virales mediante acoplamiento molecular con el fin de postular un posible mecanismo de acción que se relacionara con los resultados in vitro obtenidos hasta el momento. Las energías menos favorables en los tres modelos virales fueron con las proteínas estructurales (tabla 2), lo cual estaría relacionado con los resultados del ensayo de actividad virucida, donde el compuesto con ninguno de los modelos virales evidenció una acción directa sobre la partícula (figura 2).

Se evidenció que la mejor energía de unión de YDB-3M en el modelo viral de DENV-2 fue con la proteína NS5 dominio metiltransferasa específicamente con la región SAM (figura 7), lo cual podría relacionarse con la actividad antiviral que fue evidenciada tanto en estrategia combinada y como en el post-tratamiento. Dicha interacción simuló la formación de puentes de hidrógenos con aminoácidos como Thr104 y Lys105 que previamente han sido reportados en el sitio de unión de esta proteína [155]. En cuanto a ZIKV, las mejores energías de unión fueron con las proteínas NS3 dominio Helicasa y NS5 dominio RdRp (figura 7), esta afinidad, así como las interacciones moleculares predicha (puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas) podrían estar relacionadas con los resultados in vitro obtenidos en los cuales en el postratamiento se inhibió la producción de partículas virales infecciosas y que se encuentra una relaciónposiblemente con la disminución de la replicación del viral y traducción de proteína viral in vitro (figura 6)ambos procesos moleculares relacionados con las proteínas virales mencionadas y que entre los tres modelos virales, en esta estrategia fueron las mejores inhibiciones obtenidas [156]. Finalmente, para CHIKV, las mejores energías de unión fueron con proteínas del complejo de replicación del virus como el macrodominio NSP3 y la NSP2 dominio helicasa (Tabla 2). Lo anterior podría relacionarse al igual que en el modelo viral de ZIKV con los resultados obtenidos en el post-tratamiento, donde el compuesto

también afecta la síntesis de proteína viral, así como de genoma viral y a su vez la producción de partículas virales infecciosas [157].

En conclusión, podría decirse que, los resultados obtenidos *in silico* podrían relacionarse con los obtenidos *in vitro* y soportan la hipótesis de un mecanismo de acción relacionado con la inhibición del ciclo replicativo posterior a la infección en los tres modelos virales, siendo más enfocado en el caso de DENV, en pasos posteriores a la replicación del genoma contrario al caso de ZIKV más relacionados con la inhibición de la replicación del genoma a pesar de ambos ser flavivirus.

7 CONCLUSIÓN

En este estudio reportamos por primera vez que el compuesto sintetizado YDB-3M, dibromado derivado de la tiramina, tiene potencial en tres modelos arbovirales de importancia en salud pública. Los resultados obtenidos *in vitro*, demuestran que este compuesto afecta el ciclo replicativo en pasos posteriores a la entrada viral, afectando la liberación de partículas virales infecciosas y procesos fundamentales para la formación de las mismas. Finalmente, se resalta la necesidad de la evaluación de otras líneas celulares, y el uso de otras metodologías para esclarecer más a fondo el mecanismo de acción de este compuesto promisorio.

8 Bibliografía

1. Paixão, E.S., M.G. Teixeira, and L.C. Rodrigues, Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. *BMJ Glob Health*, 2018. 3(Suppl 1): p. e000530.
2. Ruiz-López, F., et al., Presencia de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) y su infección natural con el virus del dengue en alturas no registradas para Colombia. *Biomédica*, 2016. 36(2): p. 303-308.
3. Martínez Gutiérrez, M., Antiviral effect of compounds derived from the seeds of *Mammea americana* and *Tabernaemontana cymosa* on Dengue and Chikungunya virus infections. 2017.
4. OMS-OPS, Estrategia de Gestión Integrada para la prevención y control del dengue en la Región de las Américas. 2017.
5. Lv, R.C., et al., Genetic diversity and population structure of *Aedes aegypti* after massive vector control for dengue fever prevention in Yunnan border areas. *Sci Rep*, 2020. 10(1): p. 12731.
6. Murray, N.E., M.B. Quam, and A. Wilder-Smith, Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin Epidemiol*, 2013. 5: p. 299-309.
7. Rodríguez-Morales, A.J., W.E. Villamil-Gómez, and C. Franco-Paredes, The arboviral burden of disease caused by co-circulation and co-infection of dengue, chikungunya and Zika in the Americas. *Travel Med Infect Dis*, 2016. 14(3): p. 177-9.
8. Carrillo-Hernández, M.Y., et al., Co-circulation and simultaneous co-infection of dengue, chikungunya, and Zika viruses in patients with febrile syndrome at the Colombian-Venezuelan border. *BMC Infect Dis*, 2018. 18(1): p. 61.
9. Villamil-Gómez, W.E., et al., Dengue, chikungunya and Zika co-infection in a patient from Colombia. *J Infect Public Health*, 2016. 9(5): p. 684-6.
10. Brady, O.J., et al., Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012. 6(8): p. e1760.
11. (OPS), O.p.d.l.s., Actualización Epidemiológica: Dengue, chikunguña y Zika en el contexto de COVID-19 23 de diciembre de 2021. 2021.
12. (INS), I.n.d.s., Boletín epidemiológico semana 45. 2022.

