

**Actividad antiviral *in vitro* e *in silico* de compuestos isoprenoides contra los virus Dengue,  
Chikungunya y Zika**

**ESTUDIANTE**

**María Isabel Zapata Cardona**

**PROGRAMA**

**Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Énfasis Virología  
Universidad de Antioquia**

**TUTOR**

**Marlén Martínez-Gutiérrez**

**CO - TUTOR**

**Sara Robledo**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORIAL**

**Marcel Villa Marín  
Carolina Quintero Gil  
Fredyc Díaz Castillo**

**Grupo de Investigación en Ciencias Animales-GRICA. Universidad Cooperativa de Colombia  
Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales. Universidad de Antioquia**

**Mayo de 2020  
Medellín-Colombia**

## Resumen

**Introducción:** No existe un tratamiento antiviral específico disponible contra los virus Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) y Zika (ZIKV). El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antiviral *in vitro* e interacciones *in silico* de cuatro compuestos isoprenoides aislados a partir de las plantas *T. cymosa* Jacq., *C. ambrosioides* L. y *C. odoratissima* Jacq. recolectadas en la Región Caribe colombiana contra DENV-2, CHIKV y ZIKV. **Metodología:** Se evaluó la viabilidad de células VERO en presencia de Alfa-Espinasterol, Lupeol, Estigmasterol y Friedelina por la técnica de MTT (7,3 – 242,3  $\mu$ M). Una vez definida una concentración no citotóxica en células VERO, esa única concentración se evaluó en células U937 y A549 por la técnica de MTT. Inicialmente, el efecto antiviral de los isoprenoides se evaluó mediante cuatro estrategias diferentes en células VERO: (i) tamizaje antiviral, (ii) PRE-tratamiento, (iii) TRANS-tratamiento y (iv) POST-tratamiento, usando los aislados clínicos CHIKV/Acol y ZIKV/Col y las cepas de referencia DENV-2/NG y DENV-2/16681 (MOI 1). Los porcentajes de infección fueron calculados mediante tres técnicas: Ensayo de plaqueo, RT-qPCR (Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) y CELL-ELISA. Posteriormente, y de acuerdo a los resultados obtenidos en células VERO, se evaluaron algunas estrategias en células U937 y A549. Como control positivo de inhibición se usó Suramina, Heparina y/o Ribavirina. Por otro lado, se secuenció el gen de la envoltura de DENV-2/NG y DENV-2/16681 por el método de Sanger y se establecieron las diferencias nucleotídicas y aminoacídicas por el método de Clustal W. Para las evaluaciones *In silico*, se evaluó la interacción de los isoprenoides con las proteínas E y NS5 de DENV y ZIKV, y E y NSP2 de CHIKV, mediante docking molecular y dinámica molecular. **Resultados:** La viabilidad de células VERO en presencia de los cuatro isoprenoides fue superior al 70,0 % a concentraciones menores o iguales de 117,2  $\mu$ M de Alfa-Espinasterol, Lupeol y Estigmasterol y 29,3  $\mu$ M de Friedelina. Se demostró el potencial antiviral del Alfa-Espinasterol contra DENV-2/NG (porcentaje de infección del 40,9 %) mediante el tamizaje antiviral en VERO, el potencial virucida contra DENV-2/NG y DENV-2/16681 (porcentajes de infección del 65,6 % y 44,1 %, respectivamente) y la actividad antiviral contra ZIKV/Col mediante la estrategia de PRE- tratamiento en VERO y U937 (Porcentaje de infección del 44,8 % y 42,9 %, respectivamente). Lupeol demostró un potencial virucida contra DENV-2/NG y DENV-2/16681 (porcentajes de infección del 43,0 % y 54,2 %, respectivamente), un efecto antiviral contra CHIKV/Acol mediante las estrategias de PRE- tratamiento, TRANS-tratamiento y POST-tratamiento en VERO (porcentajes de infección del 32,7 %, 11,7 % y 0,8 %, respectivamente) y provocó disminución del número de copias genómicas de CHIKV en A549 (porcentaje de infección del 37,1 %), pero no afectó proteína viral (porcentaje de infección del 81,7%). Lupeol afectó etapas iniciales del ciclo replicativo de ZIKV/Col en VERO (porcentaje de infección del 30,7 %). Estigmasterol demostró un potencial virucida contra DENV-2/16681 (porcentaje de infección del 50,2 %), afectó etapas iniciales del ciclo replicativo de CHIKV/Acol y ZIKV/Col en VERO (porcentajes de infección del 12,8 % y 39,3 %, respectivamente) y U937 (porcentajes de infección del 44,2 % contra CHIKV y 50,9 % contra ZIKV). Friedelina demostró un posible efecto virucida contra DENV-2/NG y CHIKV (porcentajes de infección del 62,4 % y 15,7 %, respectivamente). Se identificaron seis cambios nucleotídicos entre las secuencias del gen de envoltura de DENV-2/NG y DENV-2/16681, y cuatro mutaciones no sinónimas. Finalmente, las proteínas E y NS5 de DENV y ZIKV, y E y NSP2 de CHIKV, interactuaron con los cuatro isoprenoides con una energía de libre de unión entre -5.3 y -9.6 Kcal/mol. El mejor complejo de interacción de la proteína E de DENV y Lupeol, fue estable durante 6,5 ns de simulación. **Conclusiones:** Los cuatro isoprenoides evaluados en este estudio demostraron potencial antiviral *in vitro* contra DENV-2, ZIKV y/o CHIKV. El efecto antiviral fue dependiente de línea celular, modelo viral y cepa infectante. Este es el primer trabajo que reporta actividad antiviral del Alfa-Espinasterol y Friedelina. El Lupeol demostró actividad contra todos los virus evaluados, mediante las diferentes estrategias usadas, por lo que es el isoprenoide con potencial antiviral más promisorio de este trabajo, principalmente contra CHIKV.

## Abstract

**Introduction:** There is no specific antiviral treatment available against Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) and Zika (ZIKV) viruses. The aim of this work was to evaluate the *in vitro* antiviral activity and *in silico* interactions, of four isoprenoid compounds isolated from the plants *T. cymosa* Jacq., *C. ambrosioides* L. and *C. odoratissima* Jacq collected in the Colombian Caribbean Region against DENV-2, CHIKV and ZIKV. **Methodology:** The viability of VERO cells in presence of Alpha-Spinasterol, Lupeol, Stigmasterol and Friedelin was assessed by the MTT assay (from 7.3 to 242.3  $\mu$ M). Once a non-cytotoxic concentration in VERO cells was defined, that single concentration was evaluated in U937 and A549 cells by the MTT assay. Initially, the antiviral effect of the four isoprenoids was evaluated by four different strategies in VERO cells: (i) antiviral screening, (ii) PRE-treatment, (iii) TRANS-treatment and (iv) POST-treatment, using that clinical isolates CHIKV/ACol and ZIKV/Col, and reference strains DENV-2/NG and DENV-2/16681 (MOI 1). The infection percentages were calculated using three techniques: plaque assay, RT-qPCR (Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) and CELL-ELISA. Subsequently, and according to the results obtained in VERO cells, some strategies were evaluated in U937 and A549 cells. Suramine, Heparin and/or Ribavirin were used as positive inhibition control. The envelope gene of DENV-2/NG and DENV-2/16681 was sequenced by Sanger method and the nucleotide and amino acid differences were established by the method of Clustal W. For the *in silico* evaluations, the interaction of the isoprenoids with proteins E and NS5 of DENV and ZIKV, and E and NSP2 of CHIKV was evaluated by molecular docking and molecular dynamics.

**Results:** The viability of VERO cells in the presence of the four isoprenoids was greater than 70.0 %, at concentrations less than or equal to 117.2  $\mu$ M of Alpha-Spinasterol, Lupeol and Stigmasterol, and 29.3  $\mu$ M of Friedelin. The antiviral potential of Alpha-Spinasterol was demonstrated by the antiviral screening against DENV-2/NG (percentage of infection of 40.9 %), the virucidal potential against DENV-2/NG and DENV-2/16681 (percentages of infection of 65.6 % and 44.1 %, respectively) and the antiviral activity against ZIKV/Col through a PRE-treatment strategy in VERO and U937 cells (percentages of infection of 44.8 % and 42.9 %, respectively). Lupeol demonstrated a virucidal potential against DENV-2/NG and DENV-2/16681 (percentages of infection of 43.0 % and 54.2 %, respectively), and an antiviral effect against CHIKV/ACol through PRE-treatment, TRANS-treatment and POST-treatment in VERO cells (percentages of infection of 32.7 %, 11.7 % and 0.8 %, respectively), and Lupeol caused a decrease in the number of genomic copies of CHIKV/ACol in A549 cells (percentages of infection of 37.1 %); but it did not affect viral protein (percentages of infection of 81.7 %). Lupeol also affected initial stages of the replicative cycle of ZIKV/Col in VERO cells (percentages of infection of 30.7%). Stigmasterol demonstrated a virucidal potential against DENV-2/16681 (percentages of infection of 50.2 %), affected initial stages of the replicative cycle of CHIKV/ACol and ZIKV/Col in VERO (percentages of infection of 12.8 % and 39.3 %, respectively) and U937 cells (percentages of infection of 44.2 % against CHIKV/ACol and 50.9 % against ZIKV/Col, respectively). Friedelina demonstrated a possible virucidal effect against DENV-2/NG and CHIKV/ACol (percentages of infection of 62.4% and 15.7%, respectively). Six nucleotide changes were identified between the envelope gene sequences of DENV-2/NG and DENV-2/16681, and four non-synonymous mutations. Finally, the E and NS5 proteins of DENV and ZIKV, and E and NSP2 of CHIKV/ACol, interacted with the four isoprenoids with a binding-free energy between -5.3 and -9.6 Kcal/mol. The best DENV and Lupeol protein E interaction complex was stable for 6.5 ns of simulation. **Conclusions:** The isoprenoids evaluated demonstrated *in vitro* antiviral potential against DENV-2, ZIKV and/or CHIKV. The antiviral effect was dependent on cell line, viral model and viral strain. This is the first work that reports antiviral activity of Alpha-Spinasterol and Friedeline. Lupeol demonstrated activity against all viruses evaluated, through the different strategies used, making it the most promising isoprenoid with antiviral potential of this work, mainly against CHIKV.

## ÍNDICE GENERAL

Resumen .....	2
Abstract .....	3
ÍNDICE GENERAL .....	4
ÍNDICE DE TABLAS .....	7
ÍNDICE DE FIGURAS .....	7
<b>1. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1. Dengue .....</b>	<b>8</b>
1.1.1 Enfermedad del dengue .....	8
1.1.2 Patogénesis de DENV .....	9
1.1.3 DENV .....	10
1.1.4 Ciclo replicativo de DENV .....	11
<b>1.2 Chikungunya .....</b>	<b>12</b>
1.2.1 Fiebre del Chikungunya .....	12
1.2.2 Patogénesis .....	12
1.2.3 CHIKV .....	13
1.2.4 Ciclo replicativo de CHIKV .....	14
<b>1.3 Zika .....</b>	<b>14</b>
1.3.1 Enfermedad del Zika .....	14
1.3.2 Patogénesis .....	14
1.3.3 ZIKV .....	15
1.3.4 Ciclo replicativo de ZIKV .....	16
<b>1.4 Plantas de la Región Caribe colombiana de interés en nuestro estudio .....</b>	<b>16</b>
1.4.1 <i>Tabernaemontana cymosa</i> Jacq. ....	16
1.4.2 <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. ....	16
1.4.3 <i>Capparis odoratissima</i> Jacq. ....	17
<b>1.5 Isoprenoides .....</b>	<b>18</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Antivirales contra DENV .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Antivirales contra CHIKV .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3 Antivirales contra ZIKV .....</b>	<b>21</b>

2.4 Actividad biológica de los Isoprenoides incluidos en este estudio.....	22
2.5 Antecedentes de nuestro grupo de trabajo .....	22
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	24
5. HIPÓTESIS.....	24
5.1 Hipótesis nula.....	24
5.2 Hipótesis alterna .....	24
6. OBJETIVOS .....	24
6.1 Objetivo general .....	24
6.2 Objetivos específicos.....	24
7. METODOLOGÍA .....	25
7.1 Metodología <i>in vitro</i> .....	26
7.1.1 Mantenimiento de células. ....	26
7.1.2 Virus. ....	27
7.1.3 Producción de cepas DENV-2/NG y DENV-2/16681.....	27
7.1.4 Producción de stocks virales de CHIKV.....	27
7.1.5 Producción de stocks virales de ZIKV. ....	27
7.1.6 Compuestos. ....	27
7.1.7 Ensayo de citotoxicidad. ....	28
7.2. Estrategias para las evaluaciones antivirales <i>In vitro</i> .....	28
7.2.1 Tamizaje antiviral. ....	28
7.2.2 Estrategia PRE-Tratamiento. ....	29
7.2.3 Estrategia TRANS-Tratamiento. ....	29
7.2.4 Estrategia POST-Tratamiento.....	29
7.3. Cuantificación viral .....	30
7.3.1 Cuantificación de partículas virales infecciosas: ensayo de plaqueo. ....	30
7.3.2 Cuantificación de copias genómicas: PCR en tiempo Real. ....	30
7.3.3 Cuantificación de proteína viral: CELL-ELISA.....	31
7.4. Estrategias para las evaluaciones <i>in silico</i> .....	31
7.4.1 Evaluación de la afinidad de los isoprenoides con proteínas virales mediante docking molecular. ....	31
7.4.2 Evaluación de la estabilidad conformacional por dinámica molecular.....	32
7.5 Secuenciación de cepas DENV-2/NG y DENV-2/16681 .....	32

<b>8.1 Resultados de Citotoxicidad en VERO, U937 y A549</b> .....	33
<b>8.2. Resultados de las evaluaciones <i>In Vitro</i></b> .....	33
8.2.1. Resultados de la estrategia de tamizaje antiviral.. .....	33
8.2.2. Resultados de la estrategia PRE- tratamiento. ....	34
8.2.3. Resultados de la estrategia TRANS-tratamiento.....	35
8.2.4. Resultados de la estrategia POST-tratamiento.....	35
8.2.5. Resultados de la cuantificación del RNA viral en monocapas tratadas con Lupeol.....	36
8.2.6. Resultados de la cuantificación de proteína viral en monocapas tratadas con Lupeol. ....	36
<b>8.3. Resultados de las evaluaciones <i>in silico</i></b> .....	37
8.3.1 Interacción por docking molecular entre los isoprenoides y las proteínas estructurales de DENV, CHIKV y ZIKV. ....	37
8.3.2 Interacción por docking molecular entre los isoprenoides y las proteínas no estructurales de DENV, CHIKV y ZIKV.. ....	38
8.3.4. Resultados obtenidos de la simulación por dinámica molecular. ....	38
<b>8.4. Resultados de la secuenciación del gen de envoltura de las cepas DENV-2/NG y DENV-2/16681</b> .....	39
<b>9. ANÁLISIS, DISCUSIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS</b> .....	39
<b>9.1 DENV</b> .....	41
<b>9.1.1 Actividad antiviral <i>in vitro</i> de los isoprenoides contra DENV</b> .....	41
9.1.2 Interacciones <i>in silico</i> de los compuestos isoprenoides con las proteínas de DENV. ....	43
<b>9.2 CHIKV</b> .....	44
9.2.1 Actividad antiviral <i>in vitro</i> de isoprenoides contra CHIKV.....	44
9.2.2 Interacciones <i>in silico</i> de compuestos isoprenoides con proteínas de CHIKV. ....	48
<b>9.3 ZIKV</b> .....	49
9.3.1 Actividad antiviral <i>in vitro</i> de isoprenoides contra ZIKV.....	49
9.3.2 Interacciones <i>in silico</i> de isoprenoides con proteínas de ZIKV.. ....	51
<b>Consideraciones finales</b> .....	52
<b>Conclusiones</b> .....	53
<b>Perspectivas y limitaciones</b> .....	53
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	85
<b>Anexo 1: Obtención de plásmidos recombinantes</b> .....	102

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Energía libre de unión obtenidas mediante docking molecular. y la proteína ENV de DENV, ZIKV y CHIKV, obtenidas por docking molecular.....	55
Tabla 2: Energía libre de unión de las proteínas no estructurales de CHIKV, ZIKV y DENV y los compuestos isoprenoides, obtenidas mediante docking molecular.....	56
Tabla 3: Evaluación de la citotoxicidad de los 4 isoprenoides en las líneas celulares U937 y A549. ....	58
Tabla 4: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la envoltura de las cepas DENV-2/NG y DENV-2/16681.....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	60
Figura 2.....	62
Figura 3.....	63
Figura 4.....	64
Figura 5.....	65
Figura 6.....	66
Figura 7.....	67
Figura 8.....	68
Figura 9.....	69
Figura 10.....	70
Figura 11.....	71
Figura 12.....	72
Figura 13.....	74
Figura 14.....	76
Figura 15.....	78
Figura 16.....	80
Figura 17.....	82
Figura 18.....	84

## 1. MARCO TEÓRICO

Los virus del Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) y Zika (ZIKV) son arbovirus transmitidos por vectores del género *Aedes*, principalmente *A. aegypti* y *A. albopictus*, distribuidos actualmente en todos los países tropicales y subtropicales del mundo [1-3]. Se caracterizan estructuralmente por ser virus envueltos, de nucleocápside icosaédrica, conformados genéticamente por una única hebra de RNA (Ribonucleic acid) de polaridad positiva, que en el caso de DENV y ZIKV codifica para tres proteínas estructurales (C, prM / M y E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) [4]; mientras que en CHIKV se traduce en cinco proteínas estructurales (C, E3, E2, 6 K y E1) y cuatro proteínas no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3 y NSP4) ([2, 5]; cada una de ellas con una participación representativa dentro del ciclo replicativo viral.

Estas arbovirosis producen un cuadro clínico similar, especialmente, durante la fase aguda de la enfermedad, lo que ha provocado dificultades para un diagnóstico clínico certero [6]. Específicamente, el DENV se asocia con cuadros clínicos graves, tales como extravasación del plasma y choque hipovolémico, manifestaciones hemorrágicas, compromiso cardíaco y hepático, que pueden llevar a la muerte [7, 8]. La fiebre del Chikungunya, por su parte, se ha asociado, principalmente, a compromiso articular (mayor a 90 días, en casos crónicos) [9]. Sumado a lo anterior, y a pesar de que en los tres casos se pueden provocar complicaciones neurológicas como síndrome de Guillain-Barré, encefalopatías y neuritis óptica, son más frecuentes en la enfermedad causada por ZIKV y, particularmente, este virus es el único asociado con malformaciones congénitas como microcefalia [6]. Pese a lo expuesto, no existe un tratamiento antiviral específico disponible contra estos tres arbovirus [10-12], por lo que la atención médica se limita al manejo de los síntomas presentados por el paciente [13]; lo que evidencia la necesidad de continuar las investigaciones que permitan el reconocimiento de compuestos con actividad antiviral contra DENV, CHIKV y ZIKV.

En conexión con lo anterior, durante los últimos años, los productos naturales se han utilizado como un recurso para el desarrollo de nuevos fármacos antivirales, que incluyen productos de origen natural, análogos semisintéticos derivados de productos naturales y compuestos sintetizados que fueron diseñados usando productos naturales como modelos [14]. Además, las herramientas bioinformáticas han proporcionado una mejor comprensión de las interacciones entre una proteína y compuestos promisorios [15], así como la optimización de los fármacos, para mejorar su efectividad y reducción de efectos adversos [16].

A continuación, se describirá el marco teórico de las características de la enfermedad, epidemiología, patogénesis, características estructurales, ciclo replicativo y avances en antivirales contra estos tres arbovirus, así como una descripción de las plantas y compuestos de interés en nuestro estudio.

### 1.1. Dengue

**1.1.1 Enfermedad del dengue.** El dengue es considerado como la enfermedad arboviral más importante a nivel mundial, causada por la infección de alguno de los cuatro serotipos de DENV (DENV-1 a DENV-4) [17]. La infección por DENV puede provocar un amplio espectro de manifestaciones clínicas [18]. En este sentido, después del período de incubación, los pacientes pueden experimentar fiebre de inicio repentino, con una duración de 2 a 7 días y a menudo se acompaña de síntomas como mialgia, artralgia, anorexia, cefalea y erupción cutánea macular. Aunque

la mayoría de pacientes experimentan un curso clínico autolimitado [17]; algunos de ellos pueden presentar signos de alarma como dolor abdominal intenso, vómito persistente, epistaxis, hepatomegalia y acumulación de líquidos, evolucionando a dengue grave, caracterizado por síndrome de choque, hemorragias y compromiso grave de órganos, que puede llevar a la muerte [7].

Su etiología viral y transmisión por mosquitos se determinaron en el siglo XX [17]. El nombre "dengue" significa "afectado" y fue usado en el Caribe para describir estos brotes. Durante la Segunda Guerra Mundial, debido al movimiento masivo de tropas, se propagó dramáticamente. Después de la Segunda Guerra Mundial, el crecimiento económico en ciudades asiáticas condujo a un rápido crecimiento de la población y preparó el escenario para epidemias por "dengue hemorrágico"; la primera de ellas registrada en Filipinas (1953-54), seguida de Tailandia (1958), luego Malasia, Singapur, Vietnam, Indonesia y Myanmar (Birmania) en los años sesenta y setenta. En la década de 1980, el dengue hemorrágico fue una de las principales causas de enfermedad y muerte infantil en algunas naciones del sudeste asiático [19]. En la actualidad, esta enfermedad es endémica en más de 100 países de las regiones de África, América, el Mediterráneo Oriental, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental [20]. Cada año se producen 390 millones de infecciones por DENV, de los cuales 96 millones se manifiestan clínicamente [20]. Para la Región de las Américas, se notificaron 2.029.342 casos de dengue, de los cuales, 846.342 casos (42%) fueron confirmados por laboratorio, 12.268 casos (0,6%) clasificados como dengue grave, con una letalidad de 0,04%, entre la semana uno (1) y treinta (30) de 2019 [21].

**1.1.2 Patogénesis de DENV.** La infección por DENV inicia con la picadura de mosquitos a los humanos, infectando las células de Langerhans y queratinocitos. Estas células se dirigen a los ganglios linfáticos, sitio donde se amplifica la infección en monocitos. El virus se disemina a través del sistema linfático, y luego a capilares sanguíneos. Como resultado de esta viremia primaria, se infectan células del linaje mononuclear, incluidos los monocitos, macrófagos esplénicos y hepáticos [22]. La patogénesis de DENV está influenciada por el serotipo y cepa infectante, y por la presencia de anticuerpos dirigidos a proteínas virales que generan reacción cruzada contra factores del hospedero [23].

En primer lugar, los anticuerpos anti-NS1 generan reacción cruzada con células hepáticas, células endoteliales y plaquetas [22]. Específicamente, las células endoteliales son alteradas funcionalmente, y en los tejidos pulmonar e intestinal, puede conllevar a casos fatales por pérdida del plasma en cavidad pleural y peritoneal [22]. En el caso de las plaquetas, provoca agregación plaquetaria y fragilidad capilar, asociada a la aparición de petequias y hemorragias [22]. Además, la proteína NS1 induce la activación del complemento y la producción del complejo C5b-C9, que estimula la producción de citoquinas inflamatorias asociadas con el desarrollo de las manifestaciones graves de la enfermedad [24, 25]. Por otra parte, los anticuerpos dirigidos a la proteína E de DENV, pueden generar reacción cruzada con el plasminógeno (precursor de plasmina), lo que favorece la aparición de signos clínicos como trombosis y Coagulación Intravascular Diseminada (CID) [22].

Uno de los principales mecanismos patogénicos de DENV es la Amplificación dependiente de Anticuerpos (ADE) [26, 27]. Este mecanismo ocurre cuando los anticuerpos producidos contra un serotipo específico de DENV (infección primaria) generan reacción cruzada contra otro serotipo infectante (infección secundaria) a una concentración incapaz de neutralizarlo, favoreciendo la internalización del nuevo serotipo infectante en fagocitos mononucleares que expresan en su superficie receptores Fc (FcγR) [28]. Este fenómeno se ha asociado con anticuerpos dirigidos a la

proteína prM, los cuales pueden favorecer el ingreso de partículas virales inmaduras a células que expresan receptores Fc, contribuyendo al desarrollo de la enfermedad grave durante la infección secundaria [27].

Además, durante la fase aguda de una infección secundaria con un DENV heterólogo, las células T CD8<sup>+</sup>, altamente reactivas cruzadas por el serotipo infectante, producen altas concentraciones de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-13 y posteriormente, mueren por apoptosis [22].

**1.1.3 DENV.** El DENV es el representante más importante de la familia *Flaviviridae* y el género *Flavivirus* [29]. Forma parte de un serocomplejo en el que se reconocen 4 serotipos (DENV-1 a DENV-4), que a pesar de ser filogenéticamente diferentes, comparten analogías estructurales y patogénicas con una homología de secuencia cercana al 65% [30]. Aunque todos los serotipos tienen la capacidad de producir formas graves de la enfermedad, se ha reportado mayor severidad en el cuadro clínico de pacientes infectados con DENV-2, seguido por DENV-3, DENV-1 y en última instancia DENV-4 [31].

Estructuralmente, el DENV se compone de una cápside icosaédrica (diámetro de 50nm), que contiene en su interior el genoma viral y está rodeada por una envoltura adquirida de la célula hospedera [32]. El RNA viral se caracteriza porque posee en su extremo 5' una Cap tipo 1 y el extremo 3' carece de cola poliA [33, 34]; con un ORF, que codifica para tres proteínas estructurales (proteína de cápside - C, Envoltura- E y proteína precursora de membrana -prM) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) [35, 36]. Las proteínas estructurales son la proteína de cápside (C), proteína precursora de membrana (prM), y proteína de envoltura (E) [37].

La proteína C cumple una participación esencial en el ensamblaje del virión mediante la formación de un complejo riboproteico (nucleocápside) con el RNA recién sintetizado, protegiéndolo de la degradación. Esta proteína se acumula en gotas lipídicas durante el ciclo replicativo, favoreciendo la modulación del metabolismo de los lípidos durante la infección (triglicéridos y ésteres de esteroles rodeadas por una monocapa de fosfolípidos, recubiertos por diferentes proteínas) y regulando la respuesta antiviral e inflamatoria del hospedero (generación de prostaglandinas y leucotrienos). Posee además un dominio hidrofóbico interno que media su asociación con la membrana del RE, permitiendo la translocación de prM en la luz ER [38].

La proteína precursora de membrana (prM), por su parte, se encuentra presente en los viriones inmaduros y al igual que la proteína M, cumple una función representativa en la maduración de la partícula viral. La proteína prM actúa como chaperona para el correcto plegamiento y ensamblaje de la proteína E [39]. PrM protege a la proteína E de una reorganización inducida por el pH ácido y una fusión prematura durante la secreción, mediante la formación de heterodímeros prM – E [28], que se extienden como picos triméricos en la superficie de la partícula viral, confiriéndole una estructura puntiaguda [35]. El virión que expresa prM es inmaduro, ya que la presencia de esta proteína obstruye los cambios conformacionales inducidos por el pH bajo en la proteína E requerida para la fusión de la membrana del virus [30]. Por el contrario, cuando DENV pasa a través de la Red Trans-Golgi (TGN) para sufrir el proceso de maduración, la proteasa celular furina cliva a prM en el péptido pr y la proteína M, induciendo cambios conformacionales en la superficie del virión, dado que, en ausencia de la proteína precursora de membrana, la glicoproteína E se organiza como homodímeros en posición contraria a la superficie viral, formando de esta manera una estructura lisa (virión maduro) [40]. Adicional a lo expuesto, la glicoproteína E es el principal antígeno que induce inmunidad protectora y

determina el tropismo de DENV [28]. Se compone de tres dominios, un dominio estructural central (dominio I), uno de dimerización (dominio II), que median la fusión de membranas, y el dominio III, que media la interacción con los receptores celulares, favoreciendo la entrada a la célula [40].

Por otro lado, el RNA de DENV codifica para siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5. Específicamente, la proteína NS1 se asocia a balsas lipídicas presentes en la membrana plasmática de la célula hospedera [28]. Además, es secretada al espacio extracelular estimulando la lisis mediada por complemento dependiente de anticuerpos o la unión a proteínas del hospedero [41]. Los anticuerpos anti-NS1 están involucrados en la patogénesis de DENV [42].

NS2A define si el RNA producido en cada ciclo de replicación se utiliza como nueva plantilla para duplicar su genoma o se asocia dentro de la nucleocápside durante el ensamblaje viral. Por su parte, NS2B, al igual que NS4A actúan como cofactores de NS3, promoviendo su actividad proteolítica en la escisión de poliproteínas en proteínas funcionales necesarias para la propagación viral. Igualmente, NS3 actúa como trifosfatasa de nucleótidos estimulada por RNA (NTPasa) y helicasa del RNA (NS3Hel), desenrollando las estructuras secundarias que se forman en el extremo 3' del RNA viral, favoreciendo así la unión de la polimerasa NS5 sobre el RNA y el inicio de la replicación [43]. Si se afecta la actividad de la NS3 helicasa, DENV pierde la capacidad para replicarse. Por esta razón, los inhibidores o moduladores de estas enzimas son de gran interés como agentes terapéuticos [14]. La proteína NS3 se compone de un dominio C-terminal con actividad RNA trifosfatasa y helicasa, y un dominio N-terminal con actividad serin proteasa; sin embargo, su actividad proteolítica de NS3 depende de la interacción con el cofactor NS2B [28]. NS4B es una proteína con alta hidrofobicidad que se integra en la membrana del RE induciendo rearrreglos para la formación de complejos replicativos [28].

Por último, NS5 actúa como la única polimerasa durante la replicación y transcripción virales. En el extremo N-terminal posee actividad enzimática de metiltransferasa y guanidiltransferasa, responsables del capping y la metilación del extremo 5' del RNA genómico, mientras que, en el extremo C-terminal, se ubica el dominio de RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRps) [14], encargado de sintetizar el RNA viral *de novo* [37].

**1.1.4 Ciclo replicativo de DENV.** DENV comienza por la unión del virus a receptores en la superficie celular a través de la glicoproteína E [44], mediante la interacción con los receptores celulares DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin), TIM (T cell/transmembrane, immunoglobulin, and mucin), receptores de manosa y AXL (AXL Receptor Tyrosine Kinase), HSP70, HSP90 (heat shock proteins 90 and 70), y GRP78 (Glucose regulated protein 78); e involucra diferentes mecanismos de internalización, incluyendo endocitosis dependiente de clatrina, vías no clásicas de clatrina, caveolas o balsas lipídicas, macropinocitosis o penetración directa, que varían con base en la célula blanco [45]. Como consecuencia de variaciones en el pH, se fusiona la proteína E con la membrana endosomal, liberando la nucleocápside, y posteriormente, el RNA viral al citoplasma [46].

Luego, por acción de proteínas virales, como NS4A, se provocan rearrreglos membranales en el retículo endoplásmico que permiten la formación de complejos de replicación del genoma viral [47], generando RNAs intermediarios negativos, que sirven de molde para la formación de una cadena de RNA de sentido positivo [1]; a partir de la cual se inicia en los ribosomas el proceso de traducción, dando lugar a una poliproteína, que posteriormente es escindida en el retículo endoplásmico por

acción de proteasas celulares y virales, tales como NS2B / NS3, para la formación de tres proteínas estructurales (C, prM y E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) [42]. El ensamblaje del RNA recién sintetizado y la proteína de la cápside ocurre dentro de gotas lipídicas. Luego, la nucleocápside entra en el lumen del retículo endoplásmico para producir partículas virales inmaduras que contienen proteínas E y prM víricas. Estas partículas son transportadas al aparato de Golgi, donde producto de la exposición un pH ácido se da la maduración de la partícula viral, por la escisión de prM a M mediada por la proteasa celular furina. Esta etapa se acompaña de reordenamientos estructurales de la glicoproteína E que conllevan a una modificación estructural de la superficie viral. Finalmente, la partícula infecciosa es liberada por gemación al exterior de la célula hospedera, adquiriendo de esta manera, la bicapa lipídica que rodea la nucleocápside [35, 48].

## 1.2 Chikungunya

**1.2.1 Fiebre del Chikungunya.** La fiebre del Chikungunya es una enfermedad viral reemergente causada por CHIKV [49], a menudo autolimitada y con una tasa de mortalidad inferior a 0,1 %, [50]. El CHIKV fue aislado por primera vez en Tanzania en 1952. La palabra “Chikungunya” en el idioma Makonde significa “Caminar inclinado”, haciendo referencia a la postura encorvada de los pacientes que manifiestan dolor articular [51]. Luego de su descubrimiento, fue endémica para Asia y África. En las Américas, fue reportado el primer caso en San Martín (2013), y desde entonces se ha extendido a 45 países y territorios en el Norte, Centro y Sudamérica [51], presentándose aproximadamente en las Américas 1.118.578 casos sospechosos y 25.627 casos confirmados entre 2013 y 2014 [52].

A pesar de que aproximadamente el 15 % de los casos son asintomáticos; la enfermedad se puede clasificar en tres fases (aguda, post-aguda y crónica), de acuerdo con la duración de los signos y síntomas [53]. Las manifestaciones clínicas que caracterizan la etapa aguda (inferior a 21 días) son fiebre superior a 39°C, rigidez, fotofobia, cefalea, erupción petequial o maculopapular, y poliartralgia intensa; siendo este último, el principal síntoma de la enfermedad causada por CHIKV, especialmente en extremidades como tobillos, muñecas y falanges, aunque también puede extenderse a grandes articulaciones [49]. Por otra parte, se considera que los pacientes están en la fase post-aguda cuando la duración de las manifestaciones clínicas supera los 21 días y puede extenderse a tres meses; mientras que la etapa crónica se caracteriza por la persistencia de artralgia superior a tres meses [53], acompañada de otras manifestaciones como hinchazón local, síntomas cutáneos, mialgia y dolor osteoligamentario; que pueden provocar un impacto en la calidad de vida de los pacientes, generando dependencia para realizar actividades diarias [54]; así como consecuencias económicas [55].

Aunque poco frecuente, se pueden presentar cuadros clínicos graves con manifestaciones como encefalopatía, encefalitis, alteraciones cardiovasculares y trastornos respiratorios, insuficiencia renal, hepatitis y miocarditis, pero que generalmente están asociadas a pacientes con afecciones médicas subyacentes como hipertensión o enfermedades respiratorias y cardiovasculares [56, 57]. Se han notificado además casos de transmisión vertical por barrera placentaria y durante el parto, cuya transmisión antes de las 16 semanas de gestación puede provocar muerte fetal sin malformaciones, y en el periodo perinatal puede provocar alteraciones neurológicas (meningoencefalitis) [58].

**1.2.2 Patogénesis.** La infección por CHIKV inicia por la inoculación del virus a través de la piel, por la picadura de mosquitos infectados, donde el virus realiza la primera ronda de replicación en fibroblastos, macrófagos dermales o células endoteliales, para luego diseminarse a órganos linfoides secundarios, donde infectan células migratorias y se diseminan rápidamente a través de los ganglios

linfáticos para posteriormente ser liberados a circulación, alcanzando tejido hepático, muscular, sistema nervioso central y articulaciones, dando lugar a la fase virémica de la enfermedad (2-10 días) [59]. Esta fase se caracteriza por la replicación viral, alcanzando títulos de  $3,3 \times 10^9$  copias genómicas/mL [60]. En esta etapa, el virus es transmisible por la picadura del mosquito. Durante la fase aguda, se activa una respuesta inflamatoria en tejidos infectados, provocando una infiltración de macrófagos y monocitos, neutrófilos, células Natural Killer (NK) y linfocitos, y se liberan quimiocinas y citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-8 y MCP-1), provocando mialgia y poliartralgia en las articulaciones distales [50].

En las etapas posteriores de la enfermedad, la infiltración de tejidos sinoviales y el mantenimiento de un entorno inflamatorio contribuyen probablemente al desarrollo de artritis crónica [50], manifestación que también podrían estar provocada por la persistencia del virus infeccioso o del RNA viral, predisposición genética o inducción de enfermedades autoinmunes (reumatismos inflamatorios crónicos como Artritis Reumatoidea) [61]. Además, la gravedad de la enfermedad en la fase aguda también está relacionada con el riesgo de desarrollar poliartralgia en la fase crónica [62].