13. Song, B.H., et al., Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *J Neuroimmunol*, 2017. 308: p. 50-64.
14. Liu, S.Q. and B. Zhang, Zika virus: a flavivirus caused pandemics in Latin America. *Virolog Sin*, 2016. 31(2): p. 101-2.
15. Pielnaa, P., et al., Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. *Virology*, 2020. 543: p. 34-42.
16. Ospina, M.L., et al., Zika Virus Disease and Pregnancy Outcomes in Colombia. *N Engl J Med*, 2020. 383(6): p. 537-545.
17. Pyke, A.T., P.R. Moore, and J. McMahon, New insights into chikungunya virus emergence and spread from Southeast Asia. *Emerg Microbes Infect*, 2018. 7(1): p. 26.
18. Russo, G., L. Subissi, and G. Rezza, Chikungunya fever in Africa: a systematic review. *Pathog Glob Health*, 2020. 114(3): p. 136-144.
19. Horwood, P., et al., The threat of chikungunya in Oceania. *Western Pac Surveill Response J*, 2013. 4(2): p. 8-10.
20. Tomasello, D. and P. Schlegelhauf, Chikungunya and dengue autochthonous cases in Europe, 2007-2012. *Travel Med Infect Dis*, 2013. 11(5): p. 274-84.
21. Graham, B.S., P.M. Repik, and S. Yactayo, Chikungunya in the Americas: Recommendations and Conclusions. *J Infect Dis*, 2016. 214(suppl 5): p. S510-s513.
22. Vu, D.M., D. Jungkind, and L. Angelle Desiree, Chikungunya Virus. *Clin Lab Med*, 2017. 37(2): p. 371-382.
23. Fields, B.N., D.M. Knipe, and P.M. Howley, *Fields virology*. 2007, Philadelphia: Wolters KluwerHealth/Lippincott Williams & Wilkins.
24. Guo, M., et al., ZIKV viral proteins and their roles in virus-host interactions. *Sci China Life Sci*, 2021. 64(5): p. 709-719.
25. Kuhn, R.J., et al., Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, 2002. 108(5): p. 717-25.
26. Fibriansah, G., X.N. Lim, and S.M. Lok, Morphological Diversity and Dynamics of Dengue Virus Affecting Antigenicity. *Viruses*, 2021. 13(8).
27. Uno, N. and T.M. Ross, Dengue virus and the host innate immune response. *Emerg Microbes Infect*, 2018. 7(1): p. 167.
28. Meng, F., et al., Unstructural biology of the Dengue virus proteins. *Febs j*, 2015. 282(17): p. 3368- 94.
29. Song, Y., et al., Dengue and Zika Virus 5' Untranslated Regions Harbor Internal Ribosomal Entry Site Functions. *mBio*, 2019. 10(2).
30. Perera, R. and R.J. Kuhn, Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol*, 2008. 11(4): p. 369-77.
31. Modis, Y., et al., Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, 2004. 427(6972): p. 313-9.
32. Cheng, M.L., et al., Pathogenicity and Structural Basis of Zika Variants with Glycan Loop Deletions in the Envelope Protein. *J Virol*, 2022: p. e0087922.
33. Amarilla, A.A., et al., Genetic diversity of the E protein of dengue type 3 virus. *Virolog J*, 2009. 6: p. 113.
34. Byk, L.A. and A.V. Gamarnik, Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid Protein. *Annu Rev Virol*, 2016. 3(1): p. 263-281.
35. Samsa, M.M., et al., Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog*, 2009. 5(10): p. e1000632.

36. Zhang, Y., et al., Structures of immature flavivirus particles. *Embo j*, 2003. 22(11): p. 2604-13.
37. Yuan, L., et al., A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science*, 2017. 358(6365): p. 933-936.
38. Płaszczycza, A., et al., A novel interaction between dengue virus nonstructural protein 1 and the NS4A-2K-4B precursor is required for viral RNA replication but not for formation of the membranous replication organelle. *PLoS Pathog*, 2019. 15(5): p. e1007736.
39. Puerta-Guardo, H., et al., Flavivirus NS1 Triggers Tissue-Specific Vascular Endothelial Dysfunction Reflecting Disease Tropism. *Cell Rep*, 2019. 26(6): p. 1598-1613.e8.
40. Xie, X., et al., Two distinct sets of NS2A molecules are responsible for dengue virus RNA synthesis and virion assembly. *J Virol*, 2015. 89(2): p. 1298-313.
41. Xie, X., et al., Membrane topology and function of dengue virus NS2A protein. *J Virol*, 2013. 87(8): p. 4609-22.
42. Ahmad, Z. and C.L. Poh, The Conserved Molecular Determinants of Virulence in Dengue Virus. *Int J Med Sci*, 2019. 16(3): p. 355-365.
43. Zonetti, L.F.C., M.C. Coutinho, and A.S. de Araujo, Molecular Aspects of the Dengue Virus Infection Process: A Review. *Protein Pept Lett*, 2018. 25(8): p. 712-719.
44. Li, J., et al., Functional profiling of recombinant NS3 proteases from all four serotypes of dengue virus using tetrapeptide and octapeptide substrate libraries. *J Biol Chem*, 2005. 280(31): p. 28766-74.
45. Miller, S., et al., The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J Biol Chem*, 2007. 282(12): p. 8873-82.
46. Issur, M., et al., The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two- step reaction to form the RNA cap structure. *Rna*, 2009. 15(12): p. 2340-50.
47. Rea, V.E., et al., 67 kDa laminin receptor: structure, function and role in cancer and infection. *Infez Med*, 2012. 20 Suppl 2: p. 8-12.
48. Lozach, P.Y., et al., Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J Biol Chem*, 2005. 280(25): p. 23698-708.
49. Dalrymple, N. and E.R. Mackow, Productive dengue virus infection of human endothelial cells is directed by heparan sulfate-containing proteoglycan receptors. *J Virol*, 2011. 85(18): p. 9478-85.
50. Cruz-Oliveira, C., et al., Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiol Rev*, 2015. 39(2): p. 155-70.
51. Gao, F., et al., Novel binding between pre-membrane protein and claudin-1 is required for efficient dengue virus entry. *Biochemical and biophysical research communications*, 2010. 391(1): p. 952-957.
52. Martínez-Barragán, J.J. and R.M. del Angel, Identification of a putative coreceptor on Vero cells that participates in dengue 4 virus infection. *J Virol*, 2001. 75(17): p. 7818-27.
53. Meertens, L., et al., The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host Microbe*, 2012. 12(4): p. 544-57.
54. Dai, L., et al., Structures of the Zika virus envelope protein and its complex with a flavivirus broadly protective antibody. 2016. 19(5): p. 696-704.
55. Mukhopadhyay, S., R.J. Kuhn, and M.G. Rossmann, A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*, 2005. 3(1): p. 13-22.
56. Sirohi, D. and R.J. Kuhn, Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *J Infect Dis*, 2017. 216(suppl_10): p. S935-s944.
57. McKee, T. and J.R. McKee, *Bioquímica: las bases moleculares de la vida*. 2009.