**1.2.3 CHIKV.** El CHIKV hace parte de la familia *Togaviridae* y el género *Alphavirus* [63]. Se conocen tres genotipos: Asia (Asia), Este, Centro y Sur de África (ECSA), y las cepas del África Occidental (WA) [64]; siendo Asia, el genotipo presente en América [65]. Genéticamente, se compone de un RNA monocatenario de polaridad positiva ssRNA (+), con una longitud de aproximadamente 11 kb, que se caracteriza por una Cap en la posición 5' y una cola de poli-A en su extremo 3', además de comprender dos ORFs (open reading frame): uno en el extremo 5' que codifica para cuatro proteínas no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4) y otro en el extremo 3' traducido en un precursor de la poliproteína que contiene las proteínas estructurales (proteína precursora de E2 -PE2, E1, C y 6K) [2, 5].

El virión de CHIKV está formado por una envoltura de bicapa lipídica adquirida de la célula hospedera y glicoproteínas virales E1 y E2 dispuestas en trímeros, que rodea la nucleocápside de simetría icosaédrica que aloja el RNA genómico [66]. Las glicoproteínas E1 y E2 forman parte de la envoltura viral y median el reconocimiento del receptor de las células hospederas para facilitar la unión y entrada de CHIKV [67]. Adicionalmente, las proteínas 6K y E3, son péptidos líderes para E1 y E2, respectivamente, que se observan con poca frecuencia en el virión maduro. En el caso de 6K, es una proteína pequeña cuya participación en el proceso de replicación no ha sido definida con claridad, pero se ha evidenciado su acción como una secuencia señal para el procesamiento de la proteína E1. Finalmente, la proteína E3 es importante para dirigir las proteínas estructurales al retículo endoplásmico, y desempeña un papel en la regulación del pH durante el ciclo viral [59] [67].

CHIKV se compone de cuatro proteínas no estructurales: NSP1, NSP2, NSP3 y NSP4 con actividades enzimáticas relacionadas con la síntesis del genoma del RNA viral, la metilación del cap 5' del genoma viral y el procesamiento de proteínas [68]. Específicamente la proteína no estructural NSP1 está implicada en la maduración del mRNA viral recién sintetizado a través de la actividad enzimática de guanina-7-metiltransferasa y guanililtransferasa, por lo que su inhibición suprime la replicación de CHIKV y, por tanto, representa un objetivo terapéutico [69]. Por su parte, NSP2 incluye funciones de RNA helicasa, nucleósido trifosfatasa (NTPasa) y RNA dependiente de las actividades 5' trifosfatasa (extremo N-terminal de la proteína), y actividad proteolítica (extremo C' terminal), necesaria en la escisión de poliproteínas no estructurales, críticas para la replicación viral. Además, NSP3 es una proteína accesoria implicada en la síntesis de RNA y finalmente, NSP4 actúa como RNA

polimerasa dependiente de RNA (RdRp) [69].

**1.2.4 Ciclo replicativo de CHIKV.** El ciclo replicativo de CHIKV comienza por la interacción de la proteína E2 con receptores celulares, tales como glucosaminoglucanos, prohibitina, fosfatidilserina, DC-SIGN y L-SIGN (Liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin). Posteriormente, este virus utiliza la endocitosis mediada por clatrina como mecanismo de internalización [56, 70]. Una vez entra a la célula, la envoltura viral experimenta cambios conformacionales, dentro del endosoma, ocasionados por la exposición a pH ácido, exponiendo la glicoproteína E1 para fusionar la envoltura de CHIKV con la membrana endosomal de la célula hospedera [50, 70]. Como resultado, se libera la nucleocápside en el citoplasma, y posteriormente el RNA genómico, el cual se traduce en una poliproteína que se escinde en cuatro proteínas no estructurales: NSP1, NSP2, NSP3, y NSP4; que se asocian junto con proteínas del hospedero para formar el complejo de replicación viral, necesario para la síntesis de dos tipos de RNA, subgenómico y genómico [69]. El RNA subgenómico codifica para el precursor de la poliproteína, que se cliva en las proteínas estructurales C, pE2, 6K y E1[71]. La proteína de cápside se libera, y las proteínas pE2 y E1 asociadas sufren modificaciones post-traduccionales en la red Trans-Golgi y son exportadas a la membrana plasmática, donde pE2 se escinde en E2 y E3 [72]. Luego, en el citoplasma, se ensambla la proteína de cápside con el RNA genómico para formar la nucleocápside, y finalmente las partículas virales se liberan de la célula hospedera por gemación, adquiriendo en este paso la bicapa lipídica de la membrana celular que contiene heterodímeros de las proteínas E1 y E2 [73].

### 1.3 Zika

**1.3.1 Enfermedad del Zika.** La enfermedad del Zika es causada por el virus ZIKV, y es transmitida por la picadura de mosquitos infectados, contacto sexual, transmisión vertical, transfusiones sanguíneas y atención hospitalaria [74]. El período de incubación para ZIKV varía de 3 a 14 días. Las manifestaciones clínicas son leves y se caracterizan por fiebre, erupción cutánea, cefalea, artralgias, conjuntivitis, mialgia y pueden provocar complicaciones como el síndrome de Guillain-Barré en adultos y microcefalia, desarrollo cerebral deteriorado, pérdida auditiva, convulsiones, movimiento articular deteriorado, deformidades faciales y problemas de visión en recién nacidos [75, 76].

ZIKV se aisló por primera vez de un macaco Rhesus del bosque Zika en Uganda (1947), y en 1952 a partir de un ser humano [74]. La distribución geográfica del ZIKV entre 1969 y 1983 se limitó a Asia y África, con casos esporádicos y síntomas leves en humanos. Sin embargo, en 2007, ZIKV se propagó hasta la isla de Yap, en el Pacífico, y causó el primer gran brote en humanos, identificándose 185 casos sospechosos [77], de los cuales 49 fueron confirmados por laboratorio. Luego, se informaron brotes en la Polinesia Francesa, Isla de Pascua, Islas Cook y Nueva Caledonia durante 2013–2014 y en 2015 se confirmó la circulación del ZIKV en Brasil. La transmisión asociada a mosquitos se ha informado en 48 países de las Américas desde su introducción [78], llegándose a presentar en las Américas hasta 31.576 casos en 2018 [79].

**1.3.2 Patogénesis.** La patogénesis de ZIKV inicia por la picadura de mosquitos infectados. Hace su primera ronda de replicación en fibroblastos dérmicos, queratinocitos epidérmicos y células dendríticas inmaduras; y se propaga a ganglios linfáticos, donde se replica, y llega a capilares sanguíneos, diseminándose a tejidos periféricos [80]. Se ha demostrado tropismo por células de Hofbauer (placenta), trofoblastos, células endoteliales, espermatogonias, células de Sertoli y células de Leydig, espermatozoides, epitelio vaginal y fibroblastos uterinos. ZIKV infecta células neuronales, incluidas las

células progenitoras neurales, las neuronas maduras y astrocitos, induciendo liberación de citoquinas proinflamatorias que provocan apoptosis de células progenitoras neurales, lo cual afecta el desarrollo neurológico y provoca complicaciones como microcefalia congénita [81].

Se ha asociado a casos de síndrome de Guillain-Barré en adultos, durante o después de la infección aguda, lo que sugiere que la desmielinización de los nervios periféricos se debe a un efecto mediado por el virus o producción de anticuerpos contra las neuronas y las células gliales. Por otro lado, el virus infecta células del nervio óptico y se propaga a través de la retina infectando las células ganglionares y células de Müller, provocando adelgazamiento de la capa plexiforme externa e inflamación local, lo que conlleva a la cicatrización crónica de la retina [76]. El ZIKV se puede transmitir vía vertical en el útero o después del nacimiento (placenta, leche materna o contacto directo), y se detecta en fluidos corporales como lágrimas, semen, moco cervical, saliva y orina [81].

**1.3.3 ZIKV.** ZIKV pertenece a la familia *Flaviviridae* y al género *Flavivirus* [29]. Se han reportado dos linajes distribuidos de manera geográfica con una similitud del 90 % de la secuencia nucleotídica y 59 aminoácidos de la poliproteína: el linaje africano (incluyendo cepas aisladas en África occidental y central), y el asiático [82], que incluye cepas del Sudeste de Asia, región del Pacífico y cepas aisladas en América [80].

La partícula viral posee un diámetro de 50 nm, la cual expone en su envoltura heterodímeros de las proteínas E y M [83]. Comparte la misma naturaleza genómica de DENV, pero se diferencian en que poseen en su extremo 5' una Cap tipo 1 y el extremo 3' carecen de cola poliA [33]; con un ORF, que codifica para tres proteínas estructurales (proteína de cápside - C, Envoltura- E y proteína precursora de membrana -prM) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) [35, 84]. La proteína C de ZIKV participa en el ensamblaje viral mediante la formación de un complejo de nucleocápside con el RNA viral, protegiéndolo además de la degradación [85]. La proteína prM se ha asociado a la microcefalia fetal [86]. La proteína E se compone de tres dominios. El dominio I central de la estructura de la envoltura, y el dominio II y III, que participan en la fusión de membranas e interacción con los receptores celulares, respectivamente [85].

Las proteínas no estructurales de ZIKV forman un complejo replicativo y tienen una participación importante en el antagonismo de la inmunidad innata del hospedero [84]. En este sentido, la proteína NS1 participa en el complejo de replicación junto con las proteínas transmembrana (NS2A, NS4A y NS4B) y con las proteínas citoplasmáticas NS3 helicasa, cofactor NS2B y NS5. Sumado a lo anterior, NS1 es secretada al espacio extracelular, modulando la respuesta inmune del hospedero y la patogénesis al interactuar con los factores y componentes del sistema inmunitario innato y adaptativo; además de interactuar con otras proteínas de flavivirus como proteínas prM y E [87]. NS2A participa en la modulación de la respuesta antiviral del hospedero [80]. La proteína NS3, por su parte, es esencial para la replicación viral y el procesamiento de la poliproteína [84], Se conforma por un dominio helicasa, que tiene actividad nucleósido trifosfatasa (NTPasa), y un dominio serina proteasa que forma un complejo con su cofactor (NS2B), para el procesamiento de la poliproteína [87]. NS4A y NS4B son componentes esenciales del complejo de replicación de flavivirus [80].

Finalmente, NS5 cumple un papel esencial en la replicación viral. Esta proteína se compone por dos dominios estructurales y funcionales: un dominio de RNA metiltransferasa (dominio MTasa) y un dominio de RNA polimerasa dependiente de RNA (dominio RdRp) [87]. También, suprime la señalización de IFN a través de la degradación dependiente de proteasoma de STAT2 humano [84].

**1.3.4 Ciclo replicativo de ZIKV.** El ciclo replicativo de ZIKV comienza por la interacción del dominio III de la glicoproteína E viral [44], con receptores celulares (DC-SIGN, TIM, receptores de manosa y AXL) [88]. Posteriormente, el virus ingresa a las células por endocitosis dependiente de clatrina [89], se fusiona a través del Dominio II de la proteína E de ZIKV con la membrana endosomal, para la liberación de la nucleocápside y el RNA viral al citoplasma [90]. Después, se forman los complejos de replicación viral por interacción de la proteína NS4A con la membrana del retículo endoplásmico (RE) [47]. En este sitio, ocurre la síntesis de RNA de sentido positivo, que sirve de molde para el inicio de la traducción de una poliproteína, que luego, es escindida en el RE por acción de proteasas celulares y virales, en tres proteínas estructurales (C, prM y E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5)[42, 91]. Luego, se ensambla el RNA viral con proteínas de cápside; para producir partículas virales inmaduras que contienen proteínas E y prM víricas y se transportan a través de la red trans-Golgi para su maduración. En este transporte, prM protege a la proteína E de la fusión prematura en condiciones de pH bajo [92]. Después, la furina celular media la escisión de prM a M [93], y finalmente, la partícula viral adquiere su envoltura en el proceso de gemación [48, 91].

## 1.4 Plantas de la Región Caribe colombiana de interés en nuestro estudio

Dado que las plantas son una importante fuente de compuestos con propiedades terapéuticas, incluyendo el potencial antiviral [94], en este trabajo se incluyeron tres plantas recolectadas de la Región Caribe colombiana: *Tabernaemontana cymosa* Jacq., *Chenopodium ambrosioides* L. y *Capparis odoratissima* Jacq. A continuación, se hará una breve descripción de cada una de estas.

**1.4.1 *Tabernaemontana cymosa* Jacq.** *T. cymosa* Jacq. (conocida como cabo de hacha, huevo de toro, cojón de burro, huevo de perro [95]), se caracteriza por alcanzar hasta 15 pies de altura, ramas provistas de hojas ovadas-lanceoladas agudas, enteras o apenas onduladas, cimas axilares con alrededor de 40 flores color blanco rojizo [96]. Para esta especie se ha reportado la presencia de alcaloides, flavonoides y derivados antracénicos, saponinas, triterpenos, esteroides y quinonas [97].

Taxonómicamente, *T. cymosa* Jacq. se clasifica en [98]:

**Clase:** Equisetopsida C. Agardh

**Subclase:** Magnoliidae Novák ex Takht.

**Superorden:** Asteranae Takht

**Orden:** Gentianales Juss. ex Bercht. & J. Presl.

**Familia:** Apocynaceae Juss.

**Género:** *Tabernaemontana* L.

**Especie:** *T. cymosa* Jacq

El género *Tabernaemontana* incluye alrededor de 100 especies distribuidas en el Neotrópico y Paleotrópico [96], para las cuales se han descrito actividades biológicas como antioxidante, antitumoral, antiinflamatoria y antimicrobiana [99]. En particular, para la especie *T. cymosa* Jacq., se ha reportado la actividad larvicida contra *A. aegypti*, [100], antiviral contra DENV y CHIKV [46] [101] y su uso en el tratamiento de enfermedades epiteliales [95].

**1.4.2 *Chenopodium ambrosioides* L.** El género *Chenopodium*, comprende 250 especies aproximadamente [102]. De manera específica, *C. ambrosioides* L. es una planta herbácea, perteneciente a la familia Chenopodiaceae (conocida comúnmente como paico, epazote, hierba santa,

hierba de Santa María, hierba hedionda, pichín y té de los jesuitas). Es natural de América Central, con una altura alrededor de 100 cm, tallos ramificados, hojas ovales y dentadas, flores en racimos y semillas negras. Se encuentra adaptada a climas cálido, semicálido, seco y templado [102, 103].

La clasificación taxonómica de esta planta es [103]:

**Clase:** Equisetopsida C. Agardh

**Subclase:** Magnoliidae Novák ex Takht.

**Superorden:** Caryophyllanae Takht.

**Orden:** Caryophyllales Juss.ex Bercht. & J. Presl

**Familia:** Amaranthaceae Juss.

**Género:** *Chenopodium* L.

**Especie:** *C. ambrosioides* L.

Para *C. ambrosioides* L., se ha demostrado previamente sus propiedades antioxidantes [104], antifúngica [105], antibacteriana (*Staphylococcus aureus*), antihelmíntica y antiprotozoaria contra *Tripanosoma cruzi*, *Plasmodium*, *Leishmania amazonensis*, *Ancylostoma duodenale*, *Trichuris trichuria* y *Ascaris lumbricoides*, antiviral contra el virus del mosaico del tabaco [106, 107], y para el tratamiento de trastornos gastrointestinales [108],

**1.4.3 *Capparis odoratissima* Jacq.** El género *Capparis* se conforma de 250 especies [109]. Específicamente, *C. odoratissima* Jacq. se encuentra presente en la Región Caribe Colombiana [110] y crece en el monte espinoso tropical, respondiendo de manera negativa al incremento en las temperaturas y de manera positiva al incremento en las precipitaciones [111]. Se caracteriza por arbustos perennifolios o árboles medianos, de 4 a 15-20 metros de altura, troncos entrecruzados, hojas arregladas en espiral, iguales, elípticas a oblongas u obovadas y abundantes flores. Sus frutos son puntiagudos en ambos extremos, lisos, irregularmente contraídos alrededor de las semillas, pulpa rojo-anaranjado brillante y semillas cubiertas por un arilo rojo brillante, aceitoso y embebidas en la pulpa o colgando de un hilo fino [112].

Esta planta se clasifica taxonómicamente en [112]:

**Clase:** Equisetopsida C. Agardh

**Subclase:** Magnoliidae Novák ex Takht.

**Superorden:** Rosanae Takht.

**Orden:** Brassicales Bromhead

**Familia:** Capparaceae Juss.

**Género:** *Capparis* L.

**Especie:** *C. odoratissima* Jacq.

Para el género *Capparis* se han reportado previamente actividades biológicas como antihipercolesterolemica, antiinflamatoria, analgésica, antidiabética, antimicrobiana, antihipertensiva y antihelmínticas. Además, se han aislado a partir de esta planta flavonoides, glucósidos, compuestos fenólicos, triterpenoides, saponinas, vitaminas, pigmentos de color y compuestos intermedios de diferentes especies [109]. Para *C. odoratissima* Jacq. se reportó el potencial antiviral de sus extractos etanólicos contra DENV [113], actividad anticancerígena y su uso en el tratamiento de afecciones dermatológicas [97].

## 1.5 Isoprenoides

Los isoprenoides o terpenoides son compuestos derivados del isopreno (2-metil-1,3-butadieno), un hidrocarburo de cinco carbonos (C<sub>5</sub>) [114]. Se clasifican en monoterpenos (C<sub>10</sub>), sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), diterpenos (C<sub>20</sub>), triterpenos (C<sub>30</sub>), tetraterpenos (C<sub>40</sub>) y politerpenos (> C<sub>40</sub>), de acuerdo al número de isoprenos presentes en su estructura [114]. Los triterpenos pueden ser lineales o ciclados, dentro de este último grupo se ubican los esteroides y triterpenoides pentacíclicos [115]. Las dos vías biosintéticas de los isoprenoides son la vía del ácido mevalónico (MVA) y la vía no mevalónica (2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato - MEP) [114]. La vía MVA se encuentra en animales, plantas (citosol), hongos y arqueas, mientras que la vía MEP se ha identificado en eubacterias, algas verdes y plantas superiores. Las plantas pueden usar las vías MEP y MVA, aunque con una segregación compartimental entre ellas. Cabe resaltar que el isopentenil difosfato 2 (IPP - 2) y el dimetilalil difosfato 3 (DMAPP - 3) son los precursores de los isoprenoides en todos los organismos vivos [114].

Este grupo incluye más de 30.000 compuestos conocidos, con un amplio espectro de actividades biológicas, como pigmentos fotosintéticos, función reguladora del crecimiento y desarrollo, glicosilación de proteínas, o elementos estructurales y funcionales de la membrana celular (esteroides) [116]. Además, se les ha descrito diferentes propiedades terapéuticas como antimicrobianas, antifúngicas, antivirales, antihiper glucémicos, antiinflamatorios, antioxidantes, antiparasitarios e inmunomoduladoras [117].

En este trabajo se incluyeron dos esteroides, Alfa - Espinasterol, derivado de *T. cymosa* Jacq. y Estigmasterol derivado de *C. odoratissima* Jacq.; y dos triterpenoides pentacíclicos, Lupeol derivado de *C. ambrosioides* L. y Friedelina derivado de *C. odoratissima* Jacq. aislados a partir de extractos de plantas de la Región Caribe colombiana. Los esteroides están formados por cuatro anillos aromáticos derivados del Esterano, con un grupo hidroxilo polar en el carbono 3, mientras que la estructura restante es no polar [118, 119]. En el caso de los triterpenoides pentacíclicos, Lupeol está compuesto por un esqueleto de Lupano, con una modificación en la posición 3 Beta del Hidrógeno por un grupo Hidroxilo [120]; mientras que Friedelina, es un perhidropiceno con sustitución por un grupo oxo en la posición 3, y con ocho grupos metilo [121].

Tanto los fitoesteroides como los triterpenoides pentacíclicos comparten como último intermediario en su ruta biosintética el 2,3 - oxidoescualeno [122] [123]. Este compuesto puede ciclarse en conformación silla-bote-silla para la formación del Lanosterol (precursor del colesterol) o Cicloartenol (precursor de fitoesteroides como el Alfa- Espinasterol y Estigmasterol) o, para el caso de los triterpenos, ciclarse en conformación silla- silla- silla, dando lugar a una amplia variedad de estructuras dentro de las que se encuentran los triterpenoides pentacíclicos como el Lupeol y la Friedelina [115, 122].

## 2. ANTECEDENTES

Actualmente no se cuenta con un tratamiento antiviral específico disponible contra CHIKV, ZIKV y DENV [10] [11] [12], sin embargo, se han realizado investigaciones durante los últimos años enfocadas en la búsqueda de agentes con potencial antiviral contra estos arbovirus, dentro de los que se destacan los compuestos de origen natural, semisintéticos, sintéticos [124-126] y fármacos de segundo uso aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) [124, 125, 127-129].

En este contexto, la naturaleza ha tenido una importante participación en la generación de agentes

terapéuticos [130]; siendo desarrollados por compañías farmacéuticas aproximadamente el 35 % de los medicamentos a partir de compuestos de origen natural (plantas, microorganismos o animales) [131], que incluyen productos naturales, análogos semisintéticos derivados de productos naturales y compuestos sintéticos diseñados utilizando como modelo productos naturales [132]. Sumado a lo anterior, y de acuerdo con la OMS (Organización Mundial de la salud), el 80 % de la población en países de Asia y África depende de la medicina tradicional como atención primaria en salud, debido a las limitaciones económicas y geográficas [130].

Adicional a lo expuesto, los antivirales pueden estar dirigidos a todos los pasos del ciclo replicativo viral, bien sea de acción directa sobre el virus (DAA, Direct-Acting Antiviral), o dirigidos a moléculas o rutas metabólicas de la célula hospedera (HTA, Host Targeted Antiviral) [69]. La evaluación de la actividad antiviral sobre diferentes etapas del ciclo replicativo de cada modelo viral, incluyen estrategias como el tratamiento antes a la infección viral (PRE -tratamiento), para la identificación de compuestos con capacidad de inhibir la entrada del virus a la célula (unión, internalización, fusión y decapsidación) [46, 133], tratamiento durante la infección viral (TRANS – tratamiento) para identificar un posible efecto virucida [133] y el tratamiento posterior a la infección viral (POST-tratamiento) en la búsqueda de compuestos con potencial de afectar etapas del ciclo replicativo posteriores a la entrada del virus a la célula (replicación viral, síntesis de proteínas, maduración, ensamblaje, liberación) [46, 134, 135].

Por otra parte, una manera de complementar y optimizar la identificación de un antiviral es mediante la implementación de la metodología *in silico*. Las herramientas biocomputacionales permiten predecir el acoplamiento (docking) de un compuesto (ligando) con un blanco viral o celular de interés (receptor), generando varias poses (orientaciones) del compuesto y asignando puntuaciones para clasificar las poses del compuesto más prometedoras, estimando la afinidad de unión del compuesto por el blanco seleccionado [125]. Es así como se pueden elegir compuestos que hacen parte de bibliotecas químicas de acuerdo con la probabilidad de tener afinidad de unión por un blanco viral o celular, necesarios en el ciclo de replicación viral, seleccionando moléculas con la puntuación más alta para ser evaluadas mediante ensayos *in vitro* o, predecir posibles sitios de interacción de un compuesto que previamente ha demostrado potencial antiviral *in vitro* contra un virus en particular [136]. Asimismo, permite la optimización de fármacos mediante el reemplazo de grupos moleculares que mejoren su afinidad por el blanco elegido para evaluar la interacción [16].

A pesar de que las investigaciones en antivirales contra estos arbovirus son extensas, a continuación, se enmarcará el estado del arte en compuestos de origen natural o extractos de plantas con actividad antiviral contra CHIKV, ZIKV y DENV, dado que esta es la naturaleza de los compuestos evaluados en este trabajo.

## 2.1 Antivirales contra DENV

Estudios previos han evaluado la actividad antiviral de compuestos de origen natural contra DENV. Tal es el caso de Talarico et al., quienes identificaron el potencial antiviral *in vitro* de polisacáridos sulfatados naturales aislados de algas rojas de los géneros *Gymnogongrus griffithsiae* y *Cryptonemia crenulata* contra los cuatro serotipos de DENV; demostrando que el galactano híbrido C2S-3 y carragenano G3d inhibieron la adsorción e internalización principalmente contra DENV-2 en células VERO, HepG2 (carcinoma hepático humano) y fibroblastos de prepucio humano [137]. Se demostró además el potencial antiviral contra DENV-2 de la Baicalina, una flavona comúnmente aislada de las

raíces de *Scutellaria baicalensis*, mediante inhibición de la adsorción viral, la replicación intracelular, y un efecto virucida [133] [138]. Por otro lado, se reportó la actividad antiviral mediante un posible efecto virucida de EGCG (Epigallocatechin Gallate) y Delfinidina contra DENV-2 [139].

Fisetina inhibió *in vitro* el RNA intracelular de DENV-2, mediante la estrategia de tratamiento antes, durante y después de la infección, en células VERO [133]. Por otra parte, en macrófagos infectados, Fisetina provocó inhibición de la infección por DENV-2 y DENV-3, e inhibición de la infección por DENV-2 en presencia de anticuerpos monoclonales contra la proteína E de DENV-2, mediante la estrategia de tratamiento posterior a la infección viral [140]. Este compuesto, reguló negativamente IL-10 en células infectadas con DENV-2 y DENV-3 en ausencia y presencia de anticuerpos anti-DENV-2, y un incremento en la secreción de INF- $\gamma$  en células infectadas con DENV-3 [140]. Además, A. Mir et al. demostraron mediante herramientas bioinformáticas la afinidad de interacción de la Fisetina con la proteína E de DENV-2 (-9.19 Kcal/mol) [141] y Qadir et al. demostraron la afinidad de la Silimarina por la NS4B de DENV-4 (>8.0 Kcal/mol) [142].

La Quercetina es un flavonoide previamente aislado de *Euonymus alatus* [143] *Toona sinensis* [144] y *Aesculus indica* [145]. Este compuesto provocó inhibición del RNA viral de DENV-2 y DENV-3, mientras que Naringenina inhibió DENV-2 mediante un efecto virucida [133]. La Quercetina provocó disminución de la secreción de IL-6 y TNF- $\alpha$  en células infectadas con DENV-2 y DENV-3 en ausencia y presencia de anticuerpos anti-DENV-2 [140]. Se demostró la regulación negativa de IL-1 $\beta$  en las células HepG2 infectadas con DENV-2 tratadas con Quercetina antes y después de la infección viral [146].

Por otra parte, se ha reportado que la Luteolina, un compuesto que ha sido aislado de flores de *Lonicera japónica*, inhibe *in vitro* etapas posteriores del ciclo de vida de DENV a través de la inhibición de la proteasa furina del hospedero y, como consecuencia podría haber una escisión ineficiente de la proteína prM, interrumpiendo el proceso de maduración del virus, disminuyendo posteriormente la viremia y la secreción de citoquinas inflamatorias asociadas con la infección por DENV. Pese a esto, este compuesto no mostró eficacia para evitar la muerte de ratones infectados, lo que ha cuestionado su potencial antiviral frente a esta infección [147].

También, se demostró el potencial antiviral *in vitro* de Curcumina, un polifenol que ha sido aislado de la especie *Curcuma longa*, para inhibir la actividad proteasa de NS2B/NS3 de DENV-2 y la inhibición de la expresión génica de ACC (acetyl-CoA carboxylase) y FASN (fatty acid synthase), e inhibe la polimerización de actina en células BHK-21 (células derivadas de riñón de *Mesocricetus auratus*) infectadas con DENV-2 [148], acumulación intracelular de proteínas virales, incremento de proteínas conjugadas con ubiquitina en la Lys48 y cambios en la morfología celular y nuclear [149]. Además, Curcumina mediante herramientas biocomputacionales demostró afinidad por las proteínas E y NS2B/NS3 de DENV (-6.12 Kcal/mol y -6.9 Kcal/mol, respectivamente) [150]. Adicionalmente, se identificó el potencial antiviral del Harmol ( $\beta$ -carbolina natural) contra DENV-2, y en menor proporción contra DENV-1, DENV-3 y DENV-4 [151].

## 2.2 Antivirales contra CHIKV

Algunos de los compuestos de origen natural identificados con potencial antiviral contra CHIKV son el Benzene-1-carboxylic acid-2-hexadecanate, aislado de extractos etanólicos de las hojas de *Tectona grandis*, el cual fue efectivo contra la cepa asiática y ECSA de CHIKV (concentración inhibitoria 50

( $CI_{50}$ ) de 7,5  $\mu$ M y 189,02  $\mu$ M, respectivamente), además de demostrar afinidad de unión con la glicoproteína E1 de CHIKV, mediante herramientas bioinformáticas [152]. Por otro lado, un estudio sistemático con 820 extractos de plantas recolectadas en Madagascar, permitió el aislamiento de dos triterpenoides (Lupenona y  $\beta$ -amirona) con una actividad antiviral moderada contra CHIKV (concentración efectiva 50 ( $CE_{50}$ ) de 77 y 86  $\mu$ M, respectivamente) [153].

La Curcumina, inhibió la infección por CHIKV y ZIKV, mediante el bloqueo de la adhesión viral en células HeLa (derivadas de adenocarcinoma de cérvix humano) [154]. Además, se identificó que EGCG, un flavonoide abundante en el té verde, bloquea la adsorción de CHIKV en células HEK293T, derivadas de riñón embrionario humano [155]. Se demostró la actividad antiviral de EGCG en etapas posteriores a la infección viral en células U2OS (derivadas de osteosarcoma humano), mediante la inhibición del RNA y liberación de partículas virales infecciosas de CHIKV [156]. Sumado a lo anterior, se demostró el efecto sinérgico de EGCG y Suramina contra la infección por CHIKV [156].

La Naringenina, una flavanona presente en uvas, limones y mandarinas, fue un compuesto promisorio contra NSP3 de CHIKV, mediante herramientas bioinformáticas (-8.4 Kcal/mol) [157]. Por otra parte, la Harringtonina, un compuesto aislado del árbol japonés *Cephalotaxus harringtonia*, inhibió la replicación viral y la síntesis de las proteínas NSP3 y E2 de CHIKV [158]. Además, la cianobacteria marina *Trichodesmium erythraeum*, ha sido fuente de productos naturales bioactivos, como Debromoaplysiatoxin y 3-Methoxydebromoaplysiatoxin, los cuales demostraron potencial antiviral mediante la estrategia de tratamiento posterior a la infección por CHIKV [159].

Fisetina, un compuesto que ha sido aislado de *Elaeagnus indica* Serv. [160] y Silimarina, componente de semillas de *Silybum marianum* (L) Gaertn [161], provocaron inhibición del RNA intracelular de CHIKV y disminución de la síntesis de proteínas E2, NSP1 y NSP3 de CHIKV [162] [163]. Adicionalmente, las Trigocherrinas A, B y F, aisladas de la corteza y madera de *Trigonostemon cherrieri* inhibieron la replicación de CHIKV en células VERO [164].

La Baicaleina demostró que inhibe la infección por CHIKV en etapas iniciales del ciclo replicativo, bloquea la adsorción de CHIKV en VERO (derivadas de riñón de *Cercopithecus aethiops*), un efecto virucida, inhibe la replicación intracelular (tratamiento antes, durante y posterior a la infección) y afecta la síntesis de proteínas E2, NSP1, y NSP3 [165]; mientras que, su metabolito (Baicalina) demostró potencial antiviral contra CHIKV mediante diferentes mecanismos antivirales [166].

Berberina, un compuesto que ha sido aislado de plantas de los géneros *Coptis* sp. y *Berberis* sp. inhibió la síntesis de RNA viral, la expresión de proteínas de CHIKV en las líneas celulares HEK293T, HOS (osteosarcoma humano) y CRL-2522 (piel de prepucio humano), sin afectar la entrada viral ni la actividad enzimática de la replicasa viral. Se identificó además que las rutas de señalización de MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases), ERK (extracellular-signal-regulated kinase), p38 MAPK y JNK (c-Jun N-terminal kinase), así como la ruta PI3K-Akt (Phosphatidylinositol 3-kinase) se activaron tras la infección con CHIKV y se redujeron luego del tratamiento de células infectadas con Berberina [167]. Al mismo tiempo, en ratones C57BL/6 infectados con CHIKV, la Berberina provocó una disminución de la carga viral y reducción de la inflamación de articulaciones, aunque no fueron estadísticamente significativas respecto a los ratones infectados no tratados [167].

### 2.3 Antivirales contra ZIKV

Uno de los compuestos de origen natural para los que se ha descrito actividad antiviral contra ZIKV es Nanchangmicina, un poliéter producido por *Streptomyces nanchangensis*, que ha demostrado potencial para inhibir la infección por ZIKV en células VERO, HBMEC (células endoteliales microvasculares de cerebro humano), Jeg-3 (coriocarcinoma humano) y U2OS, mediante el bloqueo de etapas iniciales del ciclo replicativo diferentes a endocitosis mediada por clatrina, tales como la absorción, mediante el bloqueo de la interacción de ZIKV con receptores específicos [168].

Por otro lado, se reportó la actividad antiviral mediante un efecto virucida de EGCG y Delfinidina contra ZIKV [169]. La Isoquercitrina (quercetina-3- O -glucósido), un compuesto que puede ser aislado de *Bauhinia longifolia*, inhibió ZIKV en etapas iniciales del ciclo replicativo (internalización del virus) sin afectar la integridad de la partícula viral [170]. Además, se demostró *in vitro* el potencial virucida de Berberina contra ZIKV [171] y mediante herramientas bioinformáticas demostró afinidad de unión con la proteína NS3 de ZIKV (-8.03 Kcal/mol) [172].

La Emodina, un derivado de la antraquinona, aislado de las hierbas chinas *Rheum palmatum*, *Polygonum multiflorum*, *Aloe vera* y *Cassia obtusifolia* inhibió la infección por ZIKV mediante la estrategia de PRE-tratamiento en células VERO E6 [171] y el potencial virucida de Emodina contra ZIKV [171]. También, se evaluó el efecto antiviral contra ZIKV de los extractos F-6 (principal componente: ciclohexano acetilado) y FAc-2 (mezcla de diterpenos acetilados) del alga *Dictyota menstrualis*. La fracción FAc-2 demostró potencial virucida contra ZIKV (> 90%); mientras que F-6 bloqueó la adsorción viral en células VERO mediante la inhibición de la formación de partículas virales infecciosas de ZIKV [173].

## 2.4 Actividad biológica de los Isoprenoides incluidos en este estudio

El Alfa-Espinasterol mostró actividad antiproliferativa contra las líneas celulares tumorales HeLa, MCF-7 (glándula mamaria humana), A431 (carcinoma epidermoide humano) y MRC-5 (fibroblastos de pulmón fetal humano) [174, 175], antiinflamatoria [176], antidepresiva y ansiolítica [177], mediante la inhibición de la actividad enzimática de las ciclooxigenasas COX-1 y COX-2 [178], y el antagonismo con TRPV1 (transient receptor potential cation channel) [179]; no obstante, no se ha reportado su actividad antiviral. Por otro lado, el Lupeol, Estigmasterol y Friedelina, exhiben actividades antiinflamatorias [180-182], anticancerígenas [183-185] y antibacterianas [186-188]. Lupeol y Estigmasterol han demostrado previamente actividad antiviral contra HSV-1 (Herpes Simplex Virus-1) [189, 190], y en el caso del Lupeol, contra la infección por DENV-2 en células derivadas de riñón de *Macaca mulatta* LLC-MK2 (Índice de selectividad (IS) de 13.07) [191] y virus de Hepatitis B (HBV) [192].

## 2.5 Antecedentes de nuestro grupo de trabajo

Dada la alta diversidad de plantas en Colombia, el Laboratorio de Investigaciones Fitoquímicas y Farmacológicas de la Universidad de Cartagena (LIFFUC) (Cartagena, Colombia), recolectó 27 plantas de la Región Caribe colombiana (de una o varias partes de la planta, incluyendo semillas, tallo, corteza, hojas y o flores). El material vegetal fue seleccionado basados en una encuesta etnobotánica diseñada previamente, búsqueda bibliográfica en bases de datos electrónicas sobre extractos de plantas con actividad antiviral contra flavivirus, fiebre del dengue, o fiebre amarilla, y plantas con actividad antiviral contra virus con genoma RNA, principalmente contra el virus de inmunodeficiencia humana (HIV). La identificación del material vegetal fue realizada por el Herbario

del Jardín Botánico Guillermo Piñeres (Cartagena, Colombia), y la preparación de los extractos de las plantas por el LIFFUC.

Posteriormente, gracias a la cooperación del Grupo de Investigación en Ciencias Animales (GRICA) de la Universidad Cooperativa de Colombia y el Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET) de la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia) se evaluó la actividad citotóxica y antiviral de 32 extractos derivados de las plantas recolectadas de la Región Caribe colombiana. Se identificó el potencial antiviral contra las infecciones por DENV-2/NG y DENV-2/16681 de los extractos de las plantas *Cassia grandis* L. y *T. cymosa* Jacq., con un efecto antiviral dependiente de cepa de DENV y de línea celular. En este contexto, los extractos de las plantas *C. grandis* L. inhibieron la infección por DENV-2/NG y DENV-2/16681 en porcentajes mayores a 97,5 y 90,5%, respectivamente, mientras que, los extractos de *T. cymosa* Jacq. inhibieron DENV-2/NG y DENV-2/16681 (porcentaje de inhibición mayor a 80,3 y 98,9%, respectivamente) en la línea celular VERO. En la línea celular U937, los extractos de *C. grandis* L. inhibieron DENV-2/NG y DENV-2/16681 en porcentajes mayores a 99,7 % y 79,4%, respectivamente, y los extractos de *T. cymosa* Jacq. inhibieron DENV-2/NG y DENV-2/16681 en porcentajes mayores a 67,9% y 98,3%, respectivamente [101].

De acuerdo con los resultados obtenidos, se seleccionaron 5 extractos etanólicos (*Psidium Guajava* L., *Mammea americana* L., *T. cymosa* Jacq., *C. odoratissima* Jacq. y *C. ambrosioides* L.) para hacer fraccionamiento biodirigido, identificando dos compuestos derivados de las plantas *M. americana* L., las Cumarinas A y B, y dos compuestos derivados de *T. cymosa* Jacq., el Acetato de Lupeol y la Voacangina. Adicionalmente se identificó que las Cumarinas A y B inhibieron significativamente las infecciones por CHIKV (44.0 y 92.5%, respectivamente) y DENV-2/NG (37.1 y 99.2. 5%, respectivamente); mientras que, el Acetato de Lupeol y Voacangina inhibieron significativamente la infección por DENV-2/NG (67.7 y 70,1%, respectivamente) en la línea celular VERO [46].

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de la propagación, elevada tasa de morbilidad y que DENV, CHIKV y ZIKV son los arbovirus de mayor incidencia estimada en Colombia [193], no existe un tratamiento antiviral específico disponible contra estos virus [10-12]. El tratamiento indicado para pacientes que desarrollan enfermedad febril está basado principalmente en fármacos antipiréticos, antihistamínicos, analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos [128, 194]. Para el caso de ZIKV, la única estrategia para prevenir infecciones congénitas consiste en prevenir la infección materna [76].

Adicionalmente, a la fecha no se cuenta con una vacuna comercializada contra CHIKV y ZIKV [11, 12]; mientras que, para DENV fue aprobada por primera vez una vacuna viva atenuada (Dengvaxia® - CYD-TDV), no obstante, la eficacia reportada para esta vacuna varía entre el 25 y 59 % [195], y su uso se restringe a personas entre 9 y 45 años de edad, que viven en áreas endémicas y para los que se haya confirmado una infección previa, puesto que en pacientes que cursan con una primera infección, puede aumentar el riesgo de desarrollar dengue grave [196].

Ante la ausencia de una vacuna o un tratamiento antiviral específico se han diseñado estrategias dirigidas al control de la transmisión vectorial [197]; sin embargo, estas medidas además de promover la evolución y propagación de la resistencia a insecticidas [198], han sido ineficientes e insostenibles a largo plazo para evitar la transmisión viral [199], puesto que se ha observado la expansión geográfica tanto del vector y los arbovirus, y consecuentemente, el incremento de epidemias y países afectados

por DENV, ZIKV y CHIKV [10-12]. Asimismo, se han diseñado estrategias de control genético dirigidas a reducir la población de vectores o reemplazar las existentes con poblaciones que no tengan la capacidad de transmitir los arbovirus, investigaciones que se encuentran en ensayos de laboratorio y en campo [28]; pero que, en el caso de obtener resultados satisfactorios, no son suficientes, por sí solas, para controlar las enfermedades transmitidas por mosquitos, sino que requiere de la combinación con otras estrategias existentes, para lograr un control vectorial efectivo, seguro y sostenible [200].

Frente a estas limitaciones, se evidencia la necesidad de continuar con investigaciones enfocadas en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas contra DENV, CHIKV y ZIKV. Asimismo, y de acuerdo con los resultados obtenidos previamente por nuestro equipo de trabajo en que se demostró el potencial antiviral de extractos y compuestos aislados de plantas de la Región Caribe colombiana [46] [101], se refleja la pertinencia de evaluar la actividad antiviral *in vitro* contra DENV-2, CHIKV y ZIKV, de cuatro isoprenoides aislados de las plantas *T. cymosa* Jacq., *C. ambrosioides* L. y *C. odoratissima* Jacq., para los cuales se ha reportado previamente actividad biológica y, apoyando los resultados obtenidos con herramientas biocomputacionales para predecir interacciones de dichos compuestos con blancos virales.

#### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Existe actividad antiviral de compuestos isoprenoides, aislados a partir de las plantas *T. cymosa* Jacq., *C. ambrosioides* L. y *C. odoratissima* Jacq. recolectadas en la Región Caribe Colombiana contra DENV-2, CHIKV y ZIKV?

#### **5. HIPÓTESIS**

##### **5.1 Hipótesis nula**

Los compuestos isoprenoides, aislados a partir de las plantas *T. cymosa* Jacq., *C. ambrosioides* L. y *C. odoratissima* Jacq. recolectadas en la Región Caribe colombiana no ejercen un efecto antiviral *in vitro* contra los virus DENV-2, CHIKV y/o ZIKV.

##### **5.2 Hipótesis alterna**

Los compuestos isoprenoides, aislados a partir de las plantas *T. cymosa* Jacq., *C. ambrosioides* L. y *C. odoratissima* Jacq. recolectadas en la Región Caribe colombiana ejercen un efecto antiviral *in vitro* contra los virus DENV-2, CHIKV y/o ZIKV.

#### **6. OBJETIVOS**

##### **6.1 Objetivo general**

Evaluar la actividad antiviral *in vitro* e interacciones *in silico* de cuatro compuestos isoprenoides aislados a partir de las plantas *T. cymosa* Jacq., *C. ambrosioides* L. y *C. odoratissima* Jacq. recolectadas en la Región Caribe colombiana contra DENV-2, CHIKV y ZIKV.

##### **6.2 Objetivos específicos**

1. Determinar el efecto tóxico de cuatro compuestos aislados a partir de *Tabernaemontana cymosa* Jacq., *Chenopodium ambrosioides* L. y *Capparis odoratissima* Jacq. sobre las líneas

- celulares VERO, U937 y A549, mediante un ensayo de viabilidad.
2. Evaluar el efecto inhibitorio de cuatro compuestos isoprenoides contra las infecciones por DENV-2, CHIKV y ZIKV, mediante tamizaje antiviral.
  3. Evaluar el potencial antiviral de los compuestos isoprenoides sobre las diferentes etapas del ciclo replicativo de DENV-2, CHIKV y ZIKV en la línea celular VERO, mediante las estrategias PRE, TRANS y POST-tratamiento.
  4. Comparar la actividad de los compuestos isoprenoides con efecto antiviral en las estrategias PRE y POST-tratamiento en células VERO, en otras dos líneas celulares humanas (U937 y A549).
  5. Evaluar la actividad antiviral de los isoprenoides con efecto inhibitorio en la etapa de POST-tratamiento, sobre la replicación del genoma viral y síntesis de proteínas virales.
  6. Evaluar la afinidad de interacción de los compuestos isoprenoides con una proteína estructural y una proteína no estructural de los tres modelos virales, mediante docking molecular.
  7. Evaluar la estabilidad conformacional de uno de los compuestos con efecto virucida y mejor energía de unión con la proteína E de DENV mediante dinámica molecular.

## 7. METODOLOGÍA

Este trabajo abarcó dos componentes metodológicos: una metodología *in vitro* para dar cumplimiento a los primeros cinco objetivos específicos, y una metodología *in silico* para el sexto y séptimo objetivo específico. En la figura 1 se esquematiza la secuencia de la metodología implementada para evaluar la actividad antiviral *in vitro* de los cuatro isoprenoides contra DENV-2/NG, DENV-2/16681, CHIKV/ACol y ZIKV/Col.

Para el cumplimiento del primer objetivo las células VERO, U937 y A549 fueron cultivadas (ítem 7.1.1), los stocks de los compuestos fueron preparados (7.1.6) y la toxicidad de los compuestos se evaluó mediante el ensayo de MTT (7.1.7). Para el segundo objetivo específico, las células VERO fueron mantenidas (7.1.1), los stocks de los compuestos fueron preparados (7.1.6), las infecciones se realizaron usando los virus DENV-2/NG, DENV-2/16681, CHIKV/ACol y ZIKV/Col (7.1.2), con stocks virales producidos a partir de condiciones específicas (7.1.3, 7.1.4, 7.1.5) y el tamizaje antiviral se realizó de acuerdo a como se describe en el ítem 7.2.1. La cuantificación viral se realizó usando la técnica de plaqueo (7.3.1) a partir de los sobrenadantes recolectados.

El tercer objetivo se cumplió mediante el mantenimiento de células VERO (7.1.1), la preparación de los stocks de trabajo de los compuestos isoprenoides (7.1.6) y las infecciones con los virus DENV-2/NG, DENV-2/16681, CHIKV/ACol y ZIKV/Col (7.1.2), a partir de stocks virales previamente producidos (7.1.3, 7.1.4, 7.1.5). La actividad antiviral de los isoprenoides Alfa-Espinasterol, Lupeol, Estigmasterol y Friedelina se evaluó mediante tres estrategias *in vitro* denominadas PRE- tratamiento (tratamiento antes de la infección) (7.2.2), TRANS-tratamiento (tratamiento durante la infección) (7.2.3) y POST-tratamiento (tratamiento después de la infección viral) (7.2.4). Se utilizó la técnica de plaqueo (7.3.1) para la cuantificación viral. Se recolectaron además las monocapas de VERO tratadas mediante la estrategia de POST-tratamiento para el cumplimiento del quinto objetivo.

Para el cumplimiento del cuarto objetivo las células U937 y A549 fueron cultivadas (7.1.1), los compuestos fueron preparados (7.1.6) y las infecciones se realizaron con DENV-2/NG, DENV-2/16681, CHIKV/ACol y ZIKV/Col (7.1.2), usando stocks virales previamente producidos (7.1.3, 7.1.4, 7.1.5). La actividad antiviral de los isoprenoides efectivos en la línea celular VERO, fue evaluada en

las líneas celulares U937 y A549 se evaluó mediante las estrategias PRE- tratamiento (7.2.2) y POST- tratamiento (7.2.4). A partir de los sobrenadantes recolectados, se cuantificó partícula viral infecciosa por técnica de plaqueo (7.3.1). Se recolectaron las monocapas de U937 y A549 tratadas mediante la estrategia de POST-tratamiento para el cumplimiento del quinto objetivo.

La metodología implementada para el cumplimiento del quinto objetivo fue la recolección de monocapas de VERO, U937 y A549 tratadas mediante la estrategia de POST-tratamiento (7.2.4) para evaluar la actividad antiviral de los isoprenoides sobre la replicación viral (sólo los compuestos que demostraron potencial antiviral al cuantificar las partículas virales infecciosas de DENV-2, CHIKV/ACol y/o ZIKV/Col en los objetivos tres y cuatro, mediante la estrategia de POST-tratamiento). Se cuantificó el número de copias genómicas por RT-qPCR (7.3.2).

Además, para evaluar la actividad antiviral de los isoprenoides sobre la síntesis de proteínas virales (objetivo cinco), se seleccionaron los isoprenoides que fueron efectivos mediante la estrategia POST-tratamiento (7.2.4) en los objetivos tres y cuatro. Para lo anterior, se mantuvieron las células VERO, U937 y A549 (7.1.1), las infecciones se realizaron con los stocks virales producidos (7.1.3, 7.1.4, 7.1.5), se prepararon los compuestos isoprenoides (7.1.6) y se cuantificó proteína viral por la técnica de CELL-ELISA (7.3.3).

Para establecer las diferencias nucleotídicas y aminoacídicas que pudieran explicar actividad antiviral diferencial de los isoprenoides contra las cepas DENV-2/NG y DENV-2/16681, en los objetivos dos, tres, cuatro y cinco, se secuenciaron por método de Sanger fragmentos del gen de envoltura de las cepas DENV-2/NG y DENV-2/16881, y se alinearon usando software MEGA X, tal como se describe en el ítem 7.5. Para el cumplimiento del sexto objetivo, se evaluó *in silico* la afinidad de la interacción entre las proteínas estructurales y no estructurales de los virus DENV, CHIKV y ZIKV con los 4 compuestos isoprenoides, por docking molecular (ítem 7.4.1). Finalmente, para el cumplimiento del séptimo objetivo, se evaluó la estabilidad conformacional de la mejor pose de interacción entre el isoprenoide con mayor afinidad de unión con la proteína E de DENV (obtenida por docking molecular), y que demostró *in vitro* actividad virucida contra DENV-2, mediante dinámica molecular, de acuerdo con la metodología descrita en el ítem 7.4.2

## 7.1 Metodología *in vitro*

**7.1.1 Mantenimiento de células.** Las células VERO (*Cercopithecus aethiops*) se adquirieron de American Type Culture Collection (ATCC® CRL-1587™). Por otro lado, las células U937 (monocitos humanos derivados de linfoma) y las células C6 / 36 (derivadas de larvas de *Aedes albopictus*) fueron donadas por el Doctor Jaime Castellanos en la Universidad de El Bosque (Bogotá, Colombia). Las células A549 (células epiteliales derivadas de adenocarcinoma alveolar humano) fueron donadas por el Doctor Sergio Orduz en la Universidad Nacional de Colombia (Medellín, Colombia).

Las líneas celulares VERO, U937 y A549 se cultivaron en Dulbecco Modified Eagles Minimal – DMEM (GIBCO), con alto contenido de glucosa, L-Glutamina, tamponado con 3,7 g/L de Bicarbonato de Sodio (NaHCO<sub>3</sub>) (Sigma- Aldrich) y suplementado con 0,25 µg/mL de Anfotericina B ( GIBCO), 100 µg/mL de Estreptomina (GIBCO), 100 U/mL de Penicilina (GIBCO) y 2 % de suero bovino fetal (SBF)

(GIBCO). Las condiciones de incubación fueron 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub> y humedad relativa. Las líneas celulares VERO, U937 y A549 se utilizaron para los ensayos de citotoxicidad y antivirales. Además, las células VERO se usaron para la producción de stocks virales de CHIKV/ACol.

Las células C6 / 36 se mantuvieron en medio L-15 (Leibovitz), suplementado HEPES (GIBCO) y SBF al 5 %, y se incubaron a 28°C. Esta línea celular fue usada para la producción de stocks virales de ZIKV/Col, DENV-2/NG y DENV-2/16681.

**7.1.2 Virus.** Las infecciones se realizaron usando las cepas de referencia de DENV-2/NG y DENV-2/16681, las cuales fueron donadas por el Doctor Jorge Osorio del Department of Pathobiological Sciences, University of Wisconsin (WI, Estados Unidos). Además, se usaron los aislados clínicos CHIKV/ACol (PECET, Universidad de Antioquia) y ZIKV/Col (GRICA, Universidad Cooperativa de Colombia).

**7.1.3 Producción de cepas DENV-2/NG y DENV-2/16681.** La producción de las cepas de DENV-2/NG y DENV-2/16681 se realizó infectando  $4,0 \times 10^6$  células C6 / 36 en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con un inóculo de 1 mL de DENV-2/NG o DENV-2/16681. Se incubaron durante 2 h, a 37°C para luego completar a 5 mL de L15 al 2 % SBF, e incubar nuevamente las células infectadas a 28° C durante 3-4 días hasta evidenciar la formación de sincitios, en el caso de DENV-2/NG, y la formación de células alargadas, en el caso de DENV-2/16681. Pasado el tiempo de incubación, los cultivos infectados se sometieron a 3 ciclos de congelación y descongelación a -80°C, para posteriormente centrifugar el contenido de la botella a 2000 rpm, 4°C, durante 10 minutos. Luego, se recolectó el sobrenadante con 30% de SBF y se almacenó a -80°C. La cuantificación del número de copias genómicas y formación de partículas virales infecciosas se realizó mediante RT-qPCR y ensayo de plaqueo, respectivamente.

**7.1.4 Producción de stocks virales de CHIKV.** La producción de los stocks virales de CHIKV/ACol se realizó infectando  $4,5 \times 10^6$  células VERO en botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> mezclando 650 uL de CHIKV/ACol y completando a 4 mL con DMEM al 2 % SBF. Se incubaron durante 2 h, 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, para luego completar a 15 mL de DMEM al 2 % SBF, e incubar nuevamente las células infectadas a 37° C, 5 % CO<sub>2</sub> hasta evidenciar el efecto citopático (ECP) de CHIKV/ACol (lisis celular y desprendimiento). La recolección de lo sobrenadantes se realizó a los 3-4 días de incubación, centrifugando a 2000 rpm, 4°C, durante 10 minutos. Los sobrenadantes se mezclaron con 30 % de SBF y se almacenaron a -80°C, cuantificando por RT-qPCR y ensayo de plaqueo, el número de copias genómicas y formación de partículas virales infecciosas, respectivamente.

**7.1.5 Producción de stocks virales de ZIKV.** La producción de ZIKV/Col se realizó infectando  $8,0 \times 10^6$  células C6 / 36 en botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> con 1 mL de ZIKV/Col y completando a 3 mL con L15 2 % SBF. Se incubaron durante 2 h, 28°C, para luego completar a 15 mL de L15 al 2 % SBF, e incubar nuevamente las células infectadas a 28°C hasta evidenciar como ECP la formación de sincitios a los 10-12 días de incubación. Los cultivos infectados se sometieron a 3 ciclos de congelación y descongelación a -80°C, para posteriormente recolectar los sobrenadantes centrifugando a 2000 rpm, 4°C, durante 10 minutos. Luego, se mezclaron con 30 % de SBF, para luego ser almacenados a -80°C. La cuantificación del número de copias genómicas y formación de partículas virales infecciosas se realizó mediante RT-qPCR y ensayo de plaqueo, respectivamente.

**7.1.6 Compuestos.** El aislamiento e identificación de los compuestos Alfa-Espinasterol, derivado de *T. cymosa* Jacq., Lupeol, derivado de *C. ambrosioides* L., y Estigmasterol y Friedelina, derivado de *C.*

*odoratissima* Jacq. fue realizado por el Laboratorio de Investigaciones Fitoquímicas y Farmacológicas de la Universidad de Cartagena (LIFFUC) (Cartagena, Colombia). Las estructuras se muestran en la figura 2. Los compuestos derivados de las plantas *T. cymosa* Jacq., *C. ambrosioides* L. y *C. odoratissima* Jacq. están sujetos al Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados No. 130 of 2016 (RGE0176) del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de la República de Colombia.

Los stocks de trabajo del Alfa-Espinasterol se prepararon disolviendo 1 mg del compuesto en 300  $\mu$ L de Dimetilsulfóxido (DMSO), se sometió a sonicación por 4 h y se completó a 1000  $\mu$ L con DMEM sin suero; para una concentración final de 1000  $\mu$ g/mL (2423,1  $\mu$ M). Lupeol se preparó disolviendo 1 mg en 300  $\mu$ L de DMSO y se sometió a sonicación por 4h, para una concentración final de 3333  $\mu$ g/mL (7810,6  $\mu$ M). Por su parte, el Estigmasterol fue disuelto en 400  $\mu$ L de Etanol al 100%, se sometió a sonicación por 4 h y se adicionaron 600  $\mu$ L de DMEM sin suero, para una concentración final de 1000  $\mu$ g/mL (2423,1  $\mu$ M). Finalmente, la Friedelina se disolvió en 500  $\mu$ L de DMSO y 200  $\mu$ L de Etanol, se sometió a sonicación, y se completó con 300  $\mu$ L DMEM sin suero, para una concentración final de 1000  $\mu$ g/mL (2343,4  $\mu$ M).

**7.1.7 Ensayo de citotoxicidad.** Se evaluó la toxicidad de los compuestos isoprenoides Alfa-Espinasterol, Lupeol, Estigmasterol y Friedelina en células VERO, por la técnica de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich)[46]. Para lo anterior, se sembraron  $3,0 \times 10^4$  células/pozo en placas de 96 pozos, las cuales se incubaron a 37°C y 5 % CO<sub>2</sub> durante 24 h. Pasado este tiempo, se realizaron diluciones seriadas de los compuestos usando concentraciones de 7,6 a 242,3  $\mu$ M para Alfa-Espinasterol y Estigmasterol, y concentraciones de 7,3 a 234,33  $\mu$ M para Lupeol y Friedelina, se agregaron sobre la monocapa celular y se incubaron durante 48 h (n= 6). Posteriormente, se realizaron 2 lavados con PBS, se adicionó la solución de MTT (0,5 mg/mL) y se incubó durante 2 h a 37°C, en un cultivo protegido de la luz. Luego, se agregó DMSO (Fisher BioReagent) para disolver los cristales de formazán, y se realizó la lectura de la absorbancia a 450 nm, utilizando el Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific). Adicionalmente, se evaluó la toxicidad de los controles de inhibición Suramina (concentraciones de 16 – 500  $\mu$ M), Heparina (18 -564  $\mu$ M) y Ribavirina (6 -200  $\mu$ M).

Se evaluó además la toxicidad celular en presencia de los compuestos Alfa-Espinasterol (7,6  $\mu$ M), Lupeol (7,3  $\mu$ M), Estigmasterol (7,6  $\mu$ M) y Friedelina (7,3  $\mu$ M) en las líneas celulares U937 y A549, sembrando  $2,0 \times 10^4$  células U937 y  $3,0 \times 10^4$  células A549 por pozo en placas de 96 pozos, y siguiendo el protocolo descrito para las células VERO. Para el análisis estadístico se calculó la normalidad de los datos usando la prueba Shapiro Wilk y las diferencias estadísticamente significativas se identificaron usando una prueba paramétrica t Student (datos con distribución normal) o la prueba no paramétrica U de MannWhitney (datos con distribución no normal), considerando para todos los casos diferencias estadísticamente significativas con un valor p menor a 0.05 (p<0.05).

## 7.2. Estrategias para las evaluaciones antivirales *In vitro*

**7.2.1 Tamizaje antiviral.** Se realizó un screening antiviral durante 48 horas para los compuestos Alfa-Espinasterol, Lupeol, Estigmasterol y Friedelina. Se sembraron  $3,0 \times 10^4$  células VERO/pozo en placas de 96 pozos, se incubaron a 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> y humedad relativa, durante 24 h. Se adicionó sobre la monocapa de células VERO una concentración no citotóxica de los compuestos (7,6  $\mu$ M, para Alfa-Espinasterol y Estigmasterol, y 7,3  $\mu$ M, para Lupeol y Friedelina), y se incubaron durante 24 h. Luego,

se removió el sobrenadante, y se adicionaron mezclas en cantidades iguales de cada virus (MOI: 1) y los compuestos sobre la monocapa, incubándose durante 2 h. Después, se removió el inóculo viral, se agregaron nuevamente los compuestos y se incubaron durante 24 h adicionales. Finalmente, se recolectaron los sobrenadantes de cultivo, se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se procesaron por ensayo de plaqueo ( $n=4$ ). Como control positivo de inhibición se usó Suramina (concentración  $500\ \mu\text{M}$ , respectivamente), compuesto reportado previamente con actividad antiviral contra DENV [201], CHIKV [202] y ZIKV [203, 204]. Los porcentajes de infección se determinaron comparando el número de partículas virales infecciosas presentes en los sobrenadantes de las células tratadas respecto a un control de células infectadas sin tratamiento (control considerado el 100,0 % de infección).

**7.2.2 Estrategia PRE-Tratamiento.** Se evaluó la actividad antiviral de los compuestos isoprenoides en pasos previos a la entrada de los virus a la célula (unión, internalización, fusión y decapsidación)[46, 133]. Para lo anterior, se sembraron  $6,0 \times 10^5$  células VERO,  $6,0 \times 10^5$  células U937 por pozo, y  $8,0 \times 10^5$  células A549 por pozo en placas de 48 pozos, se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  y humedad relativa, durante 24 h. Se adicionaron los compuestos, a una concentración no citotóxica ( $7,6\ \mu\text{M}$ , para Alfa-Espinasterol y Estigmasterol, y  $7,3\ \mu\text{M}$ , para Lupeol y Friedelina), y se incubaron durante 48 h [46]. Luego, se adicionó el inóculo viral (MOI 1) durante 2 h. Después de la incubación, se removió el inóculo viral, se adicionó medio DMEM al 2 % SBF y se incubaron durante 48 h. Los sobrenadantes recolectados se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y se procesaron por ensayo de plaqueo. Se realizaron 4 réplicas por cada condición experimental ( $n=4$ ). Suramina ( $250\ \mu\text{M}$ ) (Sigma- Aldrich) se utilizó como control de inhibición de la infección por CHIKV (líneas celulares VERO y U937) [202] y ZIKV (líneas celulares VERO, U937 y A549) [205] y Heparina ( $17,6\ \mu\text{M}$ ) como control de inhibición de la infección por DENV-2/NG y DENV-2/ 16681 en VERO [206], y de CHIKV en la línea celular A549 [207]. Los porcentajes de infección se determinaron comparando el número de partículas virales infecciosas presentes en los sobrenadantes de las células tratadas respecto a un control de células infectadas sin tratamiento (control considerado el 100,0 % de infección).

**7.2.3 Estrategia TRANS-Tratamiento.** Se evaluó el posible efecto virucida del Alfa- Espinasterol, Lupeol, Estigmasterol y Friedelina. Se sembraron  $6,0 \times 10^5$  células VERO/pozo en placas de 48 pozos, se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  y humedad relativa, durante 24h. Posteriormente, se realizaron mezclas en cantidades iguales de los compuestos (concentración de  $7,6\ \mu\text{M}$ , para Alfa-Espinasterol y Estigmasterol,  $7,3\ \mu\text{M}$  para Lupeol y Friedelina), y de los virus (MOI: 1); y se incubaron durante 1 h a  $4^{\circ}\text{C}$ . Después, se adicionaron las mezclas sobre la monocapa celular, y se incubaron durante 2 h,  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ . Finalmente, se removió el inóculo viral, y adicionó medio DMEM al 2% SBF, se incubó durante 48 horas adicionales [208]. Se recolectaron los sobrenadantes, los cuales fueron almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y se procesaron por ensayo de plaqueo ( $n=4$ ). Se utilizó Suramina (concentración  $250\ \mu\text{M}$ ) como control de inhibición de DENV-2/NG y DENV-2/16681 [206], CHIKV [202] y ZIKV [205]. Los porcentajes de infección se determinaron comparando el número de partículas virales infecciosas presentes en los sobrenadantes de las células tratadas respecto a un control de células infectadas sin tratamiento (control del 100,0 % de infección).

**7.2.4 Estrategia POST-Tratamiento.** Se evaluó la actividad antiviral de los compuestos isoprenoides en pasos posteriores a la entrada de los virus a la célula (Replicación viral, síntesis de proteínas, maduración, ensamblaje, liberación) [46]. Se sembraron  $6,0 \times 10^5$  células VERO,  $6,0 \times 10^5$  células U937 y  $8,0 \times 10^5$  células A549 por pozo en placas de 48 pozos, se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  y humedad relativa, durante 24 h. Luego, se adicionó el inóculo viral (MOI: 1) durante 2 h. Después de la incubación, se removió el inóculo viral, y se adicionaron los compuestos, a concentración de  $7,6\ \mu\text{M}$

para Alfa Espinasterol y Estigmasterol, y de 7,3  $\mu\text{M}$ , para Lupeol y Friedelina. Se incubaron durante 48 h. Luego, se recolectaron los sobrenadantes y monocapa celular, se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y se procesaron por ensayo de plaqueo y RT-qPCR. Se realizaron 4 réplicas por cada condición experimental. Se utilizó Ribavirina (Sigma- Aldrich) como control de inhibición DENV-2 [209], ZIKV [210] y CHIKV en VERO y A549 (concentración 200  $\mu\text{M}$ ) [211], y Suramina (concentración de 250  $\mu\text{M}$ ) se usó como control de inhibición de partículas virales infecciosas de CHIKV en U937 [202]. Los porcentajes de infección se determinaron comparando el número de partículas virales infecciosas presentes en los sobrenadantes de las células tratadas respecto a un control de células infectadas sin tratamiento (control considerado el 100,0 % de infección).

Además, se evaluó el efecto antiviral sobre la replicación y síntesis de proteínas virales de los compuestos isoprenoides que inhibieron la formación de partículas virales infecciosas, mediante la cuantificación del número de copias genómicas presentes en las monocapas tratadas respecto a un control de células infectadas sin tratamiento por RT-qPCR, usando la Ribavirina (200  $\mu\text{M}$ ) como control de inhibición [211]; y Suramina y Ribavirina mediante la cuantificación de proteínas virales por ensayo de CELL-ELISA.

### 7.3. Cuantificación viral

**7.3.1 Cuantificación de partículas virales infecciosas: ensayo de plaqueo.** Se realizó la cuantificación de partículas virales infecciosas por ensayo de plaqueo. Se sembraron  $1,8 \times 10^5$  y  $1,2 \times 10^5$  células VERO/pozo en placas de 24 pozos, para la titulación de los sobrenadantes de cultivos infectados con CHIKV/ACol y ZIKV/Col, respectivamente; y  $6,0 \times 10^4$  células VERO/pozo en placas de 48 pozos, en el caso de DENV-2-NG y DENV-2/16681. Se incubaron durante 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5 %  $\text{CO}_2$ . Luego, se realizaron diluciones seriadas de los sobrenadantes de cada virus, agregando un volumen de inóculo viral de 200  $\mu\text{L}$ , para CHIKV/ACol y ZIKV/Col, y de 100  $\mu\text{L}$ , para DENV-2/NG y DENV-2/16681. Se realizó incubación durante 2 h. Posteriormente, se removió el inóculo viral y se adicionó Carboximetilcelulosa (Sigma-Aldrich) al 1,5 % con DMEM al 2 % SBF. Se incubó durante 3-4 días, en el caso de CHIKV/ACol, 7 días para ZIKV/Col, y 12 días para DENV-2. Luego de la incubación, las placas fueron lavadas con PBS, fijadas con Paraformaldehído (Sigma-Aldrich) al 4 % y teñidas con Cristal Violeta (Sigma-Aldrich). El número de placas formadas se multiplicó por el factor de dilución y se dividió por el volumen de inóculo viral usado [212], y el resultado se expresó en UFP/mL. Cada titulación se realizó por duplicado. Para el análisis estadístico, se determinó la normalidad de los datos usando la prueba Shapiro Wilk. Las diferencias estadísticamente significativas se identificaron usando una prueba paramétrica t Student (datos con distribución normal) o la prueba no paramétrica U de MannWhitney (datos con distribución no normal), considerando para todos los casos diferencias estadísticamente significativas con un valor p menor a 0.05 ( $p < 0.05$ ).

**7.3.2 Cuantificación de copias genómicas: PCR en tiempo Real.** Se obtuvo el RNA viral a partir de monocapa celular, usando el protocolo de Quick RNA viral Kit (ZYMO), y el cDNA, utilizando el kit M-MLV Reverse Transcriptase, de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante (PROMEGA). La cuantificación de copias genómicas virales fue evaluada mediante RT-qPCR usando el kit PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific Amplification). El ciclo térmico usado para CHIKV y ZIKV fue:  $50^{\circ}\text{C}$  durante 2 minutos,  $95^{\circ}\text{C}$  10 minutos, 40 ciclos de  $95^{\circ}\text{C}$  15 segundos y  $60^{\circ}\text{C}$  1 minuto. El ciclo térmico de DENV fue  $95^{\circ}\text{C}$  5 minutos, 35 ciclos ( $95^{\circ}\text{C}$  30 seg,  $55^{\circ}\text{C}$  45 seg,  $72^{\circ}\text{C}$  45 seg), y una extensión final a  $72^{\circ}\text{C}$  10 minutos. Las amplificaciones se realizaron en el Applied Biosystems QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) y el análisis de resultados usando

QuantStudio design & análisis software.

Los primers utilizados fueron 6856F 5' TCACTCCCTGTTGGACTTGATAGA 3' y 6981c 5' TTGACGAACAGAGTTAGGAACATACC 3', que amplifican un fragmento de 125 pb que codifica para NSP4 de CHIKV [213]; 1086F 5'-CCGCTGCCCAACACAAG-3' y 1162c 5'-CCACTAAYGTTCTTTTGCAGACAT-3'; los cuales amplifican un fragmento de 77 pb de la proteína E de ZIKV [214]; y los primers 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', que amplifican un fragmento de 119 pb de la región C-prM de DENV-2 [215]. Para la cuantificación absoluta, se construyeron plásmidos recombinantes de los virus CHIKV y ZIKV utilizando el kit CloneJET PCR Cloning (Anexo 1), y en el caso de DENV-2 se usaron plásmidos obtenidos previamente [215]. Se construyeron las curvas estándar para cada virus, realizando diluciones seriadas desde  $10^2$  hasta  $10^8$ . Los coeficientes de correlación de las curvas fueron 0,987 para el plásmido con el fragmento de CHIKV; 0,996 para ZIKV, y 0.993, para DENV-2.

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos de la cuantificación del número de copias genómicas de cada virus, se determinó la normalidad de los datos se determinó usando la prueba Shapiro Wilk. Las diferencias estadísticamente significativas se identificaron usando una prueba paramétrica t Student (datos con distribución normal) o la prueba no paramétrica U de MannWhitney (datos con distribución no normal), considerando para todos los casos diferencias estadísticamente significativas con un valor p menor a 0.05 ( $p < 0.05$ ).

**7.3.3 Cuantificación de proteína viral: CELL-ELISA.** La proteína viral se cuantificó mediante un ensayo de ELISA espectrofotométrico de células, de la manera previamente descrita [208]. Se sembraron  $3 \times 10^4$  células VERO y A549 en placas de 96 pozos, se incubaron durante 24 h,  $37^\circ\text{C}$  y 5 %  $\text{CO}_2$ . Luego, se sometieron a tratamiento con Lupeol ( $7,4 \mu\text{M}$ ) posterior a la infección de CHIKV/ACol (MOI 1) durante 24 h. Posteriormente, se lavaron con PBS, se fijaron con Paraformaldehído (Sigma-Aldrich) al 4 % de durante 30 minutos, a temperatura ambiente y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1 % durante 30 minutos adicionales. La peroxidasa endógena se extinguió con 0,3 % de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en metanol al 10 % en PBS, y los sitios no específicos se saturaron con tampón de bloqueo (SBF al 10% en PBS) [216]. El anticuerpo primario anti-E de CHIKV de ratón (Thermo Fisher Scientific) dirigido a proteína E de CHIKV se diluyó en el tampón de bloqueo (SBF al 5 %) y se incubaron durante 12 h a  $4^\circ\text{C}$ . Luego, se removieron y se lavaron con PBS para incubar las células con IgG anti-ratón acoplado a peroxidasa durante 60 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la reacción se reveló utilizando 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina -TMB (Invitrogen). La lectura de la absorbancia se realizó a 450 nm en un lector Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific). Para la normalización de los datos, la concentración de proteína en cada pozo fue determinada utilizando un ensayo de Bradford. Se realizaron dos experimentos independientes, con 3 repeticiones para cada ensayo ( $n = 6$ ). El análisis estadístico de los resultados obtenidos incluyó la determinación de la normalidad usando la prueba Shapiro Wilk. Las diferencias estadísticamente significativas se identificaron usando una prueba paramétrica t Student (datos con distribución normal) o la prueba no paramétrica U de MannWhitney (datos con distribución no normal), considerando para todos los casos diferencias estadísticamente significativas con un valor p menor a 0.05 ( $p < 0.05$ ).