58. Qi, R.F., L. Zhang, and C.W. Chi, Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2008. 40(2): p. 91-101.
59. Rodenhuis-Zybert, I.A., J. Wilschut, and J.M. Smit, Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci*, 2010. 67(16): p. 2773-86.
60. Byk, L.A., et al., Dengue Virus Genome Uncoating Requires Ubiquitination. *mBio*, 2016. 7(3).
61. Apte-Sengupta, S., D. Sirohi, and R.J. Kuhn, Coupling of replication and assembly in flaviviruses. *Curr Opin Virol*, 2014. 9: p. 134-42.
62. De Falco, L., et al., The Pseudo-Circular Genomes of Flaviviruses: Structures, Mechanisms, and Functions of Circularization. *Cells*, 2021. 10(3).
63. Kato, F. and T. Hishiki, Dengue Virus Reporter Replicon is a Valuable Tool for Antiviral DrugDiscovery and Analysis of Virus Replication Mechanisms. *Viruses*, 2016. 8(5).
64. San Martín, C., Virus Maturation. *Adv Exp Med Biol*, 2019. 1215: p. 129-158.
65. Costa, V.V., et al., Inflammatory and innate immune responses in dengue infection: protectionversus disease induction. *Am J Pathol*, 2013. 182(6): p. 1950-61.
66. Clyde, K., J.L. Kyle, and E. Harris, Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol*, 2006. 80(23): p. 11418-31.
67. Diamond, M.S., et al., Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *J Virol*, 2000. 74(17): p. 7814-23.
68. Libraty, D.H., et al., Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. *J Virol*, 2001. 75(8): p. 3501-8.
69. Martina, B.E., P. Koraka, and A.D. Osterhaus, Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev*, 2009. 22(4): p. 564-81.
70. Samanta, J. and V. Sharma, Dengue and its effects on liver. *World J Clin Cases*, 2015. 3(2): p.125-31.
71. Kyle, J.L., P.R. Beatty, and E. Harris, Dengue virus infects macrophages and dendritic cells in a mouse model of infection. *J Infect Dis*, 2007. 195(12): p. 1808-17.
72. Dejnirattisai, W., et al., Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science*, 2010. 328(5979): p. 745-8.
73. Chan, A.H., et al., A human PrM antibody that recognizes a novel cryptic epitope on dengue E glycoprotein. *PLoS One*, 2012. 7(4): p. e33451.
74. Diamond, M.S. and T.C. Pierson, Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. *Cell*, 2015. 162(3): p. 488-92.
75. Tran, L., et al., Role of cytokines produced by T helper immune-modulators in dengue pathogenesis: A systematic review and meta-analysis. *Acta Tropica*, 2021. 216: p. 105823.
76. Sun, D.S., et al., Antiplatelet autoantibodies elicited by dengue virus non-structural protein 1 cause thrombocytopenia and mortality in mice. *J Thromb Haemost*, 2007. 5(11): p. 2291-9.
77. Ferraris, P., H. Yssel, and D. Missé, Zika virus infection: an update. *Microbes and Infection*, 2019. 21(8): p. 353-360.
78. Brasil, P., et al., Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. 2016. 375(24): p. 2321- 2334.
79. Wen, Z., H. Song, and G.L. Ming, How does Zika virus cause microcephaly? *Genes Dev*, 2017. 31(9): p. 849-861.
80. Brasil, P., et al., Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus infection. 2016. 387(10026): p. 1482.
81. Organization, W.H., et al., Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. 2009: World Health Organization.