## 7.4. Estrategias para las evaluaciones *in silico*

**7.4.1 Evaluación de la afinidad de los isoprenoides con proteínas virales mediante docking molecular.** Se evaluó la interacción del Alfa- Espinasterol, Lupeol, Estigmasterol y Friedelina con una

proteína estructural y una no estructural de DENV, CHIKV y ZIKV, mediante docking molecular. Para lo anterior, se realizó la búsqueda de las estructuras cristalográficas de las proteínas virales (resolución inferior a 2,5 Å) en Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org/>), seleccionando para el caso de las proteínas estructurales el dominio III de la proteína E de DENV-2 (PDB: 3UZV) [217], la proteína E2 de CHIKV (PDB: 3N44) [218] y el dominio II de la proteína E de ZIKV (PDB: 5JHM) [219]. Para las proteínas no estructurales, se seleccionó el dominio polimerasa de NS5 de DENV-3 (PDB: 2J7U) [220], el dominio proteasa de NSP2 de CHIKV (PDB: 3TRK) [221] y NS5 de ZIKV (PDB: 5U04) [222]. El acondicionamiento de las proteínas blanco (eliminación de moléculas de agua, la adición de Hidrógenos polares y la adición de cargas de Gasteiger) se realizó usando el software Python Molecular Viewer (PMV).

Por otra parte, se utilizó PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) para la búsqueda de las estructuras químicas de los compuestos Alfa-Espinasterol (Compound identifier CID: 5281331), Lupeol (CID: 259846), Estigmasterol (CID: 5280794) y Friedelina (CID: 91472). Luego, se le otorgó flexibilidad al ligando usando PMV. Posteriormente, se definió el sitio de interacción de la proteína blanco utilizando el servidor PeptiMap (<https://peptimap.cluspro.org/>) (tablas 1 y 2) y se corrió el docking molecular usando el software AutoDock Vina (<http://autodock.scripps.edu/>). Las energías libres ( $\Delta G$ ) entre cero (0) y -16 Kcal/mol correspondieron a los puntajes de las poses interacción, siendo los mejores puntajes aquellos cercanos a -16 Kcal/mol. Para el análisis de resultados, se usaron los softwares PyMOL (<https://pymol.org/2/>), AutoDock tools y LigPlot (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LIGPLOT/>). Los resultados se registraron en cuanto al puntaje de las energías de unión, y los enlaces intermoleculares (puentes de Hidrógeno e interacciones hidrofóbicas) que participaron en el acoplamiento (tablas 1 y 2). Como controles de la interacción se utilizó Suramina y Ribavirina con las proteínas de DENV [16, 223], CHIKV [224] y ZIKV [205] [210].

**7.4.2 Evaluación de la estabilidad conformacional por dinámica molecular.** Se evaluó la estabilidad conformacional del mejor complejo de interacción de la proteína E de DENV y Lupeol obtenido mediante docking molecular, durante 6,5 nanosegundos (ns) solvatando en una caja de agua y usando el software NAMD (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>). Se tuvieron en cuenta las siguientes características dentro del sistema: Minimización del complejo, establecimiento de condiciones de borde de caja, y un ensamble NVT (Número constante de partículas, Volumen y Temperatura constante = 310K). El sistema cuenta con aproximadamente 30.000 moléculas. El análisis incluyó evaluación de las trayectorias resultantes y gráfica de distancias entre los Carbonos Alfa del sistema (Å), durante el tiempo evaluado.

## 7.5 Secuenciación de cepas DENV-2/NG y DENV-2/16681

Debido a que se identificaron diferencias en la actividad antiviral de los isoprenoides entre las cepas DENV-2/NG y DENV-2/16681, se amplificaron los fragmentos del gen de la envoltura de ambas cepas, usando primers previamente reportados [225] y el kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific). El perfil térmico utilizado fue 53°C 30 min, 94°C 2 min, 40 ciclos (94°C 30 seg, 50°C 45 seg, 68°C 2 min) y 68°C 5 min. Los amplicones se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %, los cuales se sometieron a purificación y secuenciación a MacroGen Inc. (Korea) por método de Sanger. Los datos de las secuencias fueron ensamblados y editados usando el software MEGA X y la identificación de las cepas DENV-2/NG y DENV-2/16681 se realizó usando Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para explorar la similitud con secuencias de referencia de

cada cepa de DENV-2 disponibles en la base de datos de nucleótidos de NCBI. Se alinearon 1308 nucleótidos usando el software MEGA X, por el método de Clustal W, los cuales se tradujeron en 435 aminoácidos y se analizaron las diferencias entre ambas cepas comparando con secuencias de referencia.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Resultados de Citotoxicidad en VERO, U937 y A549

Al evaluar la viabilidad de células VERO en presencia de los cuatro compuestos isoprenoides (Alfa-Espinasterol, Estigmasterol, Lupeol y Friedelina) (7,6 a 242,3  $\mu\text{M}$ ) durante 48 h, se obtuvieron porcentajes de viabilidad superiores al 70,0 %, a concentraciones menores o iguales a 121,2  $\mu\text{M}$  y 117,2  $\mu\text{M}$  del Alfa-Espinasterol y Lupeol, respectivamente; y a concentraciones menores o iguales a 242,3  $\mu\text{M}$  de Estigmasterol y de 29,3  $\mu\text{M}$  de Friedelina (figura 3). La viabilidad de los cuatro isoprenoides fue dependiente de concentración (Figura 3). Se identificaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de viabilidad de células VERO en presencia de todas las concentraciones evaluadas del Alfa-Espinasterol, y a concentraciones mayores o iguales a 14,6  $\mu\text{M}$  del Lupeol, 60,6  $\mu\text{M}$  de Estigmasterol y 58,6  $\mu\text{M}$  de Friedelina, respecto al control de células VERO sin compuesto. La viabilidad de células VERO fue superior al 84,0 % en presencia de los controles de inhibición Suramina, Heparina y Ribavirina, a todas las concentraciones evaluadas (6,0-564  $\mu\text{M}$ ). No se identificaron diferencias estadísticamente significativas a las concentraciones evaluadas de Suramina (15,6 – 500  $\mu\text{M}$ ) y Ribavirina (6,3 – 200  $\mu\text{M}$ ), con relación al control de células VERO sin compuesto. Por su parte, se presentaron diferencias estadísticamente significativas a concentraciones superiores o iguales de 35,2  $\mu\text{M}$  de Heparina (Datos no mostrados).

Además, se obtuvieron porcentajes de viabilidad de las células U937 y A549 superiores o iguales al 76,0 % en presencia de los cuatro compuestos isoprenoides (durante 48 horas) a concentración de 7,3  $\mu\text{M}$  para Lupeol y Friedelina, y de 7,6  $\mu\text{M}$  para Alfa-Espinasterol y Estigmasterol (tabla 2). Se identificaron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de viabilidad de U937 y A549 en presencia de todos los isoprenoides respecto al control de células sin compuesto. Por otro lado, la viabilidad de células U937 y A549 fue superior al 87,0 % en presencia de los controles Suramina (250  $\mu\text{M}$ ), Ribavirina (200  $\mu\text{M}$ ), y Heparina (20  $\mu\text{M}$ ) (tabla 2).

### 8.2. Resultados de las evaluaciones *In Vitro*

**8.2.1. Resultados de la estrategia de tamizaje antiviral.** Al evaluar el efecto antiviral de los cuatro isoprenoides mediante un tamizaje antiviral durante 48 h en células VERO, se identificó el potencial antiviral del Alfa-Espinasterol contra DENV-2/NG (porcentajes de infección del 40,9 %), con diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ , t Student), respecto al sobrenadante de células infectadas sin tratamiento (figura 4). Además, se obtuvieron porcentajes de infección del número de partículas virales infecciosas de DENV-2/16681, CHIKV/ACol y ZIKV/Col del 104,6 %, 85,2 % y 90,3 %, respectivamente, mediante el tratamiento con Alfa-Espinasterol. El Lupeol provocó porcentaje de infección del número de partículas virales infecciosas del 121,1 %, 133,2 %, 99,4 % y 107,4 % para DENV-2/NG, DENV-2/16681, CHIKV/ACol y ZIKV/Col, respectivamente, con relación al control de sobrenadante de células infectadas sin tratamiento. Además, mediante el tratamiento con Estigmasterol se obtuvieron porcentajes de infección del 83,5 % y 92,9 % para DENV-2/NG y DENV-

2/16681, respectivamente, y del 181,6 % y 85,6 % para CHIKV/ACol y ZIKV/Col, respectivamente. El tamizaje antiviral con Friedelina provocó un 162,8 %, 92,9 %, 99,9 % y 111,0 % de infección de DENV-2/NG, DENV-2/16681, CHIKV/ACol y ZIKV/Col, respectivamente, respecto al control de sobrenadantes de células infectadas sin tratamiento (figura 4).

El tratamiento con Suramina (control positivo) provocó porcentajes de infección del número de partículas virales infecciosas del 13,3 %, 10,3 %, 0,0 % y 0,0 %, para DENV-2/NG, DENV-2/16681, CHIKV/ACol y ZIKV/Col, respectivamente, con diferencias estadísticamente significativas, respecto al sobrenadante de células infectadas sin tratamiento ( $p < 0,05$ , t Student) (Figura 4).

**8.2.2. Resultados de la estrategia PRE- tratamiento.** Al evaluar el potencial antiviral del Alfa-Espinasterol mediante la estrategia de PRE- tratamiento en células VERO, se obtuvieron porcentajes de infección del número de partículas virales infecciosas del 108,1 %, 146,6 % y 63,5 % para DENV-2/NG, DENV-2/16681 y CHIKV/ACol, respectivamente, y se demostró el potencial antiviral de este compuesto contra ZIKV/Col (porcentaje de infección del 44,8 %,  $p < 0,05$ , t Student), respecto al control de sobrenadantes de células infectadas sin tratamiento (figura 5). Para Lupeol, se obtuvieron porcentajes de infección del 87,2 % y 225,2 % para DENV-2/NG y DENV-2/16681, respectivamente, y se identificó el potencial antiviral de este compuesto contra CHIKV/ACol y ZIKV/Col (porcentajes de infección del 32,7 % y 30,7 %, respectivamente, respecto al control de sobrenadantes de células VERO infectadas sin tratamiento,  $p < 0,05$ , t Student). Mediante el tratamiento con Estigmasterol, se obtuvieron porcentajes de infección del número de partículas virales infecciosas del 145,4 % y 121,7 % para DENV-2/NG y DENV-2/16681, respectivamente, y se identificó el efecto antiviral contra CHIKV/ACol y ZIKV/Col (porcentajes de infección del 12,8 % y 39,3 % para CHIKV/ACol y ZIKV/Col, respectivamente, con relación al control de sobrenadantes de células infectadas sin tratamiento,  $p < 0,05$ , t Student). Se obtuvieron porcentajes de infección del 97,3 %, 94,4 %, 101,0 % y 141,8 %, para DENV-2/NG, DENV-2/16681, CHIKV/ACol y ZIKV/Col, respectivamente, mediante el tratamiento con Friedelina (figura 5). La Heparina (control positivo) provocó un efecto antiviral contra DENV-2/NG y DENV-2/16681 (porcentajes de infección del 41,2 % y 69,6 %, respectivamente,  $p < 0,05$ , t Student), respecto al control de sobrenadantes de células VERO infectadas sin tratamiento (figura 5). Para la Suramina (control positivo) se obtuvieron porcentajes de infección del número de partículas virales infecciosas de CHIKV/ACol y ZIKV/Col del 19,4 % y 6,1 %, respectivamente ( $p < 0,05$ , t Student) (figura 5).

Dado el efecto antiviral del Lupeol y Estigmasterol en la formación de partículas virales infecciosas de CHIKV/ACol, y del Alfa-Espinasterol, Lupeol y Estigmasterol contra ZIKV/Col en células VERO, se evaluó el potencial antiviral de estos isoprenoides contra ambos virus, en las líneas celulares humanas U937 y A549, demostrando el potencial antiviral del Lupeol y Estigmasterol contra CHIKV/ACol en la línea celular U937 (Porcentajes de infección del 52,9 % y 44,2 %, respectivamente,  $p < 0,05$ , t Student). Por otra parte, se evidenció un aumento en los porcentajes de infección de partículas virales infecciosas de CHIKV/ACol obtenidos mediante la estrategia de PRE- tratamiento en células A549 (porcentajes de infección del 357,4 % y 2351,9 %, para Lupeol y Estigmasterol, respectivamente) con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , t Student) respecto al control de sobrenadantes de células infectadas sin tratamiento (figura 6 A). La Suramina (control positivo) provocó un porcentaje de infección del número de partículas virales infecciosas del 29,0 % ( $p < 0,05$ , t Student) para CHIKV/ACol en la línea celular U937, y Heparina provocó un porcentaje de infección de CHIKV/ACol del 6,9 % en las células A549, con diferencias estadísticamente significativas respecto al control de sobrenadante de células infectadas sin tratamiento ( $p < 0,05$ , t Student) (figura 6 A).

Para el caso de ZIKV/Col, se identificó el potencial antiviral del Alfa-Espinasterol y Estigmasterol contra ZIKV/Col en la línea celular U937, obteniendo porcentajes de infección del número de partícula viral infecciosa de ZIKV/Col del 42,9 % y 50,9 % para el tratamiento con Alfa-Espinasterol y Estigmasterol, respectivamente, con diferencia estadísticamente significativa respecto al control de sobrenadante de células U937 infectadas sin tratamiento ( $p < 0.05$ , t Student); mientras que para Lupeol se obtuvo un porcentaje de infección de ZIKV/Col del 75,4 % en esta línea celular (figura 6 B). En las células A549, se obtuvieron porcentajes de infección de ZIKV/Col del 88,6 % para Alfa-Espinasterol, 117,3 % para Lupeol y 138,9 % para Estigmasterol, respecto al control de sobrenadantes de células A549 infectadas sin tratamiento (figura 6 B). Suramina (control positivo) provocó porcentajes de infección de ZIKV/Col del 0,0 % para las líneas células U937 y A549, con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ , t Student), respecto al control de sobrenadante de las células infectadas sin tratamiento (figura 6 B).

**8.2.3. Resultados de la estrategia TRANS-tratamiento.** Al evaluar el posible efecto virucida de los cuatro isoprenoides contra CHIKV/ACol en la línea celular VERO, mediante la estrategia de TRANS-tratamiento, se identificó el potencial antiviral del Alfa-Espinasterol contra DENV-2/NG y DENV-2/16681 (porcentajes de infección del 65,6 % para DENV-2/NG y 44,1 % para DENV-2/16681,  $p < 0.05$ , t Student). Además, mediante el tratamiento con Alfa-Espinasterol se obtuvieron porcentajes de infección del 96,2 % para CHIKV/ACol y del 116,9 % para ZIKV/Col, con relación al control de sobrenadante de células infectadas sin tratamiento. Lupeol provocó un efecto antiviral contra DENV-2/NG, DENV-2/16681 y CHIKV/ACol (porcentajes de infección del 43,0 %, 54,2 % y 11,7 %, respectivamente,  $p < 0.05$ , t Student), respecto al control de sobrenadantes de células VERO infectadas sin tratamiento; y este compuesto provocó un porcentaje de infección del número de partículas virales infecciosas de ZIKV/Col del 101,4 %, con relación al control de sobrenadante de células infectadas sin tratamiento (figura 7).

Mediante el TRANS-tratamiento con Estigmasterol, se identificó el potencial antiviral de este isoprenoide contra DENV-2/16681 (porcentaje de infección del 50,2 %,  $p < 0.05$ , t Student); pero no contra DENV-2/NG, CHIKV/ACol y ZIKV/Col (porcentajes de infección del 68,4 %, 93,7 % y 78,7 %, respectivamente), respecto al control de infección sin tratamiento. Se identificó el potencial antiviral de Friedelina contra DENV-2/NG y CHIKV/ACol (porcentajes de infección del 62,4 % y 15,7 %, respectivamente,  $p < 0.05$ , t Student) pero no contra DENV-2/16681 y ZIKV/Col (porcentajes de infección del 111,1 % y 285,6 %, respectivamente), respecto al control de sobrenadantes de células VERO infectadas sin tratamiento (figura 7). Suramina (control positivo) provocó porcentajes de infección del número de partículas virales infecciosas del 34,6 %, 52,5 %, 10,7 % y 2,4 % para DENV-2/NG, DENV-2/16681, CHIKV/ACol y ZIKV/Col, respectivamente, con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , t Student) respecto al control de sobrenadantes de células infectadas sin tratamiento (figura 7).

**8.2.4. Resultados de la estrategia POST-tratamiento.** Al evaluar la actividad antiviral de los cuatro isoprenoides contra infección por DENV-2/NG, DENV-2/16681, CHIKV/ACol y ZIKV/Col, mediante la estrategia de POST-tratamiento en la línea celular VERO, ninguno de los compuestos isoprenoides demostró potencial antiviral contra DENV-2/NG, DENV-2/16681 y ZIKV/Col (figura 8). Mediante el tratamiento con Alfa-Espinasterol, se obtuvieron porcentajes de infección del número de partículas virales infecciosas de DENV-2/NG del 110,9 %, para DENV-2/16681 del 254,0 % ( $p < 0.05$ , t Student), y para CHIKV/ACol y ZIKV/Col del 38,2 % y 82,3 %, respectivamente, respecto al control de sobrenadante de células VERO infectadas sin tratamiento. Para el Lupeol, los porcentajes de infección

fueron del 110,2 % para DENV-2/NG, del 237,0 % para DENV-2/16681 ( $p < 0,05$ , t Student) y del 141,5 % para ZIKV/Col, mientras que para CHIKV/ACol, se identificó el potencial antiviral del Lupeol (porcentaje de infección del 0,8 %), con diferencias estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ , t Student) respecto al control de células VERO infectadas sin tratamiento (figura 8). Se obtuvieron porcentajes de infección del número de partículas virales infecciosas del 82,7 % para DENV-2/NG, del 226,9 % para DENV-2/16681 ( $p < 0,05$ , t Student), del 118,4 % para CHIKV/ACol y del 86,3 %, mediante el tratamiento con Estigmasterol. Para el caso de Friedelina, se obtuvieron porcentajes de infección del número de partículas virales infecciosas del 312,7 % y 168,4 % para DENV-2/NG y DENV-2/16681, respectivamente, con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , t Student), respecto al control de sobrenadantes de células infectadas sin tratamiento, y para CHIKV/ACol y ZIKV/Col, se obtuvieron porcentajes de infección del 93,5 % y 108,0 %, respectivamente, mediante el tratamiento con este isoprenoide (figura 8). Ribavirina (control positivo) provocó porcentajes de infección del número de partículas virales infecciosas de DENV-2/NG, DENV-2/16681, CHIKV/ACol y ZIKV/Col del 35,7 %, 20,8 %, 2,0 % y 0,0 %, respectivamente, con diferencias estadísticamente significativas respecto al control de células VERO infectadas sin tratamiento ( $p < 0,05$ , t Student) (figura 8).

Debido a que se identificó el potencial antiviral del Lupeol para disminuir el número de partículas virales infecciosas de CHIKV/ACol en células VERO (porcentaje de infección del 0,8 %,  $p < 0,05$ , t Student), se evaluó la actividad antiviral de este isoprenoide mediante la estrategia de POST-tratamiento en las líneas celulares U937 y A549. Se obtuvo un porcentaje de infección del número de partículas virales infecciosas de CHIKV/ACol en U937 del 81,0 %, respecto al control de sobrenadantes de células U937 infectadas sin tratamiento. En la línea celular A549, se identificó el potencial antiviral del Lupeol contra CHIKV/ACol (porcentaje de infección del 37,1 %,  $p < 0,05$ , t Student) con relación al control de sobrenadantes de células infectadas sin tratamiento (figura 9). Ribavirina (control positivo) provocó un efecto antiviral contra CHIKV/ACol en la línea celular A549 (porcentaje de infección del número de partículas virales infecciosas del 3,2 %,  $p < 0,05$ , t Student); mientras que para el tratamiento con Suramina (control positivo), se obtuvieron porcentajes de infección del 0,0 % para CHIKV/ACol en la línea celular U937, con diferencias estadísticamente significativas para ambos controles positivos ( $p < 0,05$ , t Student) respecto al control de sobrenadantes de células infectadas sin tratamiento (figura 9).

**8.2.5. Resultados de la cuantificación del RNA viral en monocapas tratadas con Lupeol.** Dado que en las líneas celulares VERO y A549 el Lupeol provocó una disminución del número de partículas virales infecciosas de CHIKV/ACol, mediante la estrategia de POST-tratamiento, se cuantificó el RNA de CHIKV/ACol presente en las monocapas de VERO y A549 tratadas con Lupeol durante 48 h, evidenciando acumulación intracelular del RNA viral (175,4 % de infección), en la línea celular VERO, y una disminución del número de copias genómicas de CHIKV/ACol en la línea celular A549 (porcentaje de infección del 41,8 %), con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , t Student) respecto a monocapas infectadas con CHIKV/ACol sin tratamiento. La Ribavirina (control positivo) provocó una disminución del número de copias genómicas de CHIKV/ACol en las líneas celulares VERO y A549 (Porcentajes de infección del 2,0 % y 48,2 %, respectivamente,  $p < 0,05$ , t Student), con diferencias estadísticamente significativas respecto al control de células infectadas sin tratamiento (figura 10).

**8.2.6. Resultados de la cuantificación de proteína viral en monocapas tratadas con Lupeol.** Se evaluó si el mecanismo antiviral del Lupeol fue la inhibición de la síntesis de proteínas virales mediante el ensayo de CELL-ELISA en VERO y A549, identificando que Lupeol no afectó la síntesis de proteína

E de CHIKV en las líneas celulares VERO y A549 (porcentajes de infección del 110,6 % y 81,7 %, respectivamente, respecto a la cuantificación obtenida en células infectadas con CHIKV que no recibieron tratamiento con Lupeol). Suramina (control positivo) demostró potencial antiviral sobre la síntesis de proteína E de CHIKV en células VERO y A549 (porcentajes de infección del 20,3 % y 26,9 %, respectivamente,  $p < 0.05$ , t Student) y, para la Ribavirina (control positivo) se obtuvieron porcentajes de infección del 24,0 % en VERO y del 30,8 % en A549 con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ , t Student), respecto al control de células infectadas sin tratamiento (figura 11).

### 8.3. Resultados de las evaluaciones *in silico*

**8.3.1 Interacción por docking molecular entre los isoprenoides y las proteínas estructurales de DENV, CHIKV y ZIKV.** La interacción de la proteína E de DENV (PDB: 3UZV) arrojó energías libres de unión de -5.9 Kcal/mol para Alfa-Espinasterol, mediante la formación de interacciones hidrofóbicas con los residuos Met301, Ile335, Pro336, Phe337, Glu338, Ile379, Val382 y Gln386 de la proteína viral. Lupeol interactuó con una afinidad de unión de -6.8 Kcal/mol, formando interacciones hidrofóbicas con los residuos Met301, Lys334, Ile335, Pro336, Phe337, Glu338, Leu351 y Ile379 presentes en el bolsillo de la proteína E de DENV elegido para evaluar la interacción. La energía libre de unión obtenida entre E de DENV y Estigmasterol fue de -6.0 Kcal/mol mediante la formación de dos puentes de Hidrógeno con Gln386 (distancias de 2.96 y 3.07 Å) e interacciones hidrofóbicas con Met301, Pro336, Phe337, Glu338, Met340, Leu351, Val354, Ile379, Gly381, Val382, Gln386. Finalmente, Friedelina interactuó con E de DENV con una afinidad de unión de -6.7 Kcal/mol y formó interacciones hidrofóbicas con Ile379, Glu338, Met340, Pro336, Phe337, Met301, Leu351 de la proteína viral (tabla 1 y figura 12).

La mejor conformación de acoplamiento de la proteína E2 de CHIKV (PDB: 3N44) con Alfa-Espinasterol, Lupeol, Estigmasterol y Friedelina generó energías de unión de -6.8, -8.0, -6.6 y -8.2 Kcal/mol, respectivamente, mediante interacciones hidrofóbicas. Alfa-Espinasterol formó interacciones hidrofóbicas con los residuos Arg13, Tyr15, Leu16, His29, Asn 72, Pro172, Pro173, Thr175, Pro176, Asp177, Arg178 y Gln236, Lupeol interactuó con los residuos Arg13, Leu16, His29, Asn72, His73, Pro173, Thr175, Pro176, Val242 y Pro243, Estigmasterol interactuó con los residuos Leu16, His29, Asn72, His73, Thr175, Pro176, Gln236 y Val242; mientras que, Friedelina interactuó con los residuos Arg13, Tyr15, Leu16, His29, Pro173, Thr175, Pro176, Gln236, Val242 y Pro243 de la proteína E de CHIKV (figura 13).

Adicionalmente, para la interacción de la proteína E de ZIKV (PDB: 5JHM) con los compuestos isoprenoides se obtuvieron energías de unión de -5.3 Kcal/mol para Alfa – Espinasterol, -5.6 Kcal/mol para Lupeol, -6.1 Kcal/mol para Estigmasterol y de -6.5 Kcal/mol para Friedelina (tabla 1). Alfa-Espinasterol interactuó con los residuos Ile4, Lys316, Ile317, Ala319, Thr327 y Met375 (figura 14). Lupeol (-5.6 Kcal/mol) formó un puente de Hidrógeno con el residuo Ile1 de la proteína E de ZIKV (distancia 3.11 Å) e interacciones hidrofóbicas con Ile4, Gly5, Lys316 y Ala319 (figura 14). Estigmasterol formó interacciones hidrofóbicas con los residuos Ile1, Val143, Gly145, Ser146, Asn163, Phe183, Ly301, Val364, Thr366, Lys373, Met374, Met375 y no formó puentes de Hidrógeno con la proteína E de ZIKV (figura 14), y Friedelina formó interacciones hidrofóbicas con los residuos Ile1, Cys3, Ile4, Gly5, Val6, Lys316, Ala319, Thr327 y Met375 (figura 14).

Se obtuvieron energías libres de unión favorables entre el complejo de Suramina con las proteínas E de CHIKV (-8.0 Kcal/mol), ZIKV (-8.8 Kcal/mol) y DENV (-7.8 Kcal/mol), con presencia de uno o más puentes de Hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (tabla 1 y figuras 12,13 y 14).

**8.3.2 Interacción por docking molecular entre los isoprenoides y las proteínas no estructurales de DENV, CHIKV y ZIKV.** Las energías libres de unión para la NS5 de DENV (PDB: 2J7U) y los isoprenoides fueron del -7.9 y -8.5 kcal/mol, para Alfa-Espinasterol y Lupeol, respectivamente (tabla 2). Alfa-Espinasterol formó tres puentes de Hidrógeno, uno con el residuo Ser661 (distancia de 3.04 Å), y dos con el residuo Asp663 (distancias de 3.27 y 2.86 Å) e interacciones hidrofóbicas con residuos Trp477, Arg481, Gly601, Gln602, Val603, Thr605, Tyr606, Asn609, Ser661, Gly662, Asp663 e Ile797 (figura 15). Lupeol formó un puente de Hidrógeno con Thr794 (distancia 3.22 Å) e interacciones hidrofóbicas con los residuos Thr605, Tyr606, Asn609, Ser661, Asp663, Gly662, Ser710, Ser796, Ile797 (figura 15). Por otro lado, la energía de unión de NS5 de DENV (PDB: 2J7U) con Estigmasterol y Friedelina fue de -8.1 y -9.6 Kcal/ mol, respectivamente (tabla 2). Estigmasterol formó tres puentes de Hidrógeno con los residuos Gly601, Arg481 y Trp477 (distancias de 2.91, 2.80 y 2.77 Å, respectivamente), e interacciones hidrofóbicas con residuos Phe354, Val358, Trp477, Arg481, Gly536, Thr539, Val577, Arg598, Gly599, Ser600 y Gly601; mientras que, Friedelina formó interacciones hidrofóbicas con los residuos Lys401, Val402, Asn 405, Ala421, Trp474, Trp477, Leu478, Phe485, Asn492 y Val603 (figura 15).

Para la proteína NSP2 de CHIKV (PDB: 3TRK) se obtuvieron energías libres de unión del -7.1, -7.2, -7.4 y -7.8 Kcal/mol con Alfa-Espinasterol, Lupeol, Estigmasterol y Friedelina, respectivamente (tabla 2). Alfa-Espinasterol formó interacciones hidrofóbicas con los residuos Ser1048, Glu1050, Val 1051, Val1077, Tyr1079, Trp1084, Gly1089, Gly1090, Gln1241, Thr1268, Arg1271 y Val1275 de NSP2 de CHIKV (figura 16). Lupeol formó interacciones hidrofóbicas con Ser1048, Tyr1078, Tyr1079, Trp1084, Gly1089, Gly1090, Lys1091, Gln1241 y Met1242 de NSP2 de CHIKV. Estigmasterol formó un puente de Hidrógeno con el residuo Tyr1079 (distancia 3.21 Å) e interacciones hidrofóbicas con residuos Ser1048, Glu1050, Val1077, Tyr1078, Tyr1079, Trp1084, Gly1089, Gly1090, Lys 1091, Gln1241 y Met1242 de NSP2 de CHIKV (figura 16). Friedelina formó interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos Ser1048, Val1077, Tyr1079, Trp1084, Gly1089, Gly1090, Lys1091 y Met1242 y no formó puentes de Hidrógeno con NSP2 de CHIKV (tabla 2 y figura 16).

Finalmente, la proteína NS5 de ZIKV (PDB: 5U04) interactuó con energías libre de unión favorables con Alfa-Espinasterol (-6.4 Kcal/mol), Lupeol (-8.1 kcal/mol), Estigmasterol (-6.6 Kcal/mol) y Friedelina (-8.0 Kcal/mol) (tabla 2). Alfa-Espinasterol formó interacciones hidrofóbicas con los residuos Val606, Thr608, Asn612, Tyr609, Trp797 e Ile799. Lupeol interactuó con esta proteína mediante la formación de tres puentes de Hidrógeno con los residuos Asp665, Asp666 y Ser663 (distancias de 2.80, 2.78 y 2.78 Å, respectivamente) e interacciones hidrofóbicas con residuos Val606, Asn612, Ser663, Gly664, Asp665, Asp666, Trp797 e Ile799 de NS5 (figura 17). Estigmasterol interactuó con NS5 de ZIKV mediante la formación de dos puentes de Hidrógeno con los residuos Asp666 y Asp665 (distancia 3.18 y 3.22 Å, respectivamente) e interacciones hidrofóbicas con los residuos Val606, Tyr609, Gly664, Asp665, Trp797 e Ile799. Friedelina formó interacciones hidrofóbicas con los residuos Ile543, Glu551, Thr573, Tyr574, Ans576, Thr608 y Asn612 (figura 17).

Las energías libres de unión de la Ribavirina (control positivo) fueron de -6.0, -6.1 y -5.9 Kcal/mol con las proteínas NSP2 de CHIKV (PDB: 3TRK), NS5 de DENV (PDB: 2J7U) y NS5 de ZIKV (PDB: 5U04), respectivamente. La formación de enlaces intermoleculares tipo puentes de Hidrógeno e interacciones hidrofóbicas se encuentran en la tabla 2 y figuras 15, 16 y 17.

**8.3.3. Resultados obtenidos de la simulación por dinámica molecular.** Las simulaciones por

dinámica molecular fueron usadas para evaluar la estabilidad en el tiempo de uno de los isoprenoides con mayor afinidad de unión con la proteína E de DENV obtenida por docking molecular (Lupeol, -6.8 Kcal/mol, tabla 3) y con potencial virucida *in vitro* contra DENV-2 (porcentaje de infección del 43,0 % y 54,2 %, contra DENV-2/NG y DENV-2/16681, respectivamente,  $p < 0.05$ , t Student) (figura 7). La figura 18 representa la desviación de la media cuadrática (RMSD) correspondiente a la distancia entre los Carbonos Alfa del sistema (Å) en función del tiempo de simulación en picosegundos (ps). Durante los primeros 2000 ps de simulación se evidenció una fluctuación entre 0,7 y 2,5 Å en el valor RMSD, pero luego el complejo fue estable durante 6,5 ns de simulación.

**8.4. Resultados de la secuenciación del gen de envoltura de las cepas DENV-2/NG y DENV-2/16681.** Con base en las diferencias encontradas *in vitro* en el potencial virucida de los isoprenoides contra las cepas DENV-2/NG y DENV-2/16681 (Figura 7), se secuenció el gen que codifica para la proteína de Envoltura de ambas cepas usadas en los ensayos antivirales, con el objetivo de identificar diferencias relacionadas con el mecanismo antiviral diferencial de los isoprenoides. Se identificaron las cepas DENV-2/NG y DENV-2/16681 usando la herramienta BLAST para nucleótidos. El porcentaje de identidad de la cepa de DENV-2/NG que se envió a secuenciar con la cepa de referencia Nueva Guinea C (1944) (ID de secuencia: AB609589.1) fue del 99,7 %, con una cobertura del 100,0 %. Por otra parte, la cepa DENV-2/16681 correspondió con una identidad del 99,9 % y 100,0 % de cobertura, con la cepa DENV-2/16681 aislada en Tailandia (1964) (ID de secuencia: NC\_001474.2). La cepa DENV-2/NG pertenece al genotipo Asia II y DENV-2/16681 al genotipo Asia I. Sumado a lo anterior, al realizar el alineamiento entre las cepas DENV-2/NG y DENV-2/16681 (1308 nucleótidos alineados), se identificaron 43 cambios nucleotídicos (40 transiciones y 3 transversiones). Además, se tradujeron las secuencias y se alinearon 435 aminoácidos, identificando 6 cambios nucleotídicos, de los cuales dos cambios correspondieron a mutaciones sinónimas, y cuatro cambios correspondieron a mutaciones no sinónimas (tabla 4), con 3 cambios en la polaridad de los aminoácidos de la cepa DENV-2/NG a DENV-2/16681 (S112G, I124N y A454T), y un cambio en la carga de la cadena lateral de los aminoácidos (K126E) (Posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína de envoltura).

## 9. ANÁLISIS, DISCUSIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En las últimas cinco décadas, ha surgido una epidemia a nivel mundial de enfermedades arbovirales, dentro de las que se destacan el Dengue, Zika y Chikungunya. Lo anterior, evidenció la necesidad de reevaluar las prioridades de investigación e intervención en salud pública, con el objetivo de identificar determinantes sociales y ambientales, medidas de control vectorial, diagnóstico oportuno, desarrollo de vacunas y búsqueda de antivirales específicos [226]. A pesar de los avances, no se cuenta a la fecha con un tratamiento antiviral específico disponible contra estos arbovirus [10-12].

En el presente trabajo se evaluó el potencial antiviral de cuatro compuestos isoprenoides (Alfa-Espinasterol, Lupeol, Estigmasterol y Friedelina) contra las infecciones por los virus DENV-2, CHIKV y ZIKV; en etapas previas o posteriores a la entrada de los virus a la célula, y su posible efecto virucida; en tres líneas celulares. Se eligió la línea celular VERO dado que son células altamente permisivas a la infección por los tres virus, además de ser usadas para el estudio de la cinética de la infección [227, 228], perfil proteómico [229, 230], respuesta inmune [231, 232], producción de candidatos de vacuna [233], así como para las evaluaciones antivirales [46, 211, 234, 235]. Los isoprenoides que demostraron potencial antiviral en esta línea celular, mediante las estrategias de PRE- tratamiento y

POST-tratamiento, fueron evaluados posteriormente en las líneas celulares U937 (linfoma histiocítico humano) y A549 (adenocarcinoma alveolar humano). Ambas son derivadas de tejido humano y soportan la replicación de DENV [229, 236], ZIKV [234, 237] y CHIKV [211, 238]. Adicionalmente, las U937 son células usadas en estudios sobre respuesta inmune y patogenicidad [237, 239, 240].

En este trabajo se obtuvieron porcentajes de viabilidad dependientes de la concentración de los compuestos evaluados (figura 3). Con relación a la toxicidad celular provocada por los isoprenoides, Parvez et al. no obtuvieron citotoxicidad en células HepG2.2.15 (línea celular de hepatoblastoma humano HepG2) en presencia del Lupeol y el  $\beta$ -Sitosterol, un fitoesterol estructuralmente similar al Alfa- Espinasterol y Estigmasterol [241], a concentraciones de 2,5 a 50  $\mu$ g/mL [192]. Además, y similar a lo reportado por Gong et al. [242], en este trabajo se identificó que, a pesar de la similitud estructural de los isoprenoides, la citotoxicidad puede diferir dependiendo del compuesto evaluado y la línea celular seleccionada (tabla 3 y figura 3). En este sentido, a la máxima concentración evaluada en VERO, el compuesto que afectó en mayor porcentaje la viabilidad celular fue la Friedelina (figura 3) y, al comparar la viabilidad de células VERO, U937 y A549 en presencia de la misma concentración de cada compuesto, las células U937 se ve más afectadas que las demás líneas celulares (tabla 3 y figura 3).

Es importante precisar que, en el marco de este trabajo, un compuesto con potencial antiviral *in vitro*, se podría definir como aquel con la capacidad de inhibir la formación de partículas virales infecciosas, replicación viral y/o la síntesis de proteínas de los virus DENV-2, CHIKV y/o ZIKV mediante al menos una de las cuatro estrategias experimentales utilizadas (tamizaje antiviral, PRE-tratamiento, TRANS-Tratamiento y POST-tratamiento), a una concentración no tóxica para las células, compuesto que en este caso fue un isoprenoide. Estos antivirales pueden ser de acción directa (dirigidos a blancos virales) o dirigidos al hospedero, actuando sobre factores celulares o rutas metabólicas, necesarias en el ciclo replicativo viral [69, 243].

Los isoprenoides son compuestos cuya actividad antiviral ha sido evaluada previamente [189] [190]. En este contexto, los compuestos Alfa-Espinasterol (Figura 2 A) y Estigmasterol (Figura 2 C) son fitoesteroles, que difieren estructuralmente del colesterol en la cadena lateral, por la presencia de un grupo etilo adicional y un doble enlace [244]. Además, el Alfa-Espinasterol difiere del Estigmasterol y el colesterol en la posición del doble enlace ubicado en el sistema de anillos tetracíclico [241, 244]. Lupeol (Figura 2 B) y Friedelina (Figura 2 D), por su parte, son triterpenoides pentacíclicos que comparten con los fitoesteroles y el colesterol, el 2,3 – oxidoescualeno como último intermediario durante su síntesis [122]. Además, el Alfa – Espinasterol, Lupeol y Estigmasterol, al igual que el colesterol, en su carbono 3 contienen un hidroxilo (figura 2 A, 2 B y 2 C) [241].

La similitud estructural de los cuatro isoprenoides con el colesterol se asocia con su actividad biológica. Al respecto, se ha reportado la capacidad del Alfa-Espinasterol y Estigmasterol para modular algunas propiedades de la membrana celular que regula el colesterol como la alteración de la permeabilidad, condensación de ácidos grasos de los fosfolípidos y formación de balsas lipídicas, aunque con menor eficiencia que el colesterol [241, 244-246]. Asimismo, se ha reportado el efecto hipolipidémico o hipocolesterolémico del Estigmasterol, Friedelina y Lupeol en modelos animales [247-249]; sugiriendo que el efecto hipocolesterolémico puede deberse a la competencia con el colesterol en el proceso de absorción intestinal [119, 250]. Además, se ha reportado que la similitud entre el Lupeol y el colesterol podrían facilitar que el Lupeol atraviese la barrera cutánea y penetre a través del estrato córneo [251]. De acuerdo con lo anterior, y con base en investigaciones previas que demuestran la importancia del

colesterol dentro del ciclo replicativo de los flavivirus [252] y alfavirus [253], se sugiere que los compuestos isoprenoides podrían ejercer un efecto antiviral contra los arbovirus evaluados, en las etapas del ciclo replicativo en que se encuentra involucrado el colesterol, información que será descrita en los próximos apartados, para cada virus evaluado.

## 9.1 DENV

**9.1.1 Actividad antiviral *in vitro* de los isoprenoides contra DENV.** Se identificó el efecto antiviral del Alfa-Espinasterol contra DENV-2/NG, mediante un tamizaje antiviral en células VERO (Figura 4). El mecanismo antiviral de este compuesto contra DENV-2, podría estar relacionado con la importancia del colesterol dentro del ciclo replicativo de los flavivirus [135, 252] [254]. Para ilustrar esta idea, algunos receptores celulares como HSP70 y HSP90 (presentes en macrófagos y línea celular U937) [45] o DC-SIGN (presente en células dendríticas) [255] residen en microdominios membranales ricos en colesterol (balsas lipídicas), que actúan como plataforma para facilitar la entrada de DENV a las células [256, 257]. Asimismo, las balsas lipídicas pueden estar involucradas en la formación de complejos de replicación y procesamiento de poliproteínas, mediante la interacción con las proteínas NS1 [258] y NS3 de DENV [259]. Por otra parte, se ha reportado la importancia del colesterol presente en la envoltura de los flavivirus para la infectividad viral [135, 260, 261].

Además, se ha demostrado que en etapas iniciales y durante la replicación de DENV, hay un incremento del colesterol en las células infectadas debido al aumento de la expresión del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLr), encargado de la captación del colesterol extracelular, y, al aumento de la actividad enzimática de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), involucrada en la síntesis de colesterol [47, 262, 263]. Por otro lado, durante el ensamblaje de la nucleocápside de DENV, es necesaria la acumulación de proteína C alrededor de gotas lipídicas [47, 264].

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, los cuatro isoprenoides demostraron un posible efecto virucida contra DENV-2 (Figura 7), siendo el primer estudio que demuestra potencial antiviral del Alfa-Espinasterol y Friedelina. Para el caso de Lupeol, Silva et al. identificaron el potencial de este compuesto para inhibir la infección por DENV-2 en células LLC-MK2, (IS = 13,07) [191]. Cabe aclarar que, los compuestos con actividad virucida pueden interactuar o alterar físicamente la partícula viral [265]; provocando, bien sea, la destrucción o inactivación del virión, o interactuar con proteínas virales, induciendo cambios conformacionales que afectan la adsorción e internalización del virus [266], o alterando la infectividad de la partícula viral sin provocar cambios morfológicos aparentes [265]. Teniendo en cuenta lo anterior y que, Carro et al. demostraron que la presencia de colesterol en la envoltura viral de DENV es necesaria para la etapa de fusión [260, 261], y que, Lee et al. identificaron que la etapa de fusión de DENV-2 podría verse afectada por el tratamiento con colesterol exógeno durante la infección en células de neuroblastoma de ratón N18, sugiriendo que la intercalación del colesterol exógeno en la envoltura del virión podría provocar una barrera energética para la fusión de la envoltura viral y la membrana de la célula hospedera [135]; se sugiere como mecanismo antiviral para los cuatro isoprenoides contra DENV-2, la competencia de los isoprenoides con el colesterol presente en la envoltura viral, o una intercalación de los isoprenoides junto con el colesterol en la envoltura viral, lo que podría provocar un aumento en la rigidez de la partícula viral y por ende, afectar la capacidad infecciosa de DENV-2 [135, 262].

El potencial antiviral del Estigmasterol y Friedelina fue dependiente de la cepa viral. En este contexto,

Estigmasterol demostró un efecto antiviral contra DENV-2/16681; y Friedelina contra DENV-2/NG (Figura 7). Respecto a esto, clínicamente, la cepa DENV-2/NG se ha asociado con el desarrollo del dengue [267]; mientras que DENV-2/16681, se ha relacionado con dengue grave [268]. Previamente se ha sugerido que las diferencias genéticas entre las cepas de un mismo serotipo de DENV podrían afectar la virulencia, atenuación y potencial epidémico [23]. Además, estudios previos han demostrado que la respuesta antiviral [101], susceptibilidad a la infección [269], perfil de expresión de proteínas celulares [229, 270] y tasas de replicación viral [271] pueden diferir según la cepa de DENV infectante y la línea celular utilizada [272].

Adicional a lo expuesto, se han reportado variaciones genéticas dentro de un mismo serotipo de DENV [273]. A partir de los resultados de la secuenciación del gen de envoltura de las cepas DENV-2/NG y DENV-2/16681, se identificó que la cepa DENV-2/NG usada en este estudio pertenece al genotipo Asia II, mientras que la cepa DENV-2/16681 al genotipo Asia I. Con base en los resultados del alineamiento, se identificó un 98,6 % de identidad entre las secuencias de aminoácidos de las cepas DENV-2/NG y DENV-2/16681 y cuatro mutaciones no sinónimas, tres de ellas con cambios en la polaridad de los aminoácidos (S112G, I124N, y A454T), y un cambio en la carga del radical de los aminoácidos (K126E) de DENV-2/NG respecto a DENV-2/16681 (tabla 4). Lo anterior, se correlaciona con evidencia previa que demuestra que pocas sustituciones de aminoácidos pueden asociarse con una mayor escala epidémica y gravedad de la enfermedad causada por los arbovirus [273].

Específicamente, se han identificado similitudes de secuencia de nucleótidos de 98,1 a 99,6% y de aminoácidos de 99,4 a 99,9% en las cepas de DENV-2 circulantes en Tailandia [274]. También, se han descrito cambios en la virulencia *in vitro* e *in vivo* provocadas por sustituciones de un solo aminoácido en la proteína de envoltura de otros flavivirus como virus de la encefalitis japonesa (EJ) y virus de encefalitis transmitida por garrapatas (TBE) [275]. Además, Hapuarachchige y colaboradores identificaron seis sustituciones aminoacídicas en la proteína E de DENV-2 (aislado de muestras de pacientes con Fiebre hemorrágica por Dengue), distribuidas en los tres dominios de la proteína E, pero ninguno afectó el dominio de fusión, epítopes de neutralización o motivos virulentos [276]. De acuerdo con lo anterior, se hace necesario evaluar *in silico* los efectos estructurales y funcionales de dichos cambios aminoacídicos en la proteína de envoltura de las cepas DENV-2/NG y DENV-2/16681, que permitan establecer una relación con la respuesta antiviral diferencial de los isoprenoides en los ensayos *in vitro* entre ambas cepas.

Se ha reportado además que las cepas DENV-2/NG y DENV-2/16681 se diferencian en el mecanismo de internalización. A pesar de que ambas cepas se transportan a endosomas tempranos de una manera Rab5-dependiente, el transporte de DENV-2/16681 a endosomas tardíos es dependiente Rab7, mientras que DENV-2/NG, utiliza un mecanismo de transporte de clasificación desconocida a compartimentos de reciclaje perinuclear [277]. Esta diferencia podría estar relacionada con el mecanismo antiviral diferencial del Estigmasterol contra DENV-2/16681 y de la Friedelina contra DENV-2/NG. No obstante, mediante la estrategia de PRE- tratamiento y POST-tratamiento en células VERO, ninguno de los isoprenoides inhibió DENV-2/NG y DENV-2/16681, lo que sugiere que el mecanismo antiviral de estos compuestos contra ambas cepas no involucra factores de la célula hospedera (figuras 5 y 8).

Por otro lado, debido a que la Heparina y Suramina son glucosamiglicanos solubles que actúan como antagonistas competitivos de unión con proteínas E de DENV en células VERO [206], se utilizaron como controles de inhibición para las evaluaciones *in vitro*. En este contexto, para la estrategia de

PRE- tratamiento se usó Heparina (figura 5), mientras que Suramina para la estrategia de TRANS-tratamiento de DENV-2/NG y DENV-2/16681 (figuras 5 y 7). Sumado a lo anterior, la Suramina inhibió ambas cepas de DENV-2 mediante el tamizaje antiviral (figura 4), resultado que se correlaciona con lo reportado por Basavannacharya et al. quienes identificaron que esta molécula, además de interactuar con la proteína E de DENV [223], puede afectar etapas posteriores a la entrada del virus a la célula, mediante la inhibición de la función helicasa de la NS3 de DENV, proteína necesaria para la replicación viral de este virus [201]. Por otro lado, la Ribavirina es un análogo de nucleósido que interfiere con la replicación y liberación de partícula viral infecciosa de DENV-2 en células VERO (CE<sub>50</sub>: 106.6 mg / L) [209], y de acuerdo con lo esperado, en este trabajo inhibió *in vitro* las cepas DENV-2/NG y DENV-2/16681 en la estrategia de POST-tratamiento (figura 8).

**9.1.2 Interacciones *in silico* de los compuestos isoprenoides con las proteínas de DENV.** La glicoproteína E, expuesta en la envoltura de DENV participa en la adhesión, internalización, fusión y el ensamblaje de la partícula viral, además, es el principal antígeno viral que induce la formación de anticuerpos neutralizantes y que, por tanto, confiere respuestas inmunitarias protectoras para el hospedero [275]. Al evaluar *in silico* la interacción de los cuatro isoprenoides con el Dominio III de la proteína E de DENV-2 (dominio de interacción con los receptores celulares) se obtuvo en todos los casos, energías de unión favorables, pero diferentes, a pesar de la similitud estructural de los compuestos (tabla 1). Lo anterior podría ser explicado por las interacciones tipo puente de Hidrógeno formadas por sólo uno de ellos y las interacciones hidrofóbicas con distintos aminoácidos de la proteína viral para todos los compuestos (figura 12). Estas diferencias podrían sugerir una posible explicación ante las diferentes actividades virucidas evidenciadas contra DENV-2 (figura 7). En concordancia con lo esperado, las interacciones principales fueron de tipo hidrofóbico, dada la estructura química de los compuestos tipo isoprenoide (figura 2) y el bolsillo de interacción seleccionado en la proteína viral (tabla 1). La naturaleza alifática o aromática de los aminoácidos presentes en este bolsillo hidrofóbico [278] favoreció que los cuatro compuestos tuvieran interacción con Met301, Pro336, Phe337 e Ile379 (Figura 12). Los resultados obtenidos para los cuatro isoprenoides se correlacionan con lo reportado por Chandrasekaran et.al. quienes obtuvieron una energía de unión favorable con el Escualeno con la proteína E de DENV (-5.55 Kcal/mol), el cual es un precursor de los triterpenos y esteroides [279].

En este trabajo, el Lupeol fue el isoprenoide con el cual se obtuvo la mejor energía de unión con la proteína E de DENV (tabla 1). Lo anterior se podría relacionar con los resultados obtenidos *in vitro*, en los que con este compuesto se obtuvo el mayor porcentaje de inhibición contra DENV-2 mediante la estrategia TRANS-tratamiento contra la cepa DENV-2/NG, y que además demostró potencial virucida contra DENV-2/16681 (figura 7). Por estos motivos, se eligió el complejo proteína E de DENV con el Lupeol para evaluar la estabilidad de este por dinámica molecular. Esta herramienta complementa la predicción de la energía libre de unión obtenida por docking molecular [280], puesto que incorpora flexibilidad del receptor, el efecto de los solventes y permite evaluar la estabilidad y confiabilidad del complejo formado a lo largo del tiempo [281]. Se identificó que el complejo formado por la proteína E de DENV y el Lupeol cambió ligeramente en comparación con la estructura inicial durante la simulación (figura 18), indicando la estabilidad del complejo en el tiempo y que la presencia de solventes no afecta esta interacción [282], lo que podría sugerir que el Lupeol podría ser un potencial ligando de la proteína E de DENV [281], y por ende, un antiviral promisorio contra este virus.

Se ha descrito previamente que el compuesto de origen natural Naringenina, mediante la metodología *in silico*, interactuó con una energía de unión favorable con la proteína E de DENV (-7.64 Kcal/mol)

[141], y demostró *in vitro* un potencial virucida contra DENV-2 [133]. Con base en lo anterior, y en los resultados obtenidos mediante docking y dinámica molecular, se podría sugerir como uno de los posibles mecanismos antivirales de los cuatro isoprenoides evaluados en este trabajo, la interacción con el dominio III de la proteína E de DENV, lo que podría afectar el reconocimiento del receptor presente en la superficie de las células hospederas, bloqueando la entrada viral y la capacidad infecciosa de DENV-2 [283].

Por otra parte, la proteína no estructural NS5 de DENV tiene dos dominios (metiltransferasa y RdRp), destacando la función polimerasa dado que es específica para la replicación viral y carece de contraparte enzimática en las células de mamíferos [16]. A diferencia del dominio hidrofóbico evaluado en la proteína E, el sitio de unión seleccionado para la proteína NS5 de DENV (dominio RdRp), tiene aminoácidos polares como Arg279, Ser317, Glu509 e His512 (tabla 2). Dada la naturaleza de estos aminoácidos, fueron formados puentes de Hidrógeno con tres de los isoprenoides (Alfa-Espinasterol, Lupeol y Estigmasterol) (tabla 2 y figura 15). Se debe tener en cuenta que AutoDock Vina favorece un mayor puntaje para los puentes de Hidrógeno [284], y por tanto las energías de unión obtenidas fueron mayores que con la proteína E de DENV. Por su parte, la Friedelina, a pesar de no formar puentes de hidrógeno tuvo la energía de unión más alta, basada en las interacciones hidrofóbicas (Tabla 2 y Figura 15).

Contrario a lo analizado con la proteína E de DENV, las energías de unión para los cuatro isoprenoides con NS5 de DENV, a pesar de ser favorables, no se correlacionan con los resultados antivirales *in vitro*, pero pudiera relacionarse con el aumento en la cuantificación de partículas virales infecciosas de este virus mediante la estrategia de POST-tratamiento (tabla 2 y figura 8).

En resumen, de acuerdo con los resultados *in vitro* e *in silico* obtenidos para DENV-2, se sugiere que el mecanismo antiviral de los cuatro isoprenoides no involucra etapas posteriores a la entrada del virus a la célula, y demuestra que, si bien las herramientas computacionales son útiles en la identificación de moléculas con actividad antiviral al predecir posibles interacciones ligando - receptor [285], se hace necesario, posteriormente, realizar una verificación experimental de su actividad biológica [286].

Cabe mencionar que la Suramina se usó como control de la evaluación *in silico* con la proteína E de DENV, puesto que previamente se ha demostrado que tiene la capacidad de interactuar con esta proteína viral [223]. Similar a lo reportado, en este trabajo se obtuvo una afinidad de unión favorable entre la Suramina y la proteína E de DENV (Tabla 1 y figura 12). Por otra parte, la Ribavirina fue elegida como control para evaluar la interacción con la NS5, obteniéndose una energía de unión favorable (tabla 2 y figura 15), puntaje que se correlaciona con lo reportado por Ncube et al, quienes obtuvieron una afinidad de unión entre la Ribavirina y el dominio RdRp de NS5 de DENV de -5.0 Kcal/mol [16].

## 9.2 CHIKV

**9.2.1 Actividad antiviral *in vitro* de isoprenoides contra CHIKV.** Cambiando de modelo viral, en este trabajo no se identificó potencial antiviral *in vitro* de los cuatro isoprenoides contra CHIKV/ACol, mediante la estrategia de tamizaje antiviral (figura 4). En particular, el Alfa-Espinasterol no provocó un efecto antiviral contra este virus mediante las estrategias utilizadas (figuras 4, 5, 7 y 8). En contraparte, mediante la estrategia de PRE- tratamiento se demostró el efecto antiviral del Lupeol y el Estigmasterol contra CHIKV/ACol en las células VERO y U937 (figuras 5 y 6 A), lo que sugiere que la actividad

antiviral contra este alfavirus podría estar dirigida a etapas iniciales del ciclo replicativo como adhesión, internalización, decapsidación o fusión viral [46, 133]. De acuerdo con lo anterior, y que al igual que para los flavivirus, el colesterol juega un papel importante en el ciclo replicativo de los alfavirus, incluido CHIKV [253, 287], se ha descrito que alteraciones en el metabolismo del colesterol pueden afectar la velocidad y la eficiencia de la producción de viriones CHIKV en múltiples etapas del ciclo replicativo [288].

En este contexto, previamente se demostró que CHIKV requiere de la acidificación del pH y la presencia de colesterol en la membrana de las células HEK293T [253], lo que podría sugerir que la interferencia en la síntesis o captación de colesterol, podría provocar un bloqueo de la etapa de internalización de CHIKV. Respecto a esto, se ha demostrado previamente que el Lupeol (1- 10  $\mu$ M) afecta la secreción de triglicéridos y colesterol mediante la inhibición de la expresión de genes necesarios en la síntesis de lípidos como SREBP-1c (Sterol regulatory element-binding protein 1) y SREBP-2, FAS (Fatty acid synthase), HMG-CoA sintasa-1 y FDFT (farnesyl-diphosphate farnesyltransferase) [289]. Además, el Estigmasterol ha demostrado capacidad para interferir con la biosíntesis de colesterol en líneas celulares de origen humano [290], e inhibir *in vivo* la actividad de HMGCR y la absorción de colesterol [291]. Todo anterior sugiere que uno de los mecanismos antivirales de estos dos compuestos podría estar dirigido a la etapa de internalización viral.

Con relación a la etapa de fusión, se ha reportado que el colesterol es necesario para la interacción hidrofóbica de la proteína E1 de los alfavirus con la membrana de la célula hospedera [292], y que para el caso de los alfavirus SFV (Semliki Forest virus) y SIN (Sindbis virus) esta dependencia no está relacionada con balsas lipídicas en las células BHK-21 [287]. Para CHIKV, se reportó que la Imipramina, un compuesto que provocó la acumulación de colesterol en endosomas tardíos o lisosomas, ejerció un efecto antiviral contra CHIKV mediante la inhibición de las etapas de fusión y replicación en fibroblastos de la piel humana HFF1 [288]. A partir de lo anteriormente mencionado, y con base en los resultados obtenidos para el Lupeol y Estigmasterol, se sugiere que estos compuestos podrían estar afectando también la etapa de fusión de CHIKV, por disminución de los niveles intracelulares de colesterol, mediante la modulación de la captación y/o síntesis de este esteroide.

Es preciso aclarar que, el efecto antiviral del Lupeol y Estigmasterol contra etapas tempranas del ciclo replicativo de CHIKV, fue dependiente de línea celular (Figuras 5 y 6 A), similar a lo reportado por Franco et al. quienes identificaron que la efectividad de los antivirales contra este virus puede diferir de acuerdo con el tipo de célula infectada [211]. En la línea celular U937, se obtuvo una actividad antiviral de los dos isoprenoides contra CHIKV/ACol mediante la estrategia de PRE- tratamiento, pero no en POST-tratamiento, en el caso del Lupeol (figuras 6 A y 9). El mecanismo antiviral sugerido contra para estos dos compuestos en la línea celular humana U937, podría estar relacionado con el hecho de que estas células son deficientes en una de las enzimas necesarias para la síntesis de colesterol (3-ketosteroid reductase), por lo que requieren de la captación de LDL para la síntesis de nuevas membranas y proliferación celular [293, 294]. Esta dependencia de captación del colesterol exógeno, podría estar favoreciendo que el Lupeol y Estigmasterol afecten las etapas tempranas del ciclo replicativo del CHIKV, esto debido al efecto modulador de los dos isoprenoides sobre la captación del colesterol [289, 291] y a la importancia de este último esteroide en ciclo replicativo de los alfavirus descrita [253][287]. No obstante, se hace necesario realizar estudios complementarios que permitan dilucidar la etapa inicial del ciclo replicativo viral que está siendo afectada.

Para el caso de la línea celular VERO, el efecto antiviral del Lupeol contra CHIKV/ACol mediante las

estrategias de PRE- tratamiento y POST- tratamiento (figuras 5 y 8), podría ser explicado porque este es un compuesto bioactivo, lo que le confiere la propiedad de ingresar a la célula y afectar etapas tempranas y/o modificar rutas de señalización celular que interfieren con etapas posteriores del ciclo replicativo del virus [295, 296]. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para esta línea celular, la importancia del colesterol previamente descrita tanto para los alfavirus [253] [287] como para las líneas celulares de origen mamífero [297] y la capacidad del Lupeol para inhibir la síntesis de colesterol [289], se sugiere que el mecanismo antiviral del Lupeol contra CHIKV en las células VERO podría estar afectando de manera simultánea varias etapas del ciclo replicativo de CHIKV en las que participa el colesterol, como las descritas anteriormente. Adicional a lo expuesto, algunos de los mecanismos antivirales reportados para los triterpenoides pentacíclicos, grupo al que pertenece el Lupeol, contra otros modelos virales como HIV, virus de la hepatitis C (HCV), virus de la Influenza, SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Síndrome - associated coronavirus) incluyen la inhibición de la etapa de adhesión y fusión, de la actividad proteasa, bloqueo en la etapa de maduración, o mecanismos antivirales simultáneos [298]. Además, la Lupenona y la  $\beta$ -amirona, dos triterpenoides con esqueleto de Lupano, al igual que el Lupeol, han demostrado potencial antiviral contra CHIKV ( $CE_{50}$  de 77  $\mu$ M y 86  $\mu$ M, respectivamente) en células VERO, mediante la adición simultánea del virus y los compuestos [153].

Por otra parte, se evidenció también un efecto antiviral del Lupeol dependiente de línea celular mediante la estrategia de POST-tratamiento (figuras 8 y 9). Contrario a lo obtenido para la línea celular U937, en las células A549 este compuesto demostró potencial antiviral contra CHIKV/ACol, mediante la estrategia de POST-tratamiento, pero no mediante el PRE- tratamiento (figuras 6 A y 9). Estas diferencias entre las líneas celulares humanas podrían estar relacionadas con lo reportado por Gueddari et al., quienes evidenciaron que el bloqueo de la síntesis de colesterol endógeno regula positivamente el gen LDLr en células A549, de manera diferencial respecto a otras líneas celulares (fibroblastos humanos) [299]. Además, y dado que se evidenció un mecanismo antiviral en la línea celular VERO y A549 dirigido a etapas posteriores a la entrada del CHIKV, se podría sugerir que a pesar de que estas dos líneas celulares difieren de su origen (mamífero y humano, respectivamente), ambas comparten una morfología epitelial, lo que podría sugerir que estas líneas celulares comparten rutas metabólicas que afectan el ciclo replicativo de CHIKV [300, 301].

Dado que previamente se ha reportado que la disminución de los niveles intracelulares de colesterol pueden también afectar la replicación del CHIKV en fibroblastos de la piel humana [288], y para ampliar la comprensión del mecanismo antiviral del Lupeol contra etapas posteriores a la entrada, se evaluó el efecto antiviral sobre la replicación del CHIKV. Se evidenció que el Lupeol provocó acumulación intracelular del RNA de CHIKV/ACol en células VERO; mientras que en la línea celular A549, una disminución del número de copias genómicas (Figura 10). Respecto a esto, Grace et al. demostraron que las células A549 soportaron niveles de replicación de CHIKV inferiores a los obtenidos para las células VERO E6 y HeLa [302]. Sumado a lo anterior, en un estudio previo, se reportó que el tratamiento con INF  $-\alpha$  exógeno en la línea celular A549 provocó un efecto antiviral mayor contra CHIKV ( $CE_{50}$ : 4.235 UI / mL), respecto a las células VERO ( $CE_{50}$ : 1344.6 UI / mL). Además, previamente se reportó que el compuesto ME3738 (22 $\beta$ -methoxyolean-12-ene-3 $\beta$ ,24(4 $\beta$ )-diol), un derivado de saponina triterpenoide, inhibió la replicación de HCV, un virus perteneciente a la familia flaviviridae, que comparte la naturaleza genómica de CHIKV (RNA<sub>ss</sub> (+)), mediante la inducción de la expresión génica de oligoadenilato sintetasa 1, incrementando el efecto del IFN- $\alpha$ , en las células de origen humano HepG2 [303]. El mecanismo antiviral identificado para el compuesto ME3738 contra HCV, podría estar relacionado con el efecto antiviral del Lupeol contra CHIKV, puesto que este

isoprenoide podría estar provocando un incremento del efecto del INF tipo I en la línea celular humana A549, afectando vías de la inmunidad innata durante la infección viral, como la escisión del RNAs mediante la activación de RNAsa L [304]; efecto que no puede ejercer en las células VERO, debido a que estas células carecen de genes responsables de la síntesis de INF endógeno [305], lo que podría estar impidiendo una respuesta antiviral robusta contra la replicación de CHIKV (como la evidenciada en A549) [211].

Además, se evaluó el efecto antiviral contra la etapa de traducción, obteniendo que el Lupeol no afectó la traducción de proteína E de CHIKV en VERO y A549 (Figura 11). En concordancia con lo anterior, los triterpenoides pentacíclicos Lupeol, Betulina y Ácido Betulínico demostraron previamente potencial antiviral contra otro modelo viral (HSV-1) en células RC-37, afectando etapas tempranas del ciclo replicativo, pero no la síntesis de proteínas virales [190]. Con base en estos resultados, se evidencia la necesidad de evaluar el efecto antiviral del Lupeol sobre etapas posteriores a la traducción, tales como el ensamblaje, maduración y liberación, con el objetivo de dilucidar con mayor claridad las diferencias en el mecanismo antiviral diferencial contra CHIKV en las líneas celulares VERO y A549.

Con relación a las etapas posteriores a la traducción, se ha sugerido para otros alfavirus que el colesterol presente en la membrana de la célula hospedera no provoca un efecto sobre la etapa de ensamblaje ni la capacidad infecciosa del virus [306]. Además, se ha sugerido que los virus que requieren de colesterol en la etapa de fusión, también lo requieren en la gemación [307]. De acuerdo con lo anterior, los resultados obtenidos para el Lupeol y la dependencia de colesterol para la fusión del CHIKV, se sugiere como el bloqueo de la etapa de gemación como un posible mecanismo antiviral para este isoprenoide.

Adicionalmente, se ha identificado que para el virus Sindbis, el contenido de colesterol presente en la envoltura viral podría estar afectando el proceso de plegamiento de las glicoproteínas virales, alterando indirectamente la estabilidad estructural del virión [306]. En conexión con lo anterior, en este trabajo se identificó el posible efecto virucida del Lupeol y la Friedelina contra CHIKV/ACol (figura 7). Respecto a esto, se ha demostrado que la partícula viral de los alfavirus tiene una mayor composición lipídica (30,0 %) que los flavivirus (composición lipídica del 17,0 %) [308], característica que podría estar relacionada con el mecanismo de acción de los isoprenoides. Específicamente, se ha reportado para el MAYV (virus Mayaro) el contenido lipídico presente en la envoltura viral de virus producidos en células de mamífero es necesario para el mantenimiento de las glicoproteínas virales en conformaciones funcionales o para proporcionar una estructura rígida que proteja la nucleocápside del virión del medio extracelular, por lo que el agotamiento del colesterol en la envoltura del alfavirus podría afectar la composición lipídica de la envoltura viral, lo que conduce a una alteración de la estabilidad de la partícula viral y una pérdida de la infectividad [309]. Basados en estos hallazgos, en la similitud estructural de los isoprenoides con el colesterol, y en el mecanismo antiviral sugerido para DENV, se podría sugerir como posibles mecanismos antivirales del Lupeol y la Friedelina contra CHIKV, la competencia de los compuestos con el colesterol presente en la envoltura viral lo que podría cambiar las propiedades de la envoltura viral y afectar su estabilidad, o en segundo lugar, la intercalación junto con el colesterol, incrementando de esta manera la rigidez de la partícula viral y, por ende, la infectividad de CHIKV. Cabe mencionar que, el resultado obtenido para el Lupeol mediante la estrategia de TRANS-tratamiento podría estar relacionado con el efecto antiviral evidenciado mediante la estrategia de PRE- tratamiento (figura 5 y 6 A), sugiriendo que uno de los mecanismos antivirales de este isoprenoide podría ser un bloqueo de la entrada del CHIKV a la célula, en un efecto dependiente de la partícula viral. Lo anterior respalda la hipótesis sugerida que el Lupeol

podría afectar al menos dos etapas del ciclo replicativo del CHIKV de manera simultánea.

Además de la actividad antiviral, se ha descrito para el Lupeol múltiples actividades biológicas [186], destacando su efecto antiinflamatorio y antiartrítico [310] [311]. Estas propiedades biológicas adquieren gran relevancia dado que el compromiso articular es la principal manifestación clínica de la Fiebre por Chikungunya, que puede afectar por meses, e incluso años, la calidad de vida de los pacientes, por lo que el estudio de la actividad antiviral del Lupeol en etapas preclínicas y clínicas contra CHIKV, para su posterior uso en pacientes infectados, podría no sólo provocar un efecto antiviral, sino contribuir al manejo y control de los síntomas provocados por la enfermedad.

Por otro lado, Suramina, también conocido como Germanin o Bayer-205, está autorizado en el mercado para el tratamiento de la tripanosomiasis [312]. Este compuesto, se utilizó como control de inhibición de partícula viral infecciosa de CHIKV; puesto que, previamente, inhibió *in vitro* la adsorción e internalización de CHIKV, liberación de partícula viral infecciosa [224] y la síntesis de RNA de CHIKV [202]. Además, el tratamiento con Suramina redujo la carga viral, alivió la inflamación del pie y lesiones musculoesqueléticas en ratones infectados con CHIKV [313]. En concordancia con lo reportado, en este trabajo se obtuvo inhibición de CHIKV/ACol mediante el tratamiento con Suramina mediante las estrategias PRE- tratamiento, TRANS-tratamiento y tamizaje antiviral en VERO, respectivamente (figuras 4, 5, 6A), además de inhibir la síntesis de proteína E de CHIKV/ACol (figura 11). Por otra parte, dado que se reportó previamente la actividad antiviral de Ribavirina contra CHIKV en VERO y A549 [211], este compuesto se usó como control de inhibición de la replicación viral de CHIKV/ACol, obteniendo inhibición tanto de RNA viral como partícula viral infecciosa en ambas líneas celulares (figuras 8,9 y 10).

**9.2.2 Interacciones *in silico* de compuestos isoprenoides con proteínas de CHIKV.** La glicoproteína de envoltura (E2) de CHIKV participa en la etapa de adhesión viral [67], por lo que se eligió para evaluar la posible interacción del virus con los cuatro isoprenoides mediante docking molecular, obteniéndose energías de unión favorables para todos los compuestos evaluados (tabla 1). En el bolsillo de unión seleccionado para E2 de CHIKV hay mayor presencia de aminoácidos polares (tabla 1), y a pesar de esto, por la naturaleza de los compuestos no hubo formación de puentes de Hidrógeno, pero sí interacciones hidrofóbicas (figura 13), lo que permite inferir que estas últimas son suficientes, por sí solas, para permitir la interacción *in silico* de estos compuestos con la proteína E de CHIKV.

En este contexto, las mejores energías de unión obtenidas para la proteína E2 de CHIKV fueron con Lupeol y Friedelina (tabla 1). Esto se podría relacionar con el posible efecto virucida de estos dos isoprenoides contra CHIKV (figura 7). Lo anterior sugiere como un posible mecanismo antiviral para estos dos compuestos la interacción con la proteína E2, lo cual podría bloquear la etapa de adhesión de CHIKV.