82. Nascimento, O.J.M. and I.R.F. da Silva, Guillain-Barré syndrome and Zika virus outbreaks. *Curr Opin Neurol*, 2017. 30(5): p. 500-507.
83. Malta, J.M., et al., Guillain-Barré syndrome and other neurological manifestations possibly related to Zika virus infection in municipalities from Bahia, Brazil, 2015. *Epidemiol Serv Saude*, 2017. 26(1): p. 9-18.
84. Arias, A., et al., Guillain-Barré syndrome in patients with a recent history of Zika in Cúcuta, Colombia: A descriptive case series of 19 patients from December 2015 to March 2016. *J Crit Care*, 2017. 37: p. 19-23.
85. Cao-Lormeau, V.M., et al., Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet*, 2016. 387(10027): p. 1531-1539.
86. Mlakar, J., et al., Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med*, 2016. 374(10): p. 951-8.
87. Caglioti, C., et al., Chikungunya virus infection: an overview. *New Microbiol*, 2013. 36(3): p. 211-27.
88. Silva, L.A. and T.S. Dermody, Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *J Clin Invest*, 2017. 127(3): p. 737-749.
89. Kumar, S., et al., Chikungunya virus nsP1 interacts directly with nsP2 and modulates its ATPase activity. *Scientific Reports*, 2018. 8(1): p. 1045.
90. Vihinen, H., et al., Elimination of phosphorylation sites of Semliki Forest virus replicase protein nsP3. *J Biol Chem*, 2001. 276(8): p. 5745-52.
91. Wang, Y.F., S.G. Sawicki, and D.L. Sawicki, Alphavirus nsP3 functions to form replication complexes transcribing negative-strand RNA. *J Virol*, 1994. 68(10): p. 6466-75.
92. Shirako, Y., E.G. Strauss, and J.H. Strauss, Suppressor mutations that allow sindbis virus RNA polymerase to function with nonaromatic amino acids at the N-terminus: evidence for interaction between nsP1 and nsP4 in minus-strand RNA synthesis. *Virology*, 2000. 276(1): p. 148-60.
93. Calvo, E.P., et al., Rediscovering the chikungunya virus. 2021. 41(2): p. 353-373.
94. Voss, J.E., et al., Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature*, 2010. 468(7324): p. 709-12.
95. Ramsey, J. and S.J.V. Mukhopadhyay, Disentangling the frames, the state of research on the alphavirus 6K and TF proteins. 2017. 9(8): p. 228.
96. Wintachai, P., et al., Identification of prohibitin as a Chikungunya virus receptor protein. *J Med Virol*, 2012. 84(11): p. 1757-70.
97. van Duijl-Richter, M.K., et al., Early Events in Chikungunya Virus Infection-From Virus Cell Binding to Membrane Fusion. *Viruses*, 2015. 7(7): p. 3647-74.
98. Schwartz, O. and M.L. Albert, Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nat Rev Microbiol*, 2010. 8(7): p. 491-500.
99. Gasque, P., et al., Chikungunya virus pathogenesis and immunity. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2015. 15(4): p. 241-9.
100. Sukkaew, A., et al., Proteomic analysis of CHIKV-infected human fibroblast-like synoviocytes: Identification of host factors potentially associated with CHIKV replication and cellular pathogenesis. *Microbiol Immunol*, 2020. 64(6): p. 445-457.
101. Amaral, J.K., et al., The Clinical Features, Pathogenesis and Methotrexate Therapy of Chronic Chikungunya Arthritis. *Viruses*, 2019. 11(3).
102. Adam, A. and C. Jassoy, Epidemiology and Laboratory Diagnostics of Dengue, Yellow Fever, Zika, and Chikungunya Virus Infections in Africa. *Pathogens*, 2021. 10(10).
103. Ganesan, V.K., B. Duan, and S.P. Reid, Chikungunya Virus: Pathophysiology, Mechanism, and Modeling. *Viruses*, 2017. 9(12).
104. Achee, N.L., et al., A critical assessment of vector control for dengue prevention. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015. 9(5): p. e0003655.