Por otra parte, la Suramina fue seleccionada como control positivo de inhibición contra la infección por CHIKV, en la evaluación *in vitro* su actividad antiviral contra CHIKV fue comprobada (Figura 7). Asimismo, mediante herramientas bioinformáticas se ha identificado que esta molécula interactúa con el complejo de glicoproteína E1 (Dominio II) y E2 de CHIKV (puntuación más alta de Patchdock 9266) [224], por lo que también fue usado como control en la evaluación *in silico* (tabla 1). Al comparar los puntajes obtenidos de la energía de unión de los dos isoprenoides con posible efecto virucida (Lupeol y Friedelina) respecto al control Suramina, fueron similares (tabla 1), a pesar de que la Suramina formó

un puente de Hidrógeno con la proteína E de CHIKV, mientras que el Lupeol y la Friedelina formaron únicamente interacciones hidrofóbicas en las que participaron aminoácidos de tipo no polar [278] (figura 13). Esto se correlaciona con los resultados *in vitro* obtenidos en este trabajo, donde la actividad de estos tres compuestos fue similar contra CHIKV (Figura 7).

Por otra parte, la proteína NSP2 de CHIKV cumple múltiples funciones incluyendo la actividad proteolítica, RNA helicasa, nucleósido trifosfatasa (NTPasa) y RNA dependiente de las actividades 5' trifosfatasa (extremo N-terminal de la proteína) [69]. Específicamente, el dominio proteasa es necesario para el procesamiento de las poliproteínas virales [69], por lo cual fue definido para evaluar la afinidad de interacción con los cuatro isoprenoides. Se obtuvieron energías de unión favorables (tabla 2), en las que se formaron interacciones hidrofóbicas (figura 16).

Los resultados obtenidos *in silico* para Lupeol podrían estar relacionados con el potencial antiviral *in vitro* identificado para este compuesto contra CHIKV en etapas posteriores a la entrada del virus a la célula. Con relación a lo anterior, un estudio previo evaluó la afinidad de interacción de la Hesperetina, un flavonoide de origen natural, con la proteína NSP2 de CHIKV, obteniendo una energía libre de unión favorable (-6.9 Kcal/mol) [314], de manera consistente con el efecto antiviral *in vitro* de este compuesto contra la replicación intracelular de CHIKV en células VERO (CE<sub>50</sub>= 8500 µM) [315]. Teniendo en cuenta este reporte, además de los resultados obtenidos *in vitro* e *in silico* para Lupeol contra CHIKV, se sugiere que uno de sus posibles mecanismos antivirales podría ser la interacción con el dominio proteasa de NSP2, afectando de esta manera el procesamiento de los polipéptidos virales [316].

Por otro lado, y debido al efecto antiviral reportado para la Ribavirina contra CHIKV [211], se utilizó como control en las evaluaciones *in silico* con la NSP2 de CHIKV, obteniéndose una energía de unión favorable con esta proteína viral (tabla 2 y figura 16), resultado que se correlaciona con la actividad antiviral evidenciada contra CHIKV mediante la estrategia de POST-tratamiento (figura 8).

### 9.3 ZIKV

**9.3.1 Actividad antiviral *in vitro* de isoprenoides contra ZIKV.** En este trabajo, Friedelina no demostró potencial antiviral contra ZIKV/Col mediante ninguna de las estrategias utilizadas (figuras 4, 5, 7 y 8). En contraparte, se evidenció el potencial antiviral del Alfa-Espinasterol, Lupeol y Estigmasterol contra ZIKV/Col mediante la estrategia de PRE- tratamiento en células VERO (figura 5). Con base en lo anterior, y basados en la hipótesis de que el mecanismo antiviral de los isoprenoides contra los flavivirus podría estar relacionado con la modulación de rutas metabólicas en que se encuentra involucrado el colesterol, previamente se demostró que el tratamiento de células VERO con inhibidores de la HMGCR, mediante un ensayo de tiempo de adición del fármaco, provocó una reducción significativa en el número de partículas virales infecciosas de ZIKV, dependiente del momento de adición de las estatinas [235]. En este sentido, se demostró que el punto máximo de inhibición del ZIKV fue cuando las células se trataron con las estatinas entre cero (0) y 0,5 horas post-infección (h.p.i), y su efecto antiviral fue disminuyendo de manera constante en los siguientes tiempos de adición de las estatinas (tratamiento a las 3, 12, 24 h.p.i), sugiriendo que el mecanismo antiviral podría estar involucrando las primeras etapas del ciclo replicativo de ZIKV, y afectando parcialmente la etapa de internalización [235]. Este hallazgo para las estatinas se correlaciona con los resultados obtenidos para los isoprenoides evaluados, por el hecho de que el efecto antiviral del Alfa-Espinasterol, Estigmasterol y Lupeol fue dependiente de la estrategia de tratamiento utilizada, afectando etapas

iniciales del ciclo replicativo de ZIKV; pero sin evidenciarse potencial antiviral contra este virus mediante las estrategias de tamizaje antiviral (figura 4), TRANS-tratamiento (figura 7), POST-tratamiento (figura 8).

El efecto antiviral del Alfa-Espinasterol, Lupeol y Estigmasterol contra ZIKV podría estar relacionado con la actividad antiviral del 25-Hidroxicolesterol (25HC), un producto de la oxidación enzimática del colesterol que bloquea la replicación viral [317]. En este contexto, el tratamiento con 25HC provocó la inhibición de ZIKV en células VERO mediante el tratamiento previo o posterior a la infección, siendo el PRE - tratamiento, la estrategia con que provocó mayor inhibición de ZIKV ( $CI_{50} = 188$ ), afectando la internalización viral en BHK-21 (1 y 5  $\mu M$ ) [317]. Además, se reportó que en hepatocitos primarios humanos previamente tratados con 25HC (10-40  $\mu M$ ) se moduló la expresión de LDLr y se inhibió la replicación del HCV, otro miembro de la familia *Flaviviridae*, sugiriendo que la modulación de los LDLr es necesaria en etapas iniciales del ciclo replicativo de los flavivirus [318]. En concordancia con lo anterior, Soto et al. reportaron que el aumento en los niveles de colesterol en las primeras etapas de otro flavivirus (DENV), se correlaciona con un aumento en la absorción de partículas de LDL, por un incremento del número de LDLr presente en la superficie de células Huh-7 y en la actividad de la HMGCR [262]. Con relación al Estigmasterol, se conoce que este compuesto afecta la biosíntesis de colesterol a través de la inhibición de DHCR24 ( $3\beta$ -hydroxysterol  $\Delta 24$ -reductase) en las líneas celulares Caco-2 (adenocarcinoma colorectal humano) y HL-60 (derivadas de leucemia promielocítica aguda humanas) [290], mientras que en modelos animales afectó la síntesis hepática de colesterol por inhibición de la actividad de HMGCR, redujo los niveles de colesterol plasmático, inhibió la absorción intestinal del colesterol y suprimió la síntesis de ácidos biliares, con incorporación plasmática y hepática baja [291]. A partir de lo anteriormente mencionado, se sugiere que el Alfa-Espinasterol, Estigmasterol y el Lupeol podrían estar modulando la expresión de LDLr o la actividad de la HMGCR, provocando una disminución en la absorción y/o síntesis de colesterol y, en consecuencia, afectando etapas como adhesión, internalización, fusión o decapsidación de ZIKV.

Es importante aclarar que, aunque la importancia del colesterol ha sido poco evaluada en ZIKV, se ha propuesto la participación del colesterol en el ciclo replicativo de los flavivirus basados, principalmente, en los estudios para otros modelos virales como DENV y virus del Nilo Occidental (WNV, West Nile Virus) [252]. Respecto a las etapas iniciales del ciclo replicativo, Carro et al. demostraron que la presencia de colesterol en la envoltura viral de DENV no es necesario para la adsorción e internalización viral, pero sí para la etapa de fusión de la envoltura viral y la membrana endosomal bloquean la liberación de la nucleocápside al citoplasma [260, 261]. Para el caso de ZIKV, Röcker et al. reportaron el potencial antiviral de CLR01 contra ZIKV [319], una molécula que interactúa con la bicapa lipídica con alto contenido de colesterol y esfingomielinas presentes en la envoltura de virus envueltos [320]. No obstante, en este trabajo, no se identificó potencial virucida de los cuatro isoprenoides contra ZIKV (figura 7), lo que sugiere que mecanismo antiviral para Alfa-Espinasterol, Estigmasterol y Lupeol está dirigido a factores de la célula hospedera involucrados en la entrada de ZIKV a las células, y no a la partícula viral, afectándose probablemente una etapa diferente a la fusión, tales como adhesión o internalización.

Con relación a la importancia del colesterol en las etapas de adhesión e internalización, se reportó para WNV, que el agotamiento de colesterol en la membrana plasmática de células VERO, HeLa y SK-N-MC (derivadas de neuroblastoma humano) afectó la internalización viral mediada por balsas lipídicas (ricas en esfingolípidos y colesterol) [321]. Este mecanismo de entrada también ha sido reportado para DENV en células de origen humano [256]; dado que la internalización viral puede diferir

de acuerdo a la línea celular infectada [260-262]. En el caso de las células de mamíferos, Rodal et al. reportaron que la concentración de colesterol en la membrana plasmática es esencial para la endocitosis dependiente de clatrina [322], siendo este el mecanismo de internalización reportado hasta la fecha para ZIKV [323], lo que podría sugerir que esta etapa está siendo afectada por el tratamiento con Alfa-Espinasterol, Estigmasterol y Lupeol. Sin embargo, es necesario evaluar el efecto antiviral de estos compuestos sobre las etapas de adsorción e internalización específicas, para poder aclarar el mecanismo antiviral de ambos isoprenoides.

Por otra parte, y similar a lo obtenido para CHIKV/ACol, el efecto antiviral de los isoprenoides contra ZIKV/Col fue dependiente de la línea celular, evidenciando que Alfa-Espinasterol y Estigmasterol provocaron disminución del número de partículas virales infecciosas de ZIKV/Col en la línea celular U937, pero no en A549 (Figura 6 B). Esta respuesta antiviral dependiente de línea celular, ha sido reportada previamente para ZIKV [324], y respalda la hipótesis sugerida de que el mecanismo antiviral de estos isoprenoides podría estar dirigido a la modulación de rutas metabólicas celulares en las que participa el colesterol. Específicamente, el Lupeol no inhibió ZIKV/Col en las líneas celulares humanas evaluadas (Figura 6 B), lo que sugiere que el mecanismo antiviral del Lupeol involucra rutas necesarias para infección por ZIKV en línea celular de origen mamífero, pero no en células de origen humano, evidenciando la pertinencia de estudios complementarios, que permitan establecer las rutas metabólicas que están siendo alteradas en células tratadas con los isoprenoides durante la infección por ZIKV.

Adicionalmente, Petrera et al. identificaron el potencial antiviral de dos derivados del Estigmasterol ((22S,23S)-22,23-dihydroxystigmast-4-en-3-one y (22S,23S)-3 $\beta$ -bromo-5 $\alpha$ ,22,23-trihydroxystigmastan-6-one) contra otro modelo viral (HSV-1) en células nerviosas PC-12 (derivada de tumor medular suprarrenal de *Rattus norvegicus*), Neuro-2a y SH-SY5Y (neuroblastoma humano), mediante la estrategia de tratamiento posterior a la infección viral [189]. Sumado a esto, el 25HC, que como se describió previamente, ejerce un efecto antiviral mediante la modulación del colesterol, redujo el número de células infectadas por ZIKV en la corteza cerebral y protegió de la microcefalia en embriones de ratones [317]. Estos resultados resultan particularmente interesantes dado que las complicaciones neurológicas asociadas a las infecciones por ZIKV, están relacionadas con el tropismo de ZIKV por células neuronales [81], por lo que sería importante evaluar en células como SH-SY5Y, que han demostrado previamente susceptibilidad a la infección por ZIKV [210], el efecto antiviral del Estigmasterol contra este virus.

De manera similar a lo reportado por Albuлесcu et al. [203] la Suramina (control positivo) inhibió *in vitro* la liberación de partícula viral de ZIKV/Col mediante el PRE- tratamiento, TRANS-tratamiento y tamizaje antiviral (figuras 4,5,6 B y 7). Por otra parte, se ha reportado para la Ribavirina la capacidad de inhibir *in vitro* la replicación del ZIKV en células VERO y SH-SY5Y [210]. En concordancia con lo anterior, en este trabajo se obtuvo para la Ribavirina (control de inhibición) un efecto antiviral contra ZIKV/Col mediante la estrategia de POST-tratamiento (figura 8).

**9.3.2 Interacciones *in silico* de isoprenoides con proteínas de ZIKV.** El dominio II de la proteína E de ZIKV se encuentra involucrado en la fusión de la envoltura del virus con la membrana endosomal de la célula hospedera [85], motivo por el cual se eligió para evaluar la interacción de los cuatro isoprenoides con la proteína E de ZIKV, obteniendo energías libres de unión favorables para todos los compuestos (tabla 1), a través de la formación de interacciones hidrofóbicas (figura 14).

El control utilizado para evaluar la interacción de la proteína de envoltura de ZIKV fue la Suramina, identificándose una energía de unión favorable (tabla 1 y figura 14). Similar a los resultados obtenidos en este trabajo, previamente se evaluó la interacción de Suramina con la proteína E de ZIKV, obteniéndose una afinidad de unión de -217.63 kcal/mol, mediante herramientas bioinformáticas, con un sitio de la proteína cerca del bucle de fusión y mediante la simulación por dinámica molecular se reveló que solo interactúa el extremo aniónico de la Suramina con la proteína E de ZIKV con energía libre de unión de -32.9 kcal/mol [205].

Por otra parte, las herramientas bioinformáticas han sido utilizadas para identificar antivirales dirigidos a proteínas no estructurales de ZIKV [125], como es el caso del dominio RdRp de NS5 de ZIKV [309], el cual es necesario para la síntesis de nuevas cadenas de RNA viral [87]. Al evaluar *in silico* la interacción de los cuatro isoprenoides con el dominio RdRp de NS5 de ZIKV se obtuvieron energías libres de unión favorables para todos los compuestos (tabla 2). Para esta proteína viral se utilizó como control la Ribavirina, dado que es un análogo de nucleósido que inhibe la replicación de ZIKV [210], evidenciando que esta molécula interactuó con una afinidad de unión de favorable con NS5 de ZIKV (Dominio RdRp) (Tabla 2 y figura 17).

A pesar de los resultados obtenidos *in silico* para las proteínas E y NS5 de ZIKV, los isoprenoides nos demostraron un efecto antiviral sobre etapas posteriores a la entrada de ZIKV (figura 8) o un efecto virucida (figura 7), lo que reitera, que a pesar de obtener resultados favorables mediante herramientas bioinformáticas, es necesario confirmar la actividad biológica de los compuestos usando metodología *in vitro* e *in vivo* [136].

### **Consideraciones finales**

En un contexto clínico, el potencial antiviral de los isoprenoides contra estos arbovirus mediante la estrategia de tratamiento antes de la infección, sugiere que estos compuestos podrían usarse como tratamiento preventivo, en el caso de viajeros a áreas epidémicas e individuos que conviven con pacientes infectados por alguno de estos arbovirus [325] [326], previniendo la transmisión, incluyendo la vía vertical [326], así como los signos y síntomas propios de cada enfermedad [327] [328]; especialmente, para poblaciones con mayor riesgo de infección (recién nacidos expuestos, adultos mayores o infectados con afecciones subyacentes) [329]. Dado que estos arbovirus co-circulan en áreas geográficas y comparten el mismo vector, un antiviral con actividad contra dos o más arbovirus permitiría el control de co-infecciones que pueden asociarse a mayor severidad de la enfermedad [129]. No obstante, esta estrategia terapéutica es sensible al tiempo, ya que la eficacia disminuye a medida que la enfermedad progresa [330].

Una vez la persona está infectada, el tratamiento entre las 48 y 72 horas del inicio de la fiebre, permitiría reducir la carga viral y la gravedad de la enfermedad [325]. Sin embargo, las personas con enfermedad febril suelen automedicarse y posponer la consulta médica hasta etapas posteriores de la enfermedad, en que la fase virémica ha pasado [325]; por lo que en este punto el tratamiento posterior a la infección sería una estrategia útil para controlar la diseminación viral y la evolución a formas graves (dengue grave), complicaciones (como síndrome de Guillain-Barré y microcefalia en el caso de la enfermedad del Zika [328] o el desarrollo de la fase crónica (artritis o artralgia, en el caso de la enfermedad causada por Chikungunya [327], que podrían estar asociadas con la gravedad de la fase aguda de la enfermedad [62, 331].

Se ha sugerido que el medicamento ideal contra una infección viral sería virucida; puesto que provocan

la inactivación directa e irreversible del inóculo viral o la progenie viral; sin interactuar con factores celulares, siendo la toxicidad celular asociada a su uso la principal limitante en esta estrategia [332]. La búsqueda de compuestos virucidas se ha enfocado, principalmente, en el control de la transmisión viral a través del uso de soluciones desinfectantes o transmisión por contacto sexual [333], como en el caso de ZIKV [334]. En este sentido, se demostró previamente *in vitro* e *in silico* el potencial de nanopartículas de oro recubiertas con ligandos que contienen ácido undecanesulfónico para imitar proteoglicanos del heparan Sulfato (receptor celular), provocando deformación de la partícula viral irreversible de DENV, HSV, virus de papiloma humano (HPV) y virus sincitial respiratorio (RSV), sin provocar un efecto citotóxico, e *in vivo* previnieron la diseminación de la infección por RSV en ratones infectados [332]. Además, se reportó que CLR01 inhibió mediante la estrategia virucida la infección por ZIKV en células derivadas del tracto anogenital y el sistema nervioso central, y se mantuvo antiviralmente activo en presencia de semen, saliva, orina y líquido cefalorraquídeo [319]. Todo lo anteriormente mencionado, evidencia la relevancia en un contexto clínico de las estrategias antivirales implementadas en este trabajo.

### **Conclusiones**

Los cuatro isoprenoides evaluados en este estudio demostraron potencial antiviral *in vitro* contra DENV-2, CHIKV y/o ZIKV, validando la hipótesis formulada al inicio de este trabajo. Alfa-Espinasterol inhibió las cepas DENV-2/NG y DENV-2/16681 mediante un posible efecto virucida, a DENV-2/NG mediante el tamizaje antiviral, y a ZIKV/Col en etapas iniciales del ciclo replicativo. Estigmasterol, por su parte, ejerció un efecto virucida contra la cepa DENV-2/16681 e inhibió ZIKV/Col y CHIKV/ACol en etapas tempranas del ciclo replicativo en células VERO y U937. Por otro lado, Lupeol demostró un posible efecto virucida contra DENV-2/NG y DENV-2/16681, afectó múltiples etapas del ciclo replicativo de CHIKV, en un efecto dependiente de línea celular e inhibió etapas iniciales del ciclo replicativo de ZIKV/Col. Finalmente, Friedelina demostró un potencial virucida contra DENV-2/NG y CHIKV/ACol.

Finalmente, el efecto antiviral de los isoprenoides fue dependiente de línea celular, modelo viral y cepa infectante. Este es el primer trabajo que reporta actividad antiviral del Alfa-Espinasterol y Friedelina. El Lupeol, por su parte, demostró actividad contra todos los virus evaluados, mediante las diferentes estrategias usadas, por lo que es el isoprenoide con potencial antiviral más promisorio de este trabajo, justificando una continuación del estudio de su actividad antiviral, que permitan dilucidar con mayor claridad su mecanismo de acción contra CHIKV, ZIKV y DENV-2. Además, la metodología *in silico* es una herramienta de apoyo útil para el estudio de antivirales.

### **Perspectivas y limitaciones**

Estudios posteriores permitirán identificar el potencial antiviral de los isoprenoides contra los cuatro serotipos de DENV (DENV-1 a DENV-4). Además, se podría evaluar el efecto antiviral de Alfa-Espinasterol, Lupeol y Estigmasterol sobre las etapas de adsorción, internalización y fusión de ZIKV y CHIKV. Sumado a lo anterior, el uso de técnicas de metabolómica podría ayudar a dilucidar con mayor claridad el mecanismo antiviral dependiente de línea celular. Adicionalmente, se podría evaluar el efecto antiviral de los isoprenoides que demostraron potencial antiviral en otras líneas celulares o cultivos primarios como monocitos o macrófagos (cultivos primarios) y en la línea celular SH- SY5Y, especialmente, en el caso de ZIKV.

La principal limitación del trabajo fue la cantidad de compuesto disponible para los ensayos antivirales

*in vitro*, que impidieron el cálculo de la concentración efectiva 50 (CE50) e índice de selectividad, dado que la actividad antiviral se evaluó con una única concentración de cada compuesto. Además, y por esta misma causa, no se pudieron utilizar estrategias antivirales adicionales que permitieran dilucidar con mayor claridad el mecanismo de acción de los isoprenoides (tales como ensayos de adhesión e internalización). Con relación a la metodología *in silico*, no se evaluó la interacción de los cuatro isoprenoides con otras proteínas virales como NS3 de DENV y ZIKV, y NSP4 de CHIKV, que pudieran estar siendo afectadas por el tratamiento con estos compuestos.

**Tabla 1: Energía libre de unión obtenidas mediante docking molecular. y la proteína ENV de DENV, ZIKV y CHIKV, obtenidas por docking molecular.**

Proteína blanco	Sitio de unión (Basado en PeptiMap)	Ligando	Kcal/mol	Puentes de Hidrógeno	Menor Distancia Puente de H (Å)	Aminoácidos en Puentes de Hidrógeno
<b>DENV</b>	Met301, Lys334, Ile335, Pro336, Phe337, Glu338, Leu351, Val354, Asn355, Pro356	Alfa- Espinasterol	-5.9	0	No aplica	No aplica
		Lupeol	-6.8	0	No aplica	No aplica
		Estigmasterol	-6.0	2	2,96	Gln386(*2)
		Friedelina	-6.7	0	No aplica	No aplica
		Suramina	-7.8	4	3,11	Phe337, Gln386*2, Glu338
<b>CHIKV</b>	Arg13, Tyr15, Leu16, Ala17, His18, His29, Met70, Pro173, Asp174, Thr175, Gln236, Leu241, Val242, Pro243	Alfa- Espinasterol	-6.8	0	No aplica	No aplica
		Lupeol	-8.0	0	No aplica	No aplica
		Estigmasterol	-6.6	0	No aplica	No aplica
		Friedelina	-8.2	0	No aplica	No aplica
		Suramina	-8.0	1	3,27	Ala246
<b>ZIKV</b>	Pro39, Thr40, Val143, His144, Gly145, Ser146, Phe183, Leu300, Thr360, Ala361, Asn362, Pro363, Val364, Met374	Alfa- Espinasterol	-5.3	0	No aplica	No aplica
		Lupeol	-5.6	1	3,11	Ile1
		Estigmasterol	-6.1	0	No aplica	No aplica
		Friedelina	-6.5	0	No aplica	No aplica
		Suramina	-8.8	13	2,97	Ile1, Arg2(*2), Gly5, Asn163, Ly373(*2), Glu162, Thr366, Arg164, Val6, Cys3, Ile4

Resultados obtenidos de la interacción entre las proteínas ENV (envoltura) de DENV, ZIKV y CHIKV con los 4 compuestos isoprenoides, por docking molecular. La tabla incluye el sitio de unión de la proteína blanco elegido para la interacción, basado en la herramienta PeptiMap, las energías libres de interacción en Kcal/mol del mejor complejo de acoplamiento, el número de puentes de Hidrógeno de la interacción, aminoácidos involucrados en este tipo de enlace, y menor distancia de los puentes de Hidrógeno formados entre las proteínas y los isoprenoides.

Tabla 2: Energía libre de unión de las proteínas no estructurales de CHIKV, ZIKV y DENV y los compuestos isoprenoides, obtenidas mediante docking molecular.

Proteína blanco	Sitio de unión (Basado en PeptiMap)	Ligando	Kcal/mol	Puentes de Hidrógeno	Menor Distancia Puente de H (Å)	Aminoácidos en Puentes de Hidrógeno
<b>NS5 DENV</b>	Arg279, Trp302, Ser317, Met340, Gly508, Glu509, Gly510, Leu511, His512, Ala799	Alfa-Espinasterol	-7.9	3	2,86	Ser661, Asp663(*2)
		Lupeol	-8.5	1	3,22	Thr794
		Estigmasterol	-8.1	3	2,77	Trp477, Arg481, Gly601
		Friedelina	-9.6	0	No aplica	No aplica
		Ribavirina	-6.1	6	2,72	Ser600, Gln602(*2), Gly601, Arg481, Trp477
<b>NSP2 CHIKV</b>	Asn1011, Cys1013, Trp1014, Ala1046, Tyr1047, Ser1048, Pro1049, Glu1050, Val1051, Asn1054, Leu1065, Val1077, Tyr1079, Asn1082, His1083, Trp1084, Lys1091, Glu1204, Leu1205	Alfa-Espinasterol	-7.1	0	No aplica	No aplica
		Lupeol	-7.2	0	No aplica	No aplica
		Estigmasterol	-7.4	1	3,21	Tyr1079
		Friedelina	-7.8	0	No aplica	No aplica
		Ribavirina	-6.0	7	2,87	Tyr1047, Asp1246, Met1242, Trp1084, Gln1241,
<b>NS5 ZIKV</b>	Arg542, Ile543, Asn612, Thr615, Asn616, Val619, Gln620, Gly664, Asp665, Leu683, Lys688	Alfa-Espinasterol	-6.4	0	No aplica	No aplica
		Lupeol	-8.1	3	2,78	Asp665, Aps666, Ser663
		Estigmasterol	-6.6	2	3,18	Asp665, Aps666
		Friedelina	-8.0	0	No aplica	No aplica
		Ribavirina	-5.9	7	2,75	Ser798, Asp665, Asn612, Thr608

Resultados obtenidos de la interacción entre las proteínas NS5 de DENV y ZIKV, y NSP2 de CHIKV con los 4 compuestos isoprenoides, por docking molecular. La tabla incluye el sitio de unión de la proteína blanco elegido para la interacción, basado en la herramienta PeptiMap, las energías libres de interacción en Kcal/mol del mejor complejo de acoplamiento, el número de puentes de Hidrógeno de la interacción, aminoácidos involucrados en este tipo de enlace, y menor distancia de los puentes de Hidrógeno formados entre las proteínas y los isoprenoides.

**Tabla 3: Evaluación de la citotoxicidad de los 4 isoprenoides en las líneas celulares U937 y A549.**

Compuesto	Concentración (µM)	U937		A549	
		Viabilidad (%)	EE (%)	Viabilidad (%)	EE (%)
Control sin compuesto	0,0	100,0	1,3	100,2	1,1
Suramina	250,0	102,9	3,8	117,0	6,1
Heparina	20,0	91,7	1,8	92,9	4,2
Ribavirina	200,0	89,8	2,3	87,5	2,1
Alfa-Espinasterol	7,6	79,2	1,4	90,7	1,3
Lupeol	7,3	76,5	1,0	92,7	1,9
Estigmasterol	7,6	83,1	1,8	91,6	2,3
Friedelina	7,3	88,0	1,5	95,4	1,7

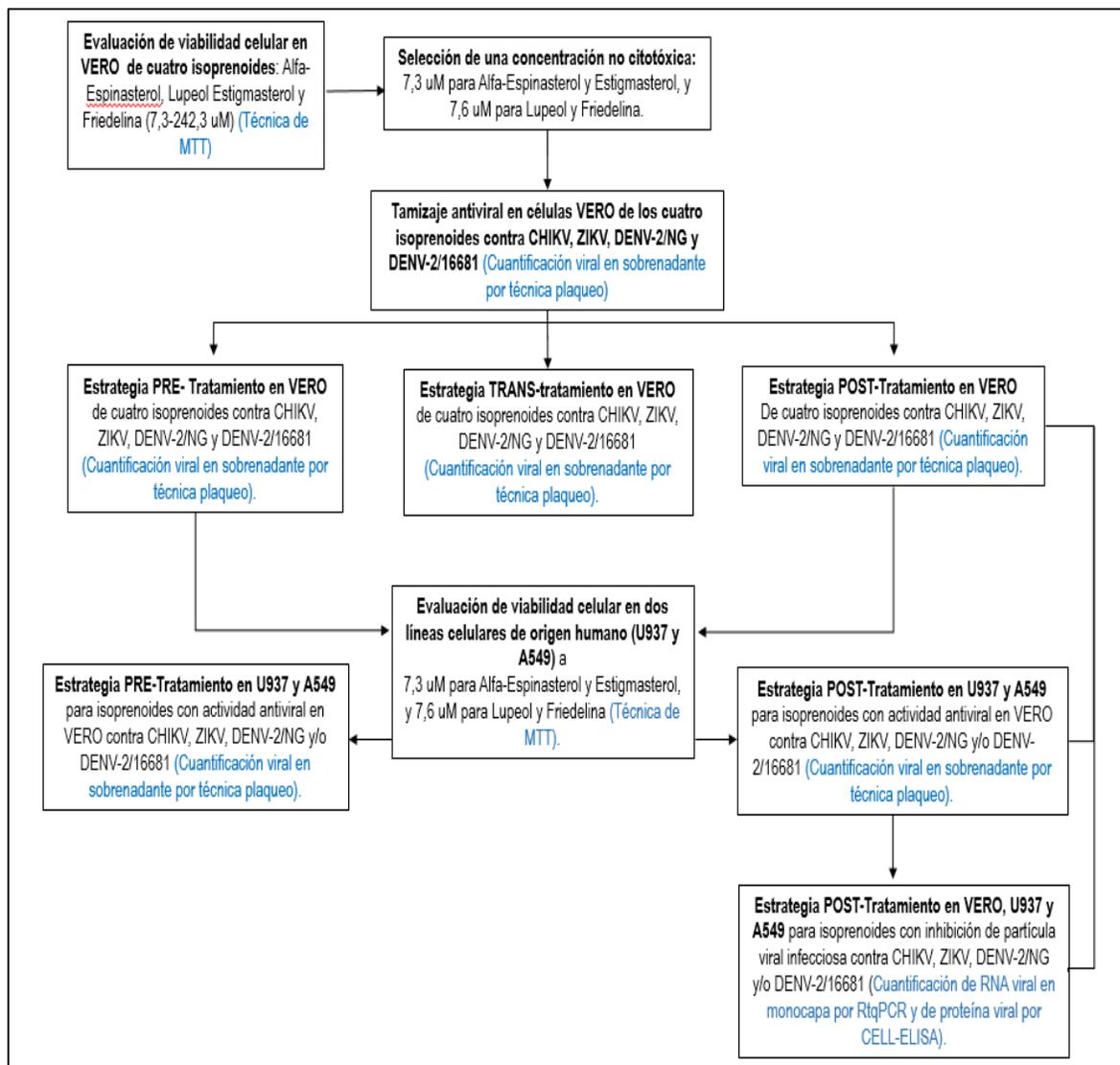
Porcentaje de viabilidad en líneas celulares humanas U937 y A549, durante 48h en presencia de los compuestos Alfa-Espinasterol, Lupeol, Estigmasterol, y Friedelina a las concentraciones usadas en las estrategias antivirales. Los controles positivos Suramina, Heparina y Ribavirina también fueron evaluados. EE: Error Estándar. Los porcentajes de viabilidad fueron calculados comparando la media de la absorbancia de las células expuestas a cada compuesto, respecto al control sin compuesto.

**Tabla 4: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la envoltura de las cepas DENV-2/NG y DENV-2/16681.**

<b>Posición aminoacídica</b>	<b>112</b>	<b>120</b>	<b>124</b>	<b>126</b>	<b>454</b>	<b>478</b>
<b>DENV-2/ NG (AB609589)</b>	G	T	N	E	T	S
<b>DENV-2/ NG (MS6)</b>	S*	T	I*	K*	A*	S
<b>DENV-2/16681 (NC 001474)</b>	G	R	N	E	T	T
<b>DENV-2/16681 (MS5)</b>	G*	R	N*	E*	T*	T

Resultados obtenidos del alineamiento múltiple en MEGA X (método Clustal W) de los fragmentos del gen de la envoltura de las cepas utilizadas en este trabajo DENV-2/NG (MS6) y DENV-2/16681 (MS5), y dos secuencias de referencia de ambas cepas obtenidas en la base de datos de nucleótidos de NCBI (DENV-2/ NG, ID de secuencia: AB609589) y DENV-2/16681 (ID de secuencia: NC 001474). La tabla describe los cambios aminoacídicos en las secuencias comparadas (secuencias de 435 aminoácidos). El asterisco indica las mutaciones no sinónimas identificadas entre las cepas DENV-2/NG y DENV-2/16681 usadas en este trabajo para la evaluación de la actividad antiviral de los isoprenoides.

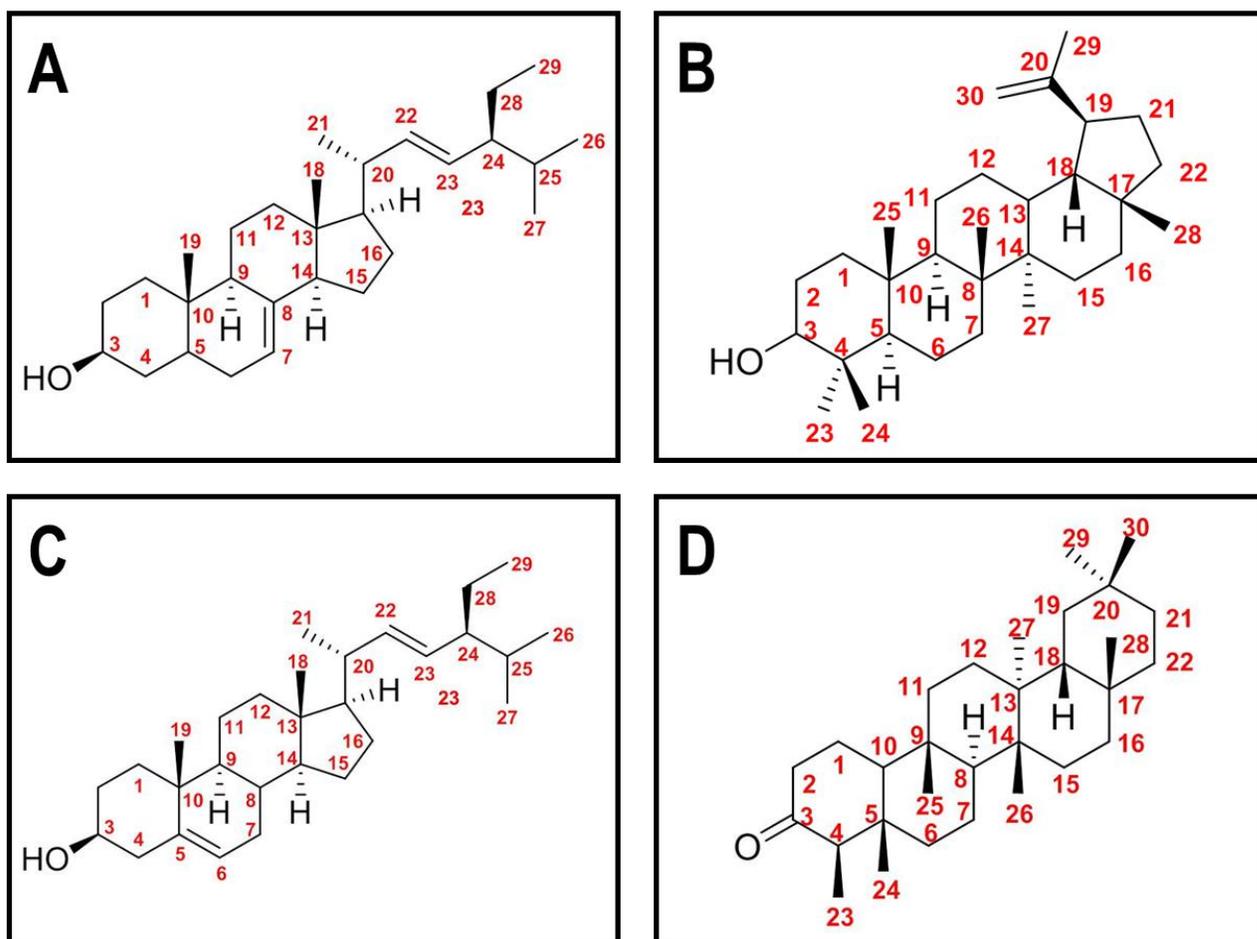
**Figura 1**



**Flujograma de metodología *in vitro* implementada para evaluar actividad antiviral de cuatro isoprenoides contra CHIKV, ZIKV, DENV-2/NG y DENV-2/16681.** Inicialmente, se evaluó la viabilidad celular en la línea celular VERO usando concentraciones de 7,3 a 242,3 uM de cuatro isoprenoides (Alfa-Espinasterol, Lupeol, Estigmasterol y Friedelina por técnica de MTT). Posteriormente, se seleccionó una concentración no citotóxica (7,3 uM para Alfa-Espinasterol y Estigmasterol, y 7,6 uM para Lupeol y Friedelina), para evaluar el efecto antiviral de los compuestos. Se realizó un tamizaje antiviral de los cuatro isoprenoides en células VERO contra CHIKV, ZIKV/Col, DENV-2/NG y DENV-2/16681, cuantificando en sobrenadante el número de partícula viral infecciosa por ensayo de plaqueo. Después, se evaluó la actividad antiviral de los cuatro isoprenoides en VERO contra CHIKV, ZIKV/Col, DENV-2/NG y DENV-2/16681, mediante las estrategias PRE- tratamiento, TRANS-tratamiento y POST-tratamiento, cuantificando en sobrenadante el número de partícula viral

infecciosa por ensayo de plaqueo. Además, se evaluó la viabilidad celular de U937 y A549 de los cuatro isoprenoides a concentración no citotóxica, por técnica de MTT, para luego evaluar en estas dos líneas celulares humanas, la actividad antiviral de los isoprenoides con actividad antiviral mediante las estrategias de PRE- tratamiento y POST-tratamiento en VERO, cuantificando en sobrenadante las partículas virales infecciosas por ensayo de plaqueo. Finalmente, se cuantificó RNA viral por RT-qPCR y proteína viral por CELL-ELISA en monocapas de VERO, U937 y A549 tratadas después de la infección con CHIKV, ZIKV, DENV-2/NG y/o DENV-2/16681 con los isoprenoides que inhibieron en sobrenadante el número de partículas virales infecciosas.

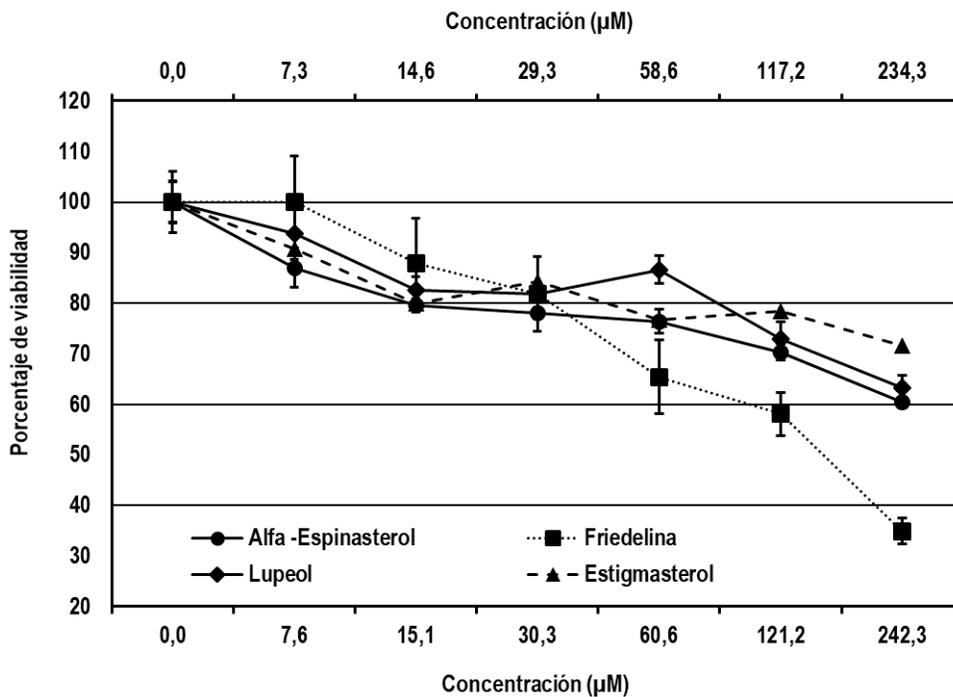
Figura 2



**Estructura química de compuestos isoprenoides**

A. Alfa-Espinasterol. B. Lupeol. C. Estigmasterol. D. Friedelina. En color rojo se enumeran los carbonos que conforman los isoprenoides.

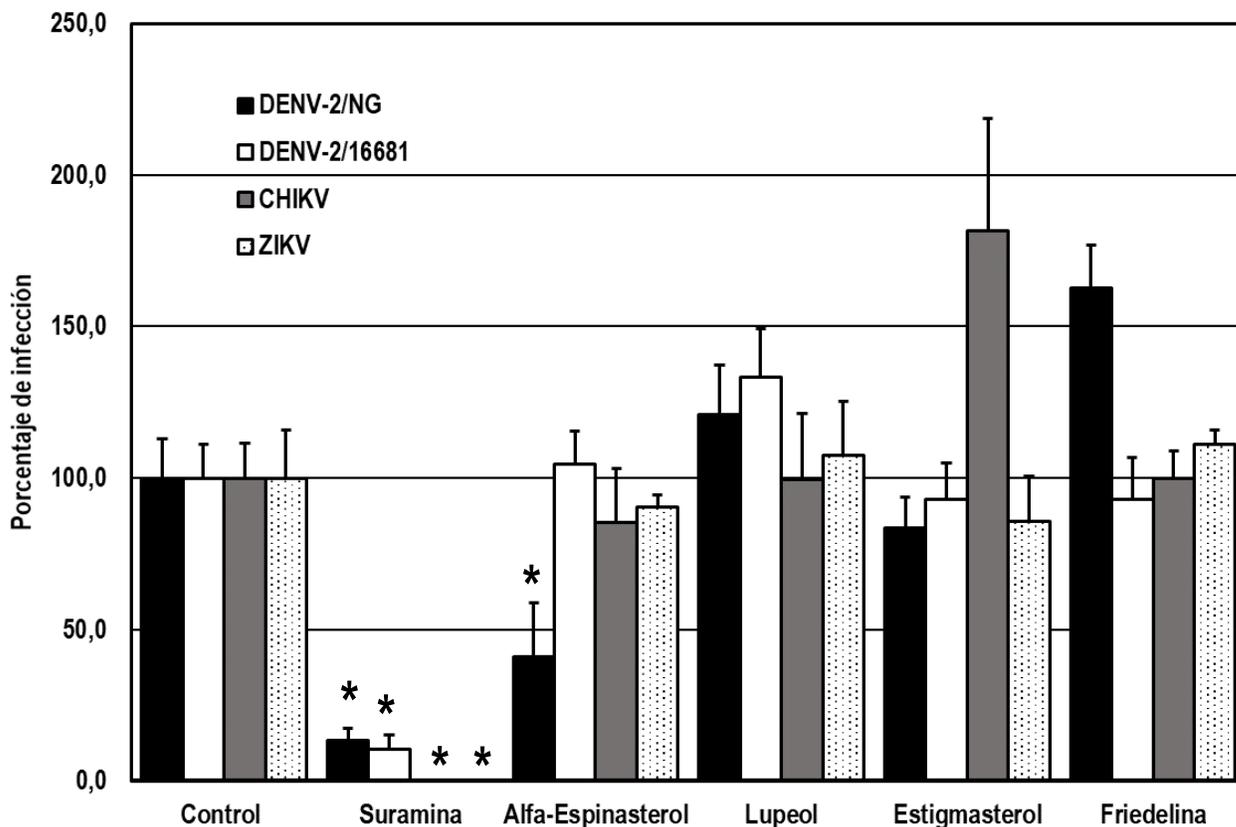
Figura 3



#### Evaluación de la citotoxicidad de 4 compuestos isoprenoides en células VERO.

La gráfica representa el porcentaje de viabilidad en línea celular VERO en presencia de los compuestos isoprenoides Alfa-Espinasterol, Lupeol, Estigmasterol y Friedelina, durante 48 h. Las concentraciones de 7,3 μM a 234,3 μM corresponden a los compuestos Lupeol y Friedelina y las concentraciones de 7,6 a 242,3 μM corresponden a los compuestos Alfa-Espinasterol y Estigmasterol. Los porcentajes de viabilidad fueron calculados comparando la media de la absorbancia de las células expuestas a cada compuesto, respecto al control sin compuesto.

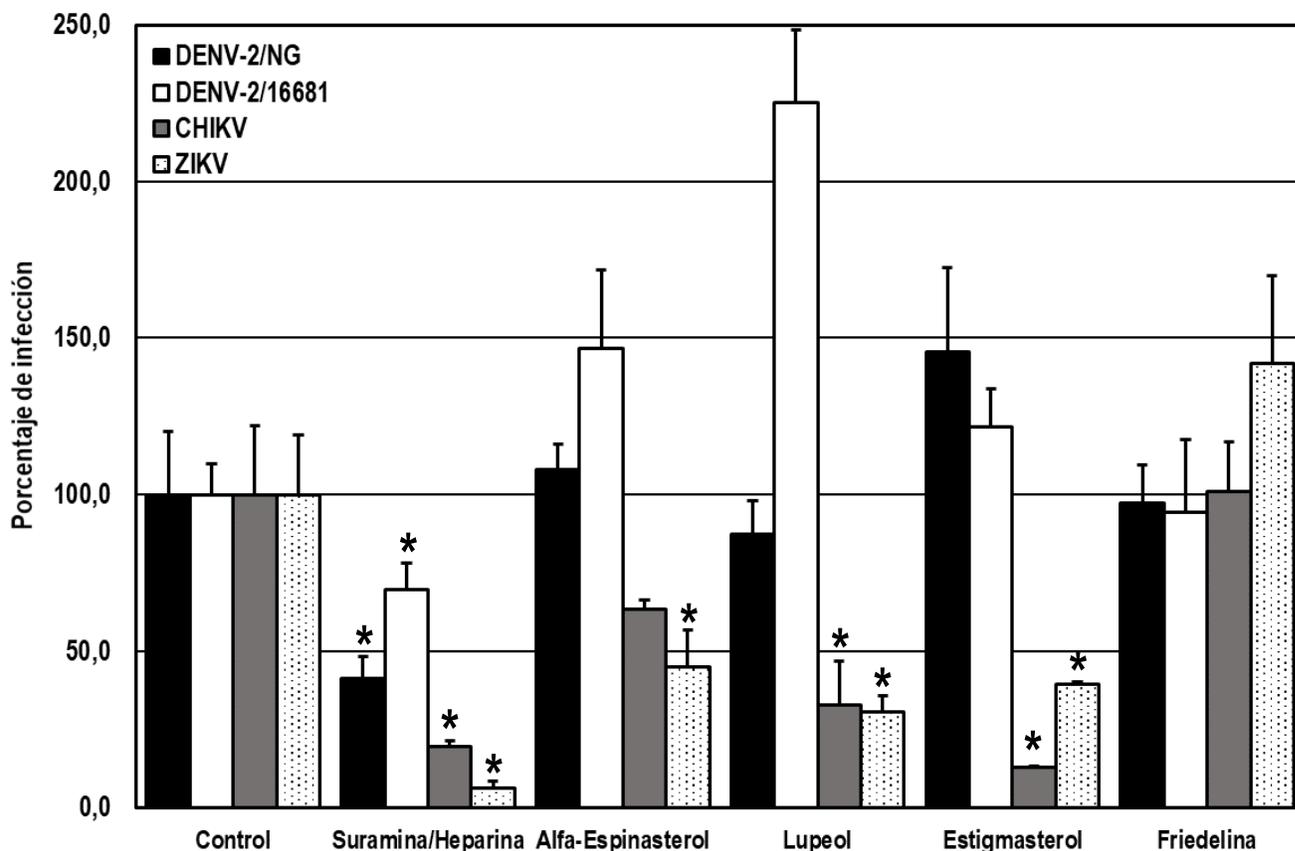
Figura 4



**Evaluación de la actividad antiviral de los cuatro isoprenoides contra DENV-2/NG, DENV-2/16681, CHIKV y ZIKV mediante tamizaje antiviral en células VERO**

La gráfica representa los porcentajes de infección obtenidos de la cuantificación por técnica de plaqueo de los sobrenadantes obtenidos del tamizaje antiviral de los cuatro isoprenoides contra DENV-2/NG, DENV-2/16681, CHIKV/ACol y ZIKV/Col (MOI 1) durante 48h en VERO. Suramina se utilizó como control de inhibición de la estrategia. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas respecto al control de células infectadas sin tratamiento ( $p < 0.05$ ; *t*-Student).

Figura 5

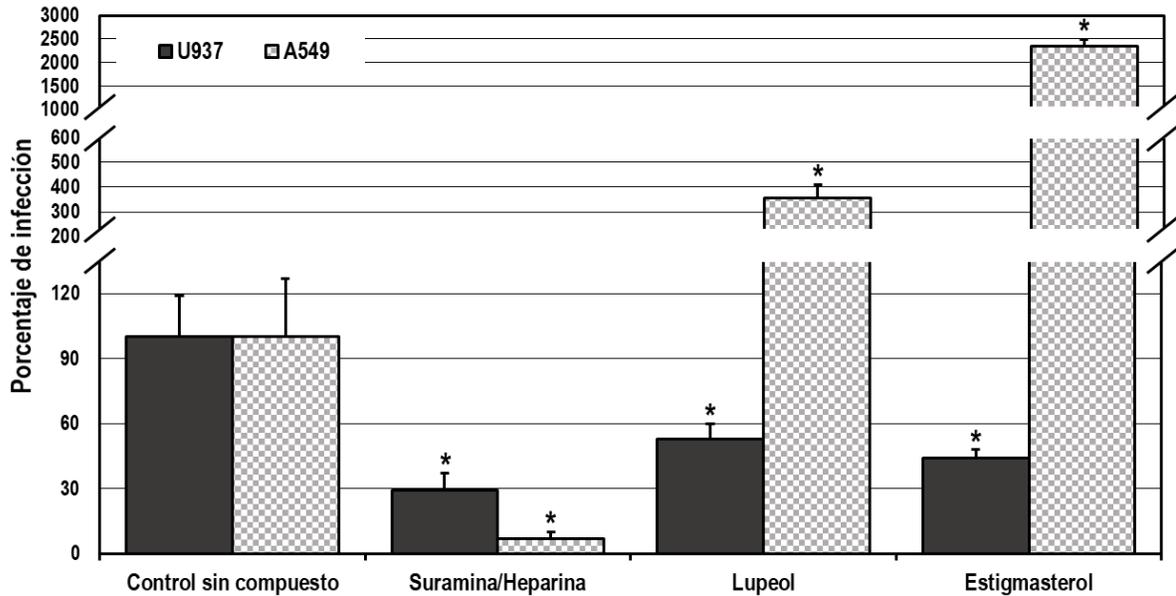


**Evaluación de la actividad antiviral de los cuatro isoprenoides contra DENV-2/NG, DENV-2/16681, CHIKV y ZIKV, mediante estrategia de PRE-tratamiento en células VERO.**

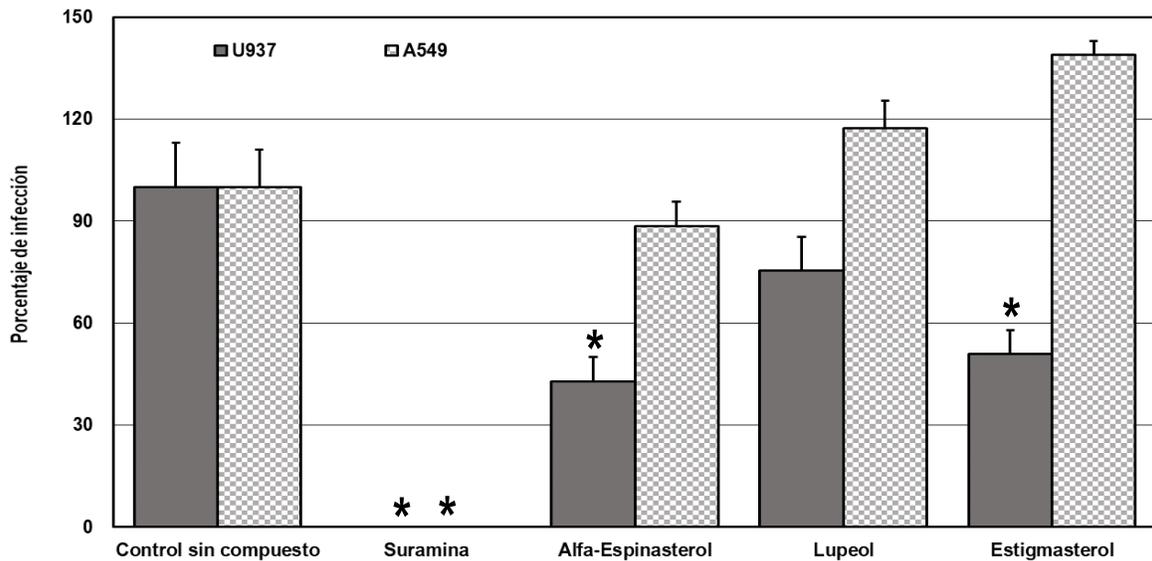
Porcentajes de infección obtenidos por técnica de plaqueo de sobrenadantes recolectados de la estrategia de PRE- tratamiento de células VERO con los cuatro isoprenoides contra DENV-2/NG, DENV-2/16681, CHIKV/ACol y ZIKV/Col (MOI 1). Suramina y Heparina fueron utilizadas como controles de inhibición de la estrategia. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas respecto al control de células infectadas sin tratamiento ( $p < 0.05$ ; *t*-Student).

Figura 6

**A**



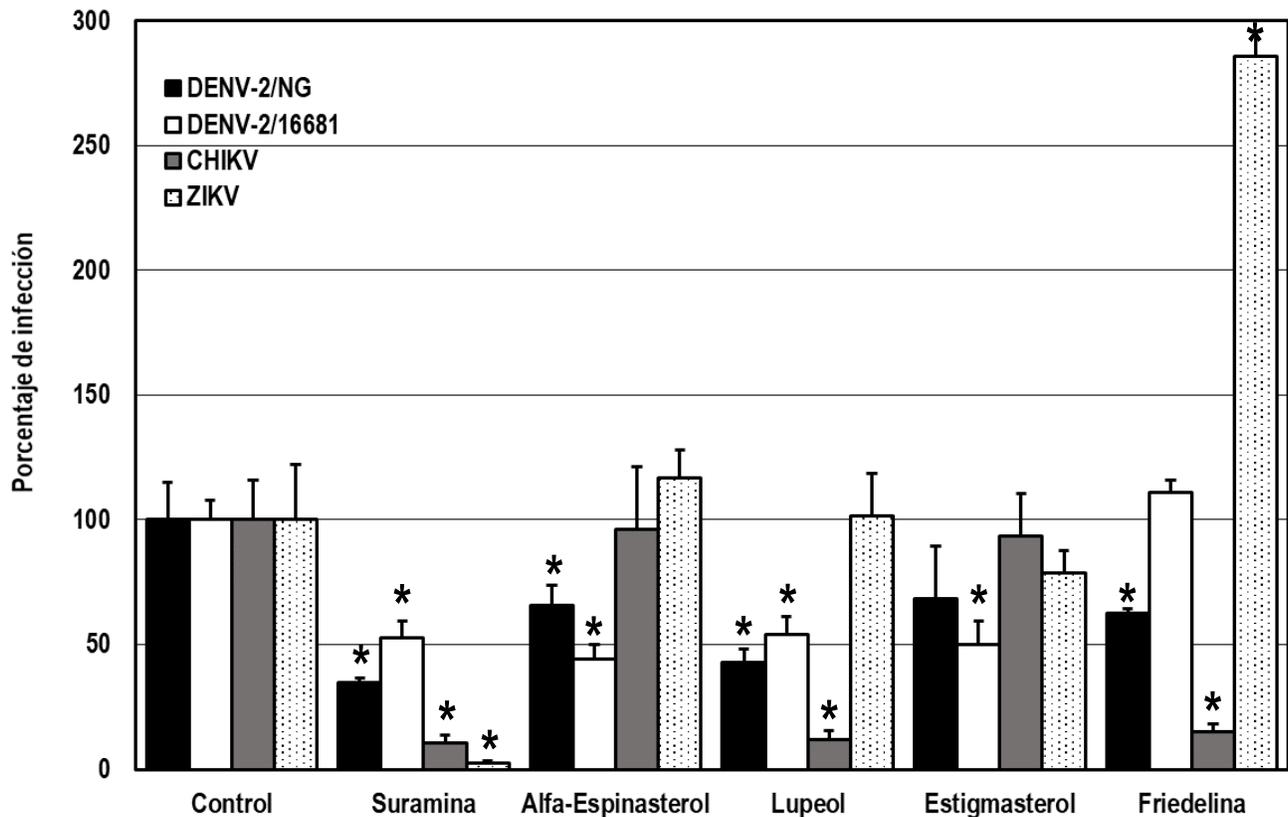
**B**



**Evaluación de la actividad antiviral de Lupeol y Estigmasterol contra CHIKV y ZIKV en dos modelos celulares humanos (U937 y A549), mediante la estrategia de PRE- tratamiento.**

Porcentajes de infección obtenidos por técnica de plaqueo de sobrenadantes recolectados de la estrategia de PRE – tratamiento. **A.** Lupeol y Estigmasterol en células U937 y A549 con CHIKV/ACol (MOI 1). **B.** Alfa-Espinasterol, Lupeol y Estigmasterol en células U937 y A549 con ZIKV/Col (MOI 1). Suramina y Heparina fueron utilizadas como control de inhibición de la estrategia. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas respecto al control de células infectadas sin tratamiento ( $p < 0.05$ ; *t*-Student).

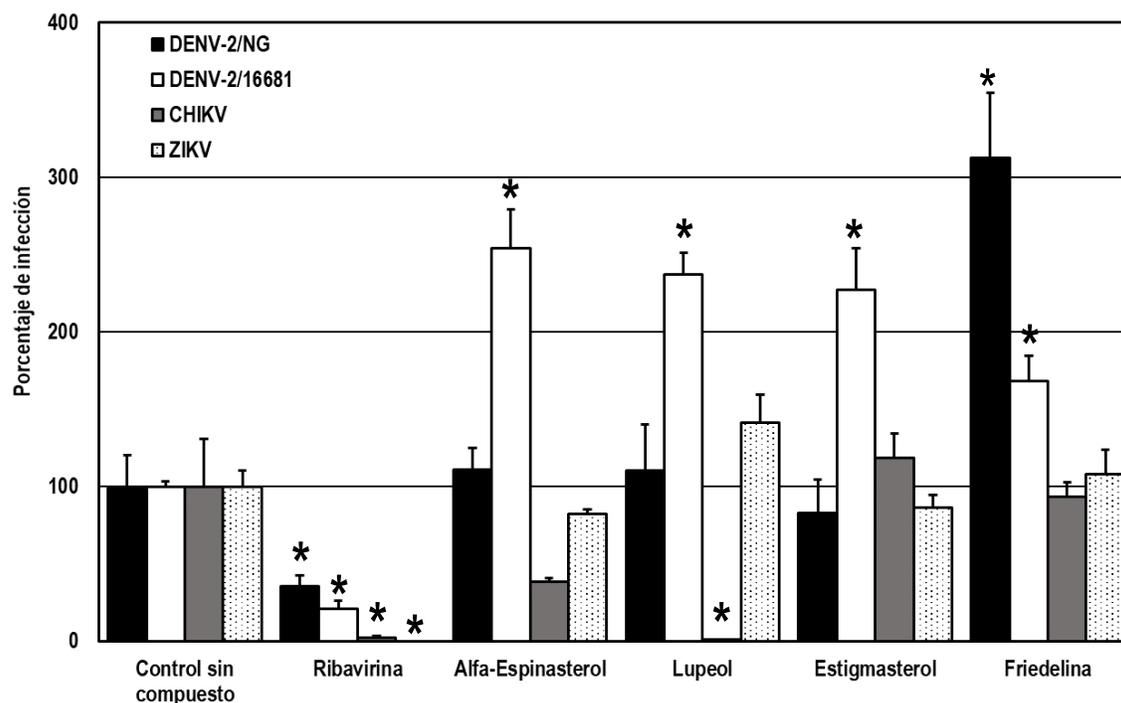
Figura 7



**Evaluación del efecto de cuatro compuestos isoprenoides contra DENV-2/NG, DENV-2/16681, CHIKV y ZIKV, mediante estrategia TRANS-tratamiento en células VERO.**

Porcentajes de infección obtenidos por técnica de plaqueo de sobrenadantes recolectados de la estrategia de TRANS-tratamiento con cuatro compuestos isoprenoides en células VERO infectadas con DENV-2/NG, DENV-2/16681, CHIKV/ACol y ZIKV/Col (MOI 1). Suramina fue utilizada como control de inhibición de la estrategia. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas respecto al control de células infectadas sin tratamiento ( $p < 0.05$ ; *t*-Student).

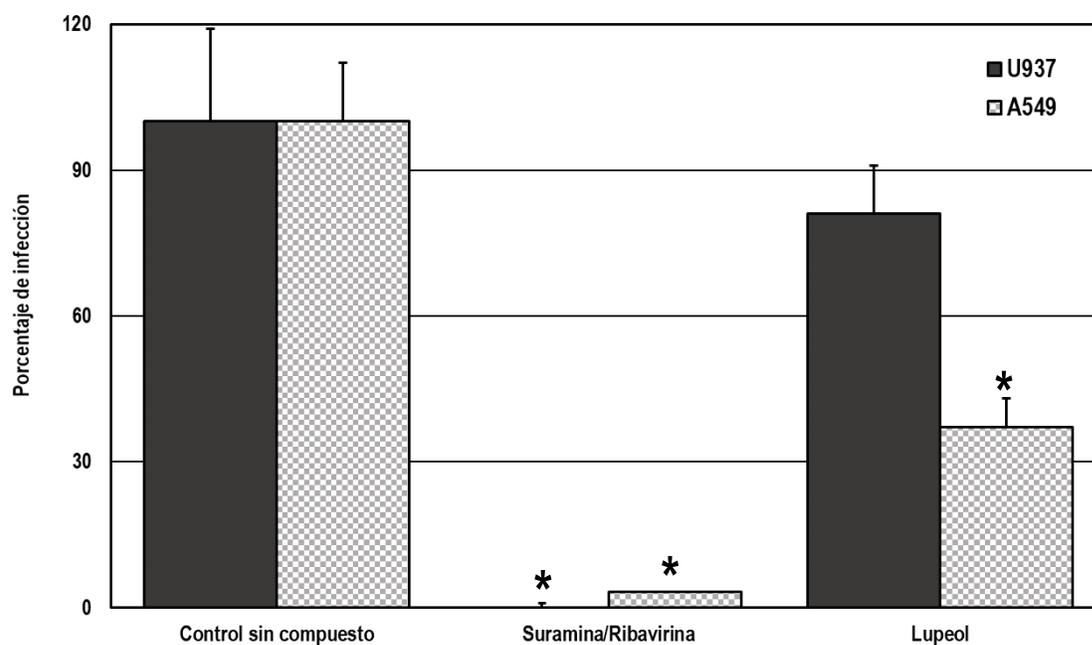
Figura 8



**Evaluación de la actividad antiviral de 4 compuestos isoprenoides contra DENV-2/NG, DENV-2/16681, CHIKV y ZIKV mediante estrategia POST-tratamiento en células VERO.**

Porcentajes de infección obtenidos por técnica de plaqueo de sobrenadantes recolectados de la estrategia de POST-tratamiento con cuatro compuestos isoprenoides en células VERO infectadas con DENV-2/NG, DENV-2/16681, CHIKV/ACol y ZIKV/Col (MOI 1). La Ribavirina fue usada como control de inhibición de la estrategia. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas respecto al control de células infectadas sin tratamiento ( $p < 0.05$ ; *t*-Student).

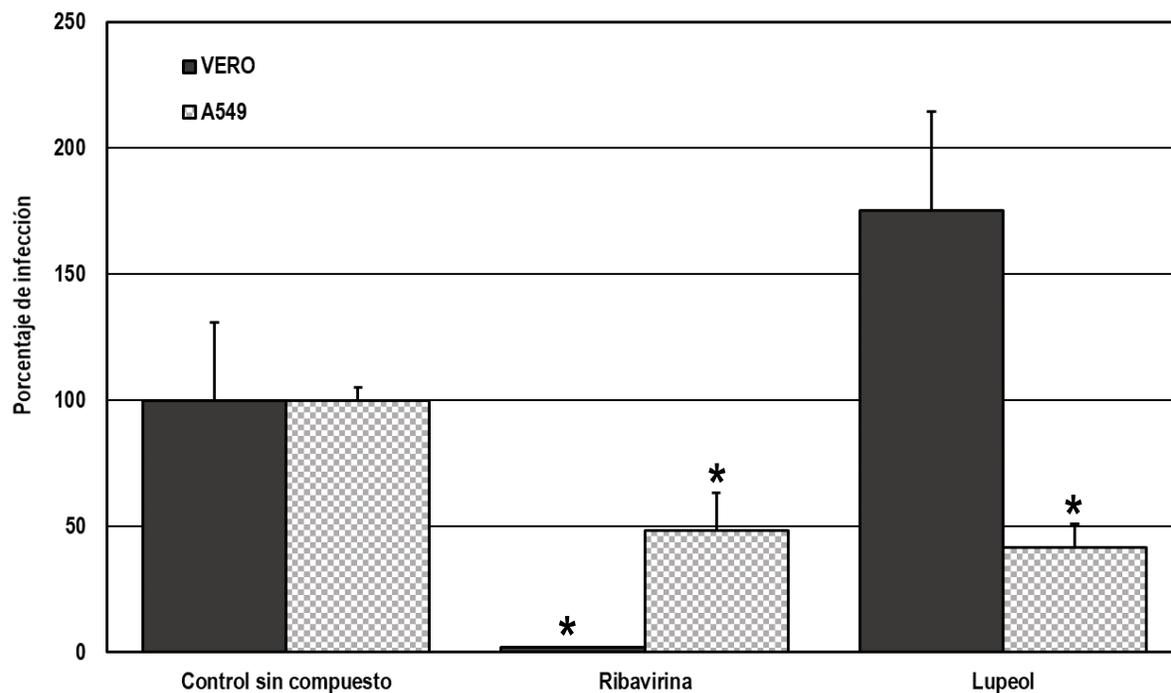
Figura 9



**Evaluación de la actividad antiviral del Lupeol contra CHIKV en etapas posteriores a la entrada del virus a las células U937 y A549**

Porcentajes de infección obtenidos por técnica de plaqueo de sobrenadantes recolectados de la estrategia POST-tratamiento con Lupeol en células U937 y A549 infectadas con CHIKV/ACol (MOI 1). La Suramina y la Ribavirina fueron utilizadas como control de inhibición de la estrategia. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas respecto al control de células infectadas sin tratamiento ( $p < 0.05$ ; *t*-Student).

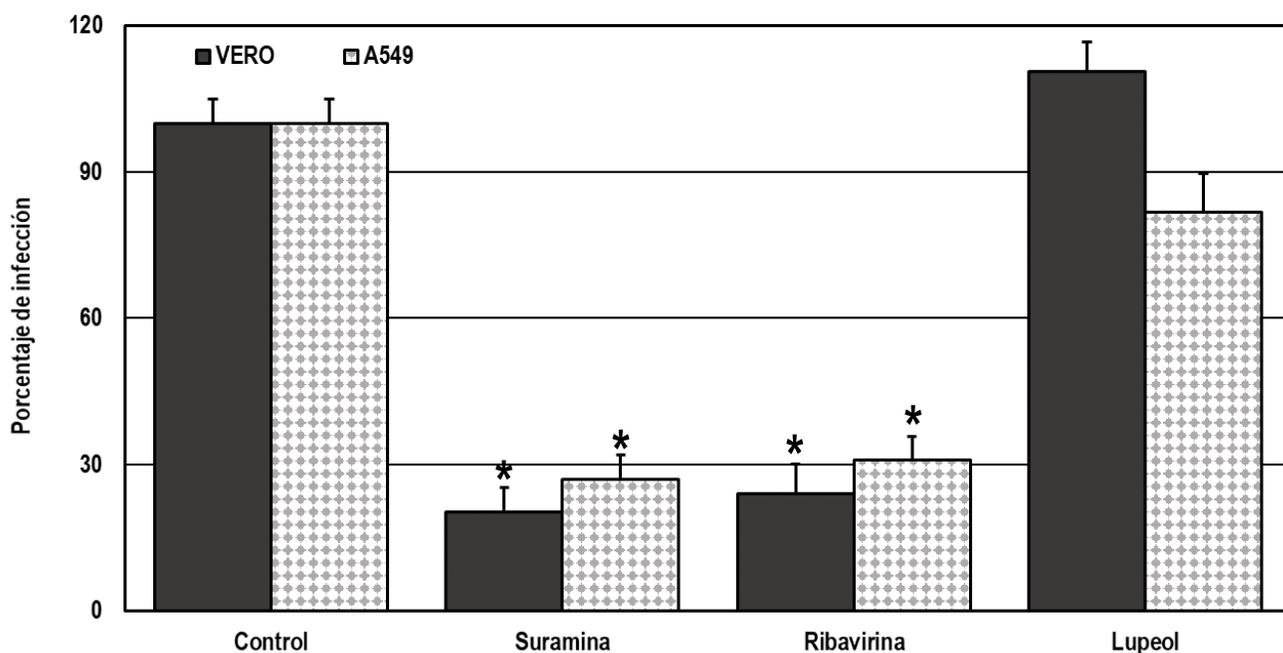
Figura 10



**Evaluación de la actividad antiviral del Lupeol contra la replicación de CHIKV en líneas celulares VERO y A549**

Porcentajes de infección obtenidos de la cuantificación por RT-qPCR del número de copias genómicas de CHIKV/ACol presentes en monocapas de VERO y A549 infectadas con CHIKV/ACol (MOI 1) y tratadas mediante estrategia de POST-tratamiento con Lupeol (48 h). Ribavirina fue utilizada como control de inhibición de la replicación viral. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas respecto al control de células infectadas sin tratamiento ( $p < 0.05$ ; *t*-Student).