105. Dahmana, H. and O. Mediannikov, Mosquito-Borne Diseases Emergence/Resurgence and How to Effectively Control It Biologically. *Pathogens*, 2020. 9(4).
106. Francis, M.J., Recent Advances in Vaccine Technologies. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2018. 48(2): p. 231-241.
107. Thomas, S.J. and I.K. Yoon, A review of Dengvaxia®: development to deployment. *Hum Vaccin Immunother*, 2019. 15(10): p. 2295-2314.
108. da Silveira, L.T.C., B. Tura, and M. Santos, Systematic review of dengue vaccine efficacy. *BMC infectious diseases*, 2019. 19(1): p. 750-750.
109. Hadinegoro, S.R., et al., Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. *N Engl J Med*, 2015. 373(13): p. 1195-206.
110. Takeda. Takeda's QDENGGA® (Dengue Tetravalent Vaccine [Live, Attenuated]) Approved for Use in European Union. 2022.
111. Prompetchara, E., et al., Dengue vaccine: Global development update. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2020. 38(3): p. 178-185.
112. Deng, S.Q., et al., A Review on Dengue Vaccine Development. *Vaccines (Basel)*, 2020. 8(1).
113. Lin, H.H., et al., Zika virus structural biology and progress in vaccine development. *Biotechnol Adv*, 2018. 36(1): p. 47-53.
114. Schmidt, C. and B.S. Schnierle, Chikungunya Vaccine Candidates: Current Landscape and Future Prospects. *Drug Des Devel Ther*, 2022. 16: p. 3663-3673.
115. González-Cardenete, M.A., et al., Antiviral Profiling of C-18- or C-19-Functionalized Semisynthetic Abietane Diterpenoids. *J Nat Prod*, 2022. 85(8): p. 2044-2051.
116. Monsalve-Escudero, L.M., et al., The Antiviral and Virucidal Activities of Voacangine and Structural Analogs Extracted from *Tabernaemontana cymosa* Depend on the Dengue Virus Strain. *Plants (Basel)*, 2021. 10(7).
117. Martínez-Gutiérrez, M., J.E. Castellanos, and J.C. Gallego-Gómez, Statins reduce dengue virus production via decreased virion assembly. *Intervirology*, 2011. 54(4): p. 202-16.
118. Low, J.G., E.E. Ooi, and S.G. Vasudevan, Current Status of Dengue Therapeutics Research and Development. *J Infect Dis*, 2017. 215(suppl_2): p. S96-s102.
119. Nguyen, N.M., et al., A randomized, double-blind placebo controlled trial of balapiravir, a polymerase inhibitor, in adult dengue patients. *J Infect Dis*, 2013. 207(9): p. 1442-50.
120. Zmurko, J., et al., The Viral Polymerase Inhibitor 7-Deaza-2'-C-Methyladenosine Is a Potent Inhibitor of In Vitro Zika Virus Replication and Delays Disease Progression in a Robust Mouse Infection Model. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016. 10(5): p. e0004695.
121. Eyer, L., et al., Nucleoside Inhibitors of Zika Virus. *J Infect Dis*, 2016. 214(5): p. 707-11.
122. Albuлесcu, I.C., et al., Suramin inhibits Zika virus replication by interfering with virus attachment and release of infectious particles. *Antiviral Res*, 2017. 143: p. 230-236.
123. Rausch, K., et al., Screening Bioactives Reveals Nanchangmycin as a Broad Spectrum Antiviral Active against Zika Virus. *Cell Rep*, 2017. 18(3): p. 804-815.
124. Yu, Y., et al., A peptide-based viral inactivator inhibits Zika virus infection in pregnant mice and fetuses. *Nat Commun*, 2017. 8: p. 15672.
125. Ravichandran, R. and M. Manian, Ribavirin therapy for Chikungunya arthritis. *J Infect Dev Ctries*, 2008. 2(2): p. 140-2.
126. Delogu, I., et al., In vitro antiviral activity of arbidol against Chikungunya virus and characteristics of a selected resistant mutant. *Antiviral Res*, 2011. 90(3): p. 99-107.
127. Newman, D.J. and G.M. Cragg, Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod*, 2020. 83(3): p. 770-803.

128. Social, M.d.I.P., I.N.d. Salud, and O.P.d.I. Salud, Guía para la atención clínica integral del paciente con dengue. 2010, Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional de Salud
129. Martínez, R.A., Tratamiento del dengue durante su etapa aguda: revisión sistemática de la literatura. *Infectio*, 2011. 12(4).
130. Galeano, E., et al., Antiparasitic bromotyrosine derivatives from the marine sponge *Verongula rigida*. *Marine drugs*, 2011. 9(10): p. 1902-1913.
131. GÓMEZ-ARCHILA, L.G., et al., BROMOTIROSINAS DERIVADAS DE ESPONJAS MARINAS INHIBEN LA REPLICACIÓN IN VITRO DEL VIH-1. *Vitae*, 2014. 21(2): p. 114-125.
132. Carolina Quintero-Gil, E.G., Alejandro Martínez, Marlen Martínez-Gutiérrez., Potencial terapéutico de la molécula Aeroplisinina-1 sobre la infección de los cuatro serotipo del virus Dengue *Infectio Asociación Colombiana de Infectología* 2014.
133. Pastrana Restrepo, M., et al., Synthesis and trypanocide activity of chloro-l-tyrosine and bromo-l-tyrosine derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, 2018. 27(11): p. 2454-2465.
134. Loaiza-Cano, V., et al., In Vitro and In Silico Anti-Arboviral Activities of Dihalogenated Phenolic Derivates of L-Tyrosine. *Molecules*, 2021. 26(11).
135. Loaiza-Cano, V., et al., In Vitro and In Silico Anti-Arboviral Activities of Dihalogenated Phenolic Derivates of L-Tyrosine. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2021. 26(11): p. 3430.
136. Galeano, E., et al., Antiparasitic bromotyrosine derivatives from the marine sponge *Verongula rigida*. *Mar Drugs*, 2011. 9(10): p. 1902-13.
137. Gómez-Calderón, C., et al., Antiviral effect of compounds derived from the seeds of *Mammea americana* and *Tabernaemontana cymosa* on Dengue and Chikungunya virus infections. *BMC complementary and alternative medicine*, 2017. 17: p. 1-12.
138. Sobotka, P., et al., Effect of Ultraviolet Light C (UV-C) Radiation Generated by Semiconductor Light Sources on Human Beta-Coronaviruses' Inactivation. *Materials (Basel)*, 2022. 15(6).
139. Martínez-Gutiérrez, M., et al., Lovastatin delays infection and increases survival rates in AG129 mice infected with dengue virus serotype 2. *PLoS One*, 2014. 9(2): p. e87412.
140. Monsalve-Escudero, L.M., et al., Indole alkaloids inhibit zika and chikungunya virus infection in different cell lines. *BMC Complement Med Ther*, 2021. 21(1): p. 216.
141. Sanner, M.F., Python: a programming language for software integration and development. *J Mol Graph Model*, 1999. 17(1): p. 57-61.
142. Higuera, A. and J.D. Ramírez, Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: An update. *Acta Trop*, 2019. 190: p. 99-111.
143. Vogels, C.B.F., et al., Arbovirus coinfection and co-transmission: A neglected public health concern? *PLoS Biol*, 2019. 17(1): p. e3000130.
144. ZAPATA, W., et al., Bromotyrosine derivatives from marine sponges inhibit the HIV-1 replication in vitro. 2014. 21(2): p. 114-125.
145. Lopes, J.L., et al., Sulfonated and Carboxymethylated β -Glucan Derivatives with Inhibitory Activity against Herpes and Dengue Viruses. *Int J Mol Sci*, 2021. 22(20).
146. ZAPATA, W., et al., Bromotyrosine derivatives from marine sponges inhibit the HIV-1 replication in vitro. *Vitae*, 2014. 21(2): p. 114-125.
147. Dyck, L.E., C.R. Yang, and A.A. Boulton, The biosynthesis of p-tyramine, m-tyramine, and beta-phenylethylamine by rat striatal slices. *J Neurosci Res*, 1983. 10(2): p. 211-20.
148. Ekins, S., J. Mestres, and B. Testa, In silico pharmacology for drug discovery: applications to targets and beyond. *Br J Pharmacol*, 2007. 152(1): p. 21-37.
149. Farias, K.J., P.R. Machado, and B.A. da Fonseca, Chloroquine inhibits dengue virus type 2 replication in Vero cells but not in C6/36 cells. *ScientificWorldJournal*, 2013. 2013: p. 282734.

150. Delvecchio, R., et al., Chloroquine, an Endocytosis Blocking Agent, Inhibits Zika Virus Infection in Different Cell Models. *Viruses*, 2016. 8(12).
151. Khan, M., et al., Assessment of in vitro prophylactic and therapeutic efficacy of chloroquine against Chikungunya virus in vero cells. *J Med Virol*, 2010. 82(5): p. 817-24.
152. Subudhi, B.B., et al., Current Strategies for Inhibition of Chikungunya Infection. *Viruses*, 2018. 10(5).
153. Crance, J.M., et al., Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. *Antiviral Res*, 2003. 58(1): p. 73-9.
154. Rothan, H.A., et al., A combination of doxycycline and ribavirin alleviated chikungunya infection. *PLoS One*, 2015. 10(5): p. e0126360.
155. Idrus, S., U.S. Tambunan, and A.A. Zubaidi, Designing cyclopentapeptide inhibitor as potential antiviral drug for dengue virus ns5 methyltransferase. *Bioinformation*, 2012. 8(8): p. 348-52.
156. Kumar, D., et al., Targeting the NTPase site of Zika virus NS3 helicase for inhibitor discovery. *J Biomol Struct Dyn*, 2020. 38(16): p. 4827-4837.
157. Rashad, A.A., S. Mahalingam, and P.A. Keller, Chikungunya virus: emerging targets and new opportunities for medicinal chemistry. *J Med Chem*, 2014. 57(4): p. 1147-66.