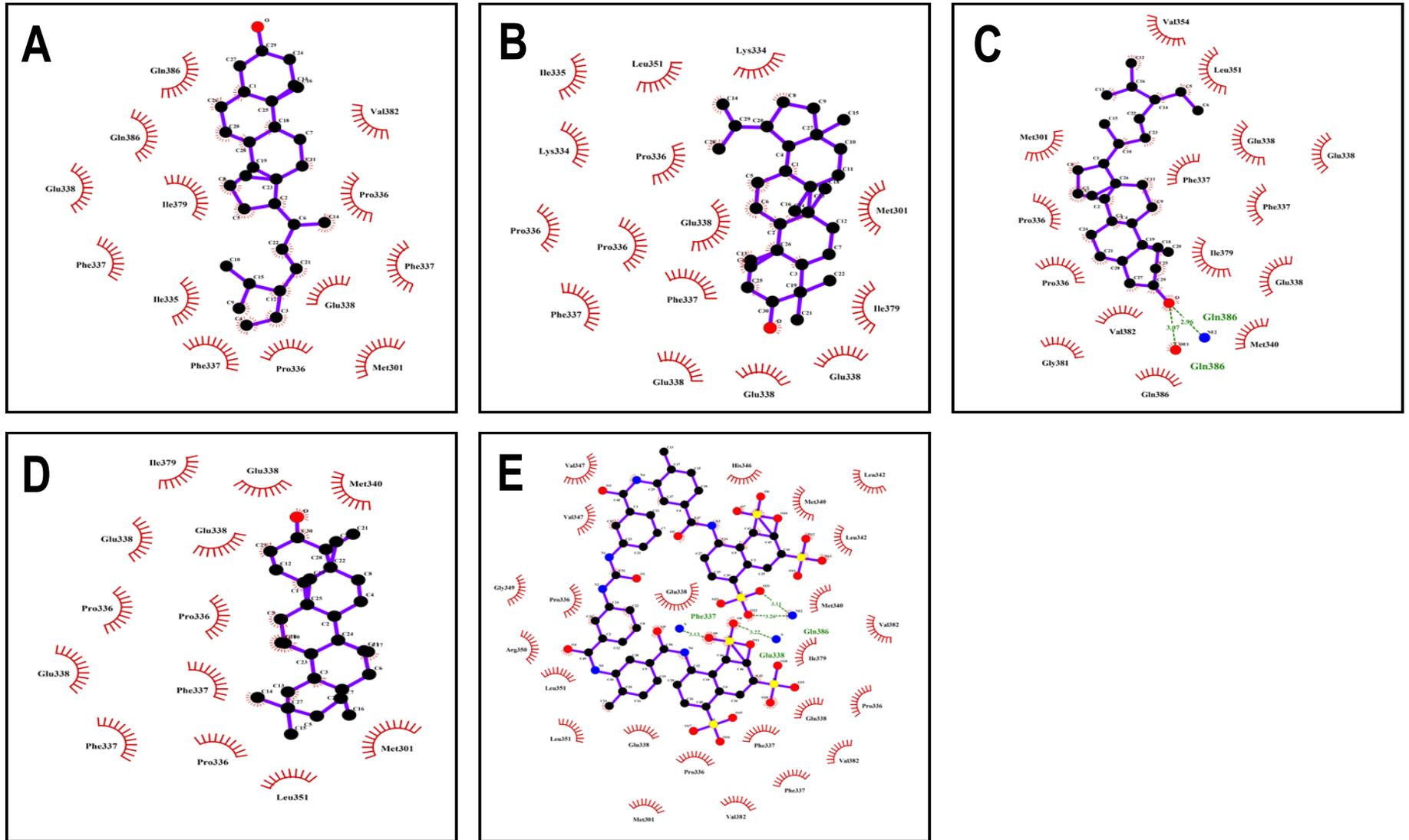
Figura 111



**Evaluación de la actividad antiviral del Lupeol contra la síntesis de proteínas de CHIKV en líneas celulares VERO y A549**

Porcentajes de infección obtenidos de la cuantificación de proteínas de CHIKV por ensayo de CELL-ELISA a partir de monocapas de VERO y A549 infectadas con CHIKV/ACol y tratadas con Lupeol mediante POST-tratamiento (24 h). La Suramina y Ribavirina fueron utilizadas como controles de inhibición de la estrategia. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas respecto al control de células infectadas sin tratamiento ( $p < 0.05$ ; *t*-Student).

Figura 12



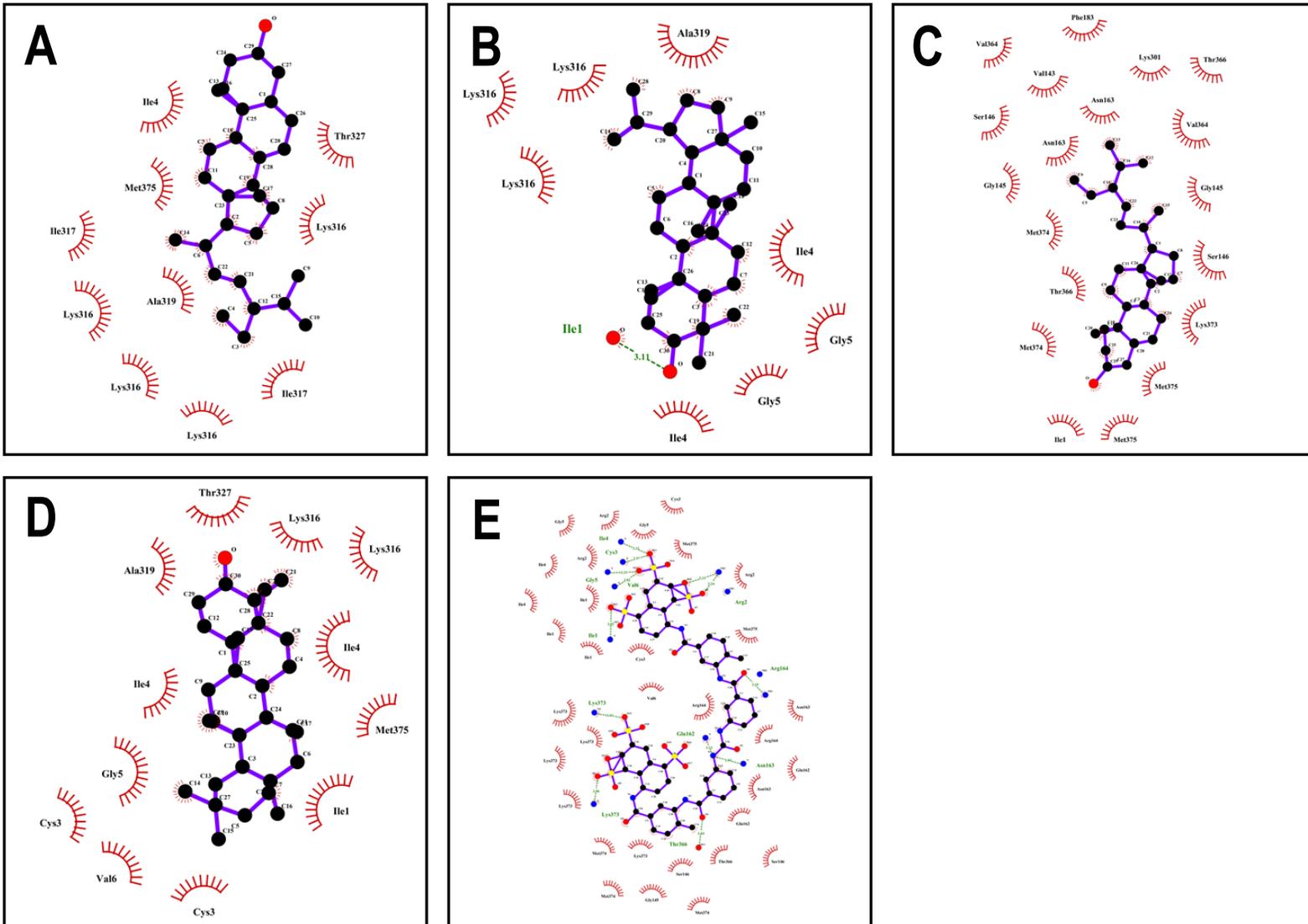
**Interacción *in silico* de la proteína E de DENV con los cuatro compuestos isoprenoides por docking molecular.** Se evaluó la interacción entre la proteína E de DENV con los cuatro isoprenoides por docking molecular, usando el software AutoDock Vina. Las imágenes corresponden a la representación en 2D, obtenida por LigPlot, de la interacción entre la proteína E de DENV con: **A.** Alfa-Espinasterol, **B.** Lupeol, **C.** Estigmasterol, **D.** Friedelina, **E.** Suramina. Los arcos de color rojo, corresponden a los aminoácidos presentes en la superficie del bolsillo de unión de la proteína E de DENV que formaron interacciones hidrofóbicas con los compuestos. En color verde, se representan los puentes de Hidrógeno ( Aminoácido de la proteína involucrado en la interacción y distancia del enlace). Los átomos se representan de color negro (Carbono), rojo (Oxígeno) y azul (Nitrógeno).



### **Interacción *in silico* de la proteína E de CHIKV con los cuatro compuestos isoprenoides por docking molecular.**

Se evaluó la interacción entre la proteína E de CHIKV con los cuatro isoprenoides por docking molecular, usando el software AutoDock Vina. Las imágenes corresponden a la representación en 2D, obtenida por LigPlot, de la interacción entre la proteína E de CHIKV con: **A.** Alfa-Espinasterol, **B.** Lupeol, **C.** Estigmasterol, **D.** Friedelina, **E.** Suramina. Los arcos de color rojo, corresponden a los aminoácidos presentes en la superficie del bolsillo de unión de la proteína E de CHIKV que formaron interacciones hidrofóbicas con los compuestos. En color verde, se representan los puentes de Hidrógeno (Aminoácido de la proteína involucrado en la interacción y distancia del enlace). Los átomos se representan de color negro (Carbono) y rojo (Oxígeno).

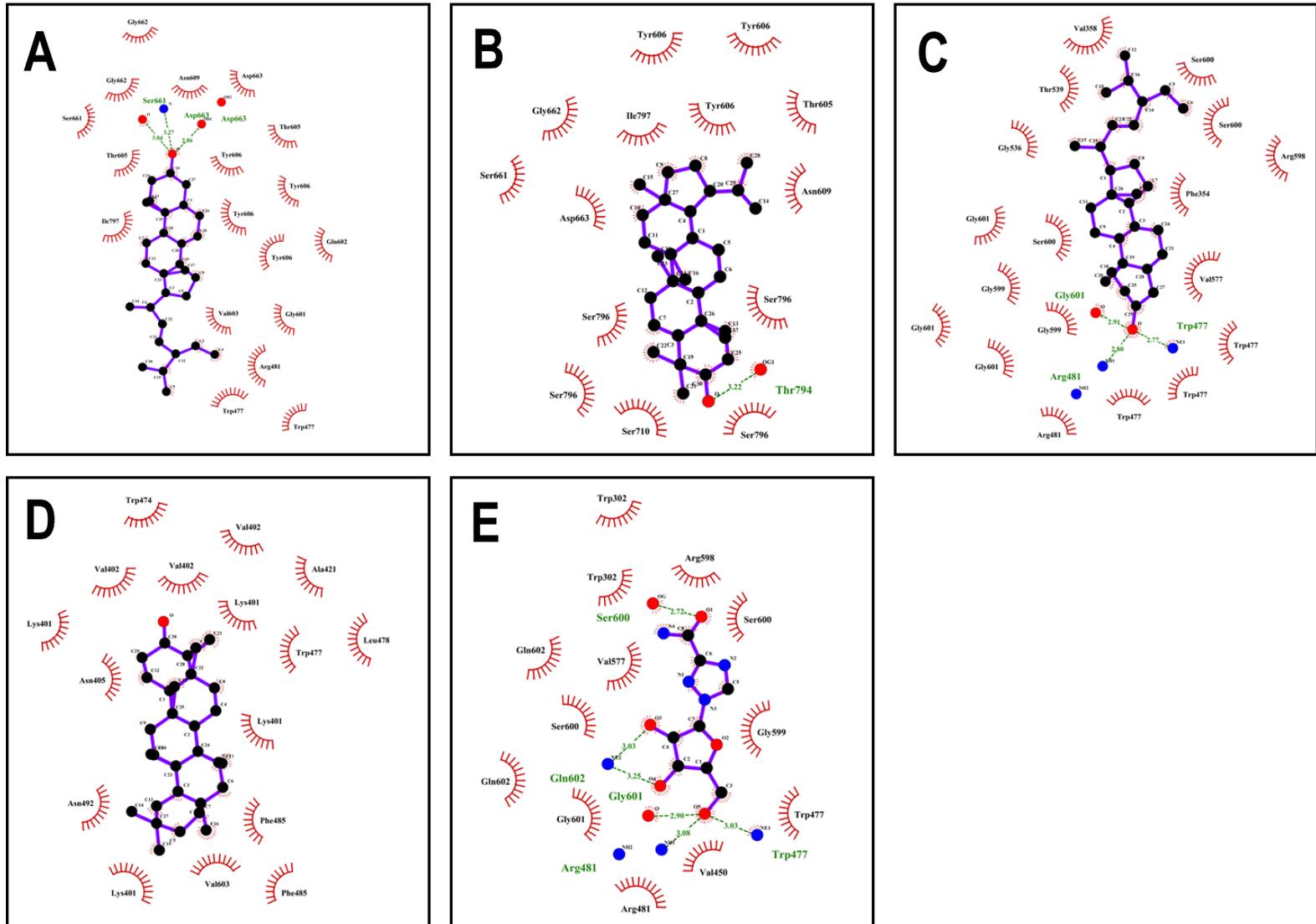
Figura 14



**Interacción *in silico* de la proteína E de ZIKV con los cuatro compuestos isoprenoides por docking molecular.**

Se evaluó la interacción entre la proteína E de ZIKV con los cuatro isoprenoides por docking molecular, usando el software AutoDock Vina. Las imágenes corresponden a la representación en 2D, obtenida por LigPlot, de la interacción entre la proteína E de ZIKV con: **A.** Alfa-Espinasterol, **B.** Lupeol, **C.** Estigmasterol, **D.** Friedelina, **E.** Suramina. Los arcos de color rojo, corresponden a los aminoácidos presentes en la superficie del bolsillo de unión de la proteína E de ZIKV que formaron interacciones hidrofóbicas con los compuestos. En color verde, se representan los puentes de Hidrógeno (Aminoácido de la proteína involucrado en la interacción y distancia del enlace). Los átomos se representan de color negro (Carbono) y rojo (Oxígeno).

Figura 15



**Interacción *in silico* de la proteína NS5 de DENV con los cuatro compuestos isoprenoides por docking molecular.**

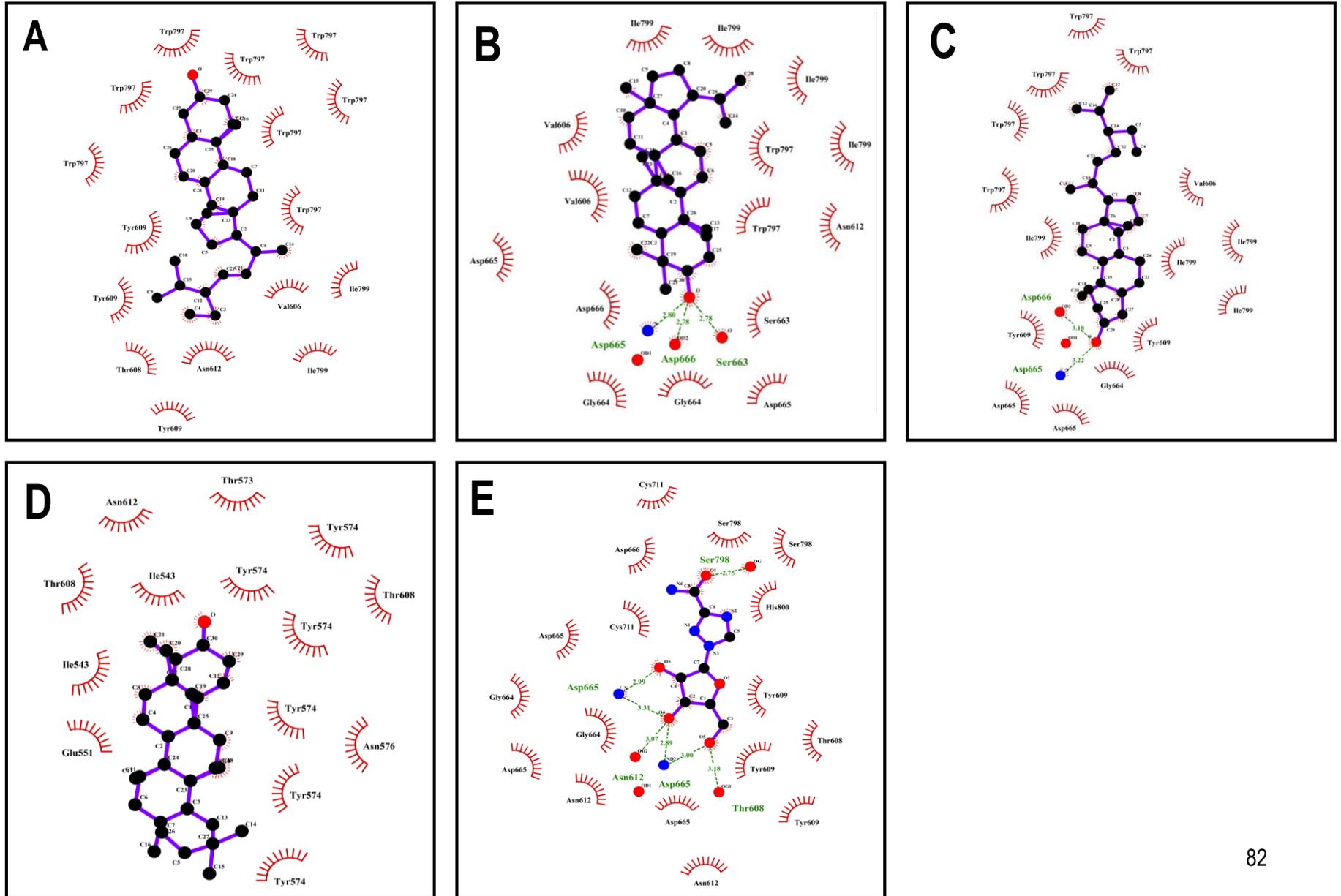
Se evaluó la interacción entre la proteína NS5 de DENV con los cuatro isoprenoides por docking molecular, usando el software AutoDock Vina. Las imágenes corresponden a la representación en 2D, obtenida por LigPlot, de la interacción entre la proteína NS5 de DENV con: **A.** Alfa-Espinasterol, **B.** Lupeol, **C.** Estigmasterol, **D.** Friedelina, **E.** Ribavirina. Los arcos de color rojo, corresponden a los aminoácidos presentes en la superficie del bolsillo de unión de la proteína NS5 de DENV que formaron interacciones hidrofóbicas con los compuestos. En color verde, se representan los puentes de Hidrógeno ( Aminoácido de la proteína involucrado en la interacción y distancia del enlace). Los átomos se representan de color negro (Carbono), rojo (Oxígeno) y azul (Nitrógeno).



### **Interacción *in silico* de la proteína NSP2 de CHIKV con los cuatro compuestos isoprenoides por docking molecular.**

Se evaluó la interacción entre la proteína NSP2 de CHIKV con los cuatro isoprenoides por docking molecular, usando el software AutoDock Vina. Las imágenes corresponden a la representación en 2D, obtenida por LigPlot, de la interacción entre la proteína NSP2 de CHIKV con: **A.** Alfa-Espinasterol, **B.** Lupeol, **C.** Estigmasterol, **D.** Friedelina, **E.** Ribavirina. Los arcos de color rojo, corresponden a los aminoácidos presentes en la superficie del bolsillo de unión de la proteína NSP2 de CHIKV que formaron interacciones hidrofóbicas con los compuestos. En color verde, se representan los puentes de Hidrógeno ( Aminoácido de la proteína involucrado en la interacción y distancia del enlace). Los átomos se representan de color negro (Carbono) y rojo (Oxígeno).

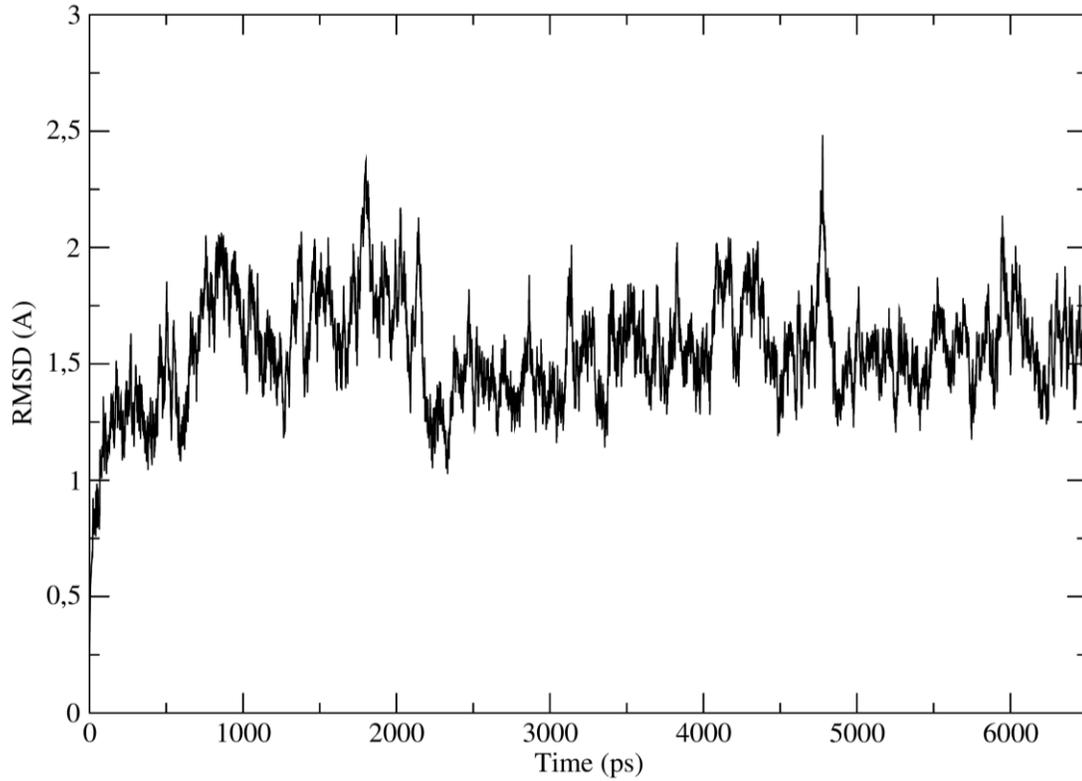
Figura 17



**Interacción *in silico* de la proteína NS5 de ZIKV con los cuatro compuestos isoprenoides por docking molecular.**

Se evaluó la interacción entre la proteína NS5 de ZIKV con los cuatro isoprenoides por docking molecular, usando el software AutoDock Vina. Las imágenes corresponden a la representación en 2D, obtenida por LigPlot de la interacción entre la proteína NS5 de ZIKV con: **A.** Alfa-Espinasterol, **B.** Lupeol, **C.** Estigmasterol, **D.** Friedelina, **E.** Ribavirina. Los arcos de color rojo, corresponden a los aminoácidos presentes en la superficie del bolsillo de unión de la proteína NS5 de ZIKV que formaron interacciones hidrofóbicas con los compuestos. En color verde, se representan los aminoácidos que formaron puentes de Hidrógeno y distancia del enlace. Los átomos se representan de color negro (Carbono), rojo (Oxígeno) y azul (Nitrógeno).

**Figura 18**



**Evaluación de la estabilidad en el tiempo del mejor complejo de interacción de la proteína de envoltura de DENV y Lupeol, por dinámica molecular.** La grafica representa la simulación de dinámica molecular durante 6,5 ns del complejo de la proteína de envoltura de DENV y Lupeol en términos de RMSD (escala de 0 a 3 Å) en función del tiempo en picosegundos (ps) (Software NAMD).

## REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS

1. Velandia, M.L. and J.E. Castellanos, *Virus del dengue: estructura y ciclo viral*. Infectio, 2011. **15**: p. 33-43.
  2. Burt, F.J., et al., *Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen*. The Lancet Infectious Diseases, 2017. **17**(4): p. e107-e117.
  3. Musso, D. and D.J. Gubler, *Zika Virus*. Clin Microbiol Rev, 2016. **29**(3): p. 487-524.
  4. Bollati, M., et al., *Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design*. Antiviral Research, 2010. **87**(2): p. 125-148.
  5. Thiberville, S.D., et al., *Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy*. Antiviral Res, 2013. **99**(3): p. 345-70.
  6. OPS, O.P.d.I.S., *Instrumento para el diagnóstico y la atención a pacientes con sospecha de arbovirosis*. 2016.
  7. OPS, O.P.d.I.S., *Dengue: Información general*. 2019.
  8. Kularatne, S.A.M., et al., *Heart and liver are infected in fatal cases of dengue: three PCR based case studies*. BMC Infect Dis, 2018. **18**(1): p. 681.
  9. Cecilia Perret, C.V., Thomas Weitzel, and J.D. Reinaldo Rosas, Constanza Martínez, *Chikungunya, enfermedad emergente en América Latina*.
- Descripción de los primeros casos en Chile*. Rev Chilena Infectol 2018. **35** (4 ): p. 413-419.
10. OPS, O.P.d.I.S. *Actualización Epidemiológica Dengue 2019*; Available from: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=dengue-2158&alias=50322-13-de-septiembre-de-2019-dengue-actualizacion-epidemiologica&Itemid=270&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=dengue-2158&alias=50322-13-de-septiembre-de-2019-dengue-actualizacion-epidemiologica&Itemid=270&lang=es).
  11. OMS, O.M.d.I.S. *Enfermedad por el virus del Zika*. 2018; Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>.
  12. OMS, O.M.d.I.S. *Chikungunya*. 2017; Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>.
  13. Rajapakse, S., C. Rodrigo, and A. Rajapakse, *Treatment of dengue fever*. Infect Drug Resist, 2012. **5**: p. 103-12.
  14. Oliveira, A.F.C.d.S., et al., *Potential Antivirals: Natural Products Targeting Replication Enzymes of Dengue and Chikungunya Viruses*. Molecules (Basel, Switzerland), 2017. **22**(3): p. 505.
  15. Santos, L.H., R.S. Ferreira, and E.R. Caffarena, *Computational drug design strategies applied to the modelling of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase inhibitors*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2015. **110**(7): p. 847-864.
  16. Ncube, N.B., P. Ramharack, and M.E.S. Soliman, *Using bioinformatics tools for the discovery of Dengue RNA-dependent RNA polymerase inhibitors*. PeerJ, 2018. **6**: p. e5068-e5068.
  17. Murray, N.E.A., M.B. Quam, and A. Wilder-Smith, *Epidemiology of dengue: past, present and future prospects*. Clinical epidemiology, 2013. **5**: p. 299-309.
  18. Diamond, M.S. and T.C. Pierson, *Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control*. Cell, 2015. **162**(3): p. 488-492.
  19. Tyler Warkentien, R.P., *Dengue Fever: Historical Perspective and the Global Response*. J Infect Dis Epidemiol 2016. **2**(015).
  20. OMS, O.M.d.I.S., *Dengue y dengue grave*. 2019.
  21. OPS/OMS, *Actualización Epidemiológica Dengue*. 2019.

22. Martina, B.E.E., P. Koraka, and A.D.M.E. Osterhaus, *Dengue virus pathogenesis: an integrated view*. Clinical microbiology reviews, 2009. **22**(4): p. 564-581.
23. Leitmeyer, K.C., et al., *Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis*. Journal of Virology, 1999. **73**(6): p. 4738-4747.
24. Glasner, D.R., et al., *The Good, the Bad, and the Shocking: The Multiple Roles of Dengue Virus Nonstructural Protein 1 in Protection and Pathogenesis*. Annual Review of Virology, 2018. **5**(1): p. 227-253.
25. Wahala, W.M.P.B. and A.M.d. Silva, *The human antibody response to dengue virus infection*. Viruses, 2011. **3**(12): p. 2374-2395.
26. Martín-Acebes, M.A., J.-C. Saiz, and N. Jiménez de Oya, *Antibody-Dependent Enhancement and Zika: Real Threat or Phantom Menace?* Frontiers in cellular and infection microbiology, 2018. **8**: p. 44-44.
27. Guzman, M.G. and S. Vazquez, *The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection*. Viruses, 2010. **2**(12): p. 2649-2662.
28. Guzman, M.G., *Dengue*. 2016, La Habana: Editorial Ciencias Médicas - ECIMED.
29. Laureti, M., et al., *Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2180.
30. Guzman, M.G., et al., *Dengue: a continuing global threat*. Nature reviews. Microbiology, 2010. **8**(12 Suppl): p. S7-S16.
31. Guzman, M.G., et al., *Dengue*, in *International Encyclopedia of Public Health (Second Edition)*, S.R. Quah, Editor. 2017, Academic Press: Oxford. p. 233-257.
32. Yacoub, S., J. Mongkolsapaya, and G. Screaton, *Recent advances in understanding dengue*. F1000Research, 2016. **5**: p. F1000 Faculty Rev-78.
33. Fernández-Sanlés, A., et al., *Functional Information Stored in the Conserved Structural RNA Domains of Flavivirus Genomes*. Frontiers in Microbiology, 2017. **08**.
34. Chiu, W.-W., R.M. Kinney, and T.W. Dreher, *Control of translation by the 5'- and 3'-terminal regions of the dengue virus genome*. Journal of virology, 2005. **79**(13): p. 8303-8315.
35. Perera, R. and R.J. Kuhn, *Structural proteomics of dengue virus*. Current Opinion in Microbiology, 2008. **11**(4): p. 369-377.
36. Chambers, T.J., et al., *Flavivirus genome organization, expression, and replication*. Annual review of microbiology, 1990. **44**(1): p. 649-688.
37. Bäck, A.T. and A. Lundkvist, *Dengue viruses - an overview*. Infection ecology & epidemiology, 2013. **3**: p. 10.3402/iee.v3i0.19839.
38. Byk, L.A. and A.V. Gamarnik, *Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid Protein*. Annual review of virology, 2016. **3**(1): p. 263-281.
39. Li, L., et al., *The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation*. Science, 2008. **319**(5871): p. 1830-4.
40. Zhang, Y., et al., *Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein*. Structure (London, England : 1993), 2004. **12**(9): p. 1607-1618.
41. Gutsche, I., et al., *Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(19): p. 8003-8008.
42. Akey, D.L., et al., *Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system*. Science, 2014. **343**(6173): p. 881-5.
43. Noble, C.G., et al., *Strategies for development of Dengue virus inhibitors*. Antiviral Res, 2010. **85**(3): p. 450-62.

44. 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.
45. 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.
46. Gomez-Calderon, C., et al., *Antiviral effect of compounds derived from the seeds of *Mammea americana* and *Tabernaemontana cymosa* on Dengue and Chikungunya virus infections*. BMC Complement Altern Med, 2017. **17**(1): p. 57.
47. Apte-Sengupta, S., D. Sirohi, and R.J. Kuhn, *Coupling of replication and assembly in flaviviruses*. Curr Opin Virol, 2014. **9**: p. 134-42.
48. Boldescu, V., et al., *Broad-spectrum agents for flaviviral infections: dengue, Zika and beyond*. Nat Rev Drug Discov, 2017. **16**(8): p. 565-586.
49. Chhabra, M., et al., *Chikungunya fever: A re-emerging viral infection*. Indian Journal of Medical Microbiology, 2008. **26**(1): p. 5-12.
50. 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.
51. Yactayo, S., Staples, J. Erin, Millot, Véronique, Cibrelus, Laurence, Ramon-Pardo, Pilar, *Epidemiology of Chikungunya in the Americas*. The Journal of infectious diseases, 2016. **214**(suppl 5): p. S441-S445.
52. OPS, O.P.d.I.S., *Número de casos reportados de fiebre chikungunya en las Américas - Casos acumulados (23 de octubre de 2015)*. 2015.
53. Cunha, R.V.d. and K.S. Trinta, *Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 2017. **112**(8): p. 523-531.
54. Schilte, C., et al., *Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study*. PLoS neglected tropical diseases, 2013. **7**(3): p. e2137-e2137.
55. Cardona-Ospina, J.A., F.A. Diaz-Quijano, and A.J. Rodríguez-Morales, *Burden of chikungunya in Latin American countries: estimates of disability-adjusted life-years (DALY) lost in the 2014 epidemic*. International Journal of Infectious Diseases, 2015. **38**: p. 60-61.
56. Galán-Huerta, K.A., et al., *Chikungunya virus: A general overview*. Medicina Universitaria, 2015. **17**(68): p. 175-183.
57. Goupil, B.A. and C.N. Mores, *A Review of Chikungunya Virus-induced Arthralgia: Clinical Manifestations, Therapeutics, and Pathogenesis*. The open rheumatology journal, 2016. **10**: p. 129-140.
58. Torres, J.R., et al., *Congenital and perinatal complications of chikungunya fever: a Latin American experience*. International Journal of Infectious Diseases, 2016. **51**: p. 85-88.
59. Lum, F.M. and L.F. Ng, *Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis*. Antiviral Res, 2015. **120**: p. 165-74.
60. Kam, Y.W., et al., *Immuno-biology of Chikungunya and implications for disease intervention*. Microbes Infect, 2009. **11**(14-15): p. 1186-96.
61. McCarthy, M.K. and T.E. Morrison, *Chronic chikungunya virus musculoskeletal disease: what are the underlying mechanisms?* Future microbiology, 2016. **11**(3): p. 331-334.
62. Sales, G., et al., *Treatment of chikungunya chronic arthritis: A systematic review*. 2018. **64**(1): p. 63-70.
63. Ganesan, V.K., B. Duan, and S.P. Reid, *Chikungunya Virus: Pathophysiology, Mechanism, and Modeling*. Viruses, 2017. **9**(12): p. 368.
64. Ann M. Powers, A.C.B., Robert B. Tesh and Scott C. Weaver, *Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses:*

evidence for distinct geographical lineages and distant

evolutionary relationships. *Journal of General Virology*, 2000. **81**: p. 471–479.

65. Laiton-Donato, K., et al., *Phylogenetic analysis of Chikungunya virus in Colombia: Evidence of purifying selection in the E1 gene*. *Biomedica*, 2015. **36**(0): p. 25-34.
66. Silva, L.A. and T.S. Dermody, *Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies*. *The Journal of clinical investigation*, 2017. **127**(3): p. 737-749.
67. Burt, F.J., et al., *Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen*. *Lancet Infect Dis*, 2017. **17**(4): p. e107-e117.
68. Cervantes-Acosta, G. and H. Sanjuán-Vergara, *Virus chikungunya: Características virales y evolución genética*. *Revista Salud Uninorte*, 2016. **32**(2): p. 292-301.
69. Abdelnabi, R., J. Neyts, and L. Delang, *Chikungunya virus infections: time to act, time to treat*. *Curr Opin Virol*, 2017. **24**: p. 25-30.
70. 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.
71. Schwartz, O. and M.L. Albert, *Biology and pathogenesis of chikungunya virus*. *Nat Rev Microbiol*, 2010. **8**(7): p. 491-500.
72. Bhakat, S. and M.E. Soliman, *Chikungunya virus (CHIKV) inhibitors from natural sources: a medicinal chemistry perspective*. *J Nat Med*, 2015. **69**(4): p. 451-62.
73. Basore, K., et al., *Cryo-EM Structure of Chikungunya Virus in Complex with the Mxra8 Receptor*. *Cell*, 2019. **177**(7): p. 1725-1737 e16.
74. Pia D.M. MacDonald, W.H., *Zika and Public Health: Understanding the Epidemiology and Information Environment*. *PEDIATRICS*, 2018. **141**(2).
75. Singh, S. and A. Kumar, *Ocular Manifestations of Emerging Flaviviruses and the Blood-Retinal Barrier*. *Viruses*, 2018. **10**(10): p. 530.
76. Hussain, A., et al., *A Comprehensive Review of the Manifestations and Pathogenesis of Zika Virus in Neonates and Adults*. *Cureus*, 2018. **10**(9): p. e3290-e3290.
77. Mary Kay Kindhauser, T.A., Veronika Frank, Ravi Shankar Santhana, Christopher Dye. *Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus*. 2016 [cited 2019 09-09-19]; Available from: <https://www.who.int/bulletin/volumes/94/9/16-171082/en/>.
78. Garcia-Luna, S.M., et al., *Variation in competence for ZIKV transmission by Aedes aegypti and Aedes albopictus in Mexico*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2018. **12**(7): p. e0006599.
79. OPS, O.P.d.I.S., *Reporte de casos acumulados Zika*. 2019.
80. Barzon, L., et al., *Zika virus: from pathogenesis to disease control*. *FEMS Microbiology Letters*, 2016. **363**(18).
81. Miner, J.J. and M.S. Diamond, *Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism*. *Cell host & microbe*, 2017. **21**(2): p. 134-142.
82. Haddow, A.D., et al., *Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage*. *PLoS neglected tropical diseases*, 2012. **6**(2): p. e1477-e1477.
83. Sirohi, D. and R.J. Kuhn, *Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors*. *The Journal of Infectious Diseases*, 2017. **216**(suppl\_10): p. S935-S944.
84. Wang, A., et al., *Zika virus genome biology and molecular pathogenesis*. *Emerg Microbes Infect*, 2017. **6**(3): p. e13.
85. Javed, F., et al., *Zika virus: what we need to know?* *J Basic Microbiol*, 2018. **58**(1): p. 3-16.
86. Li, G., et al., *The Roles of prM-E Proteins in Historical and Epidemic Zika Virus-mediated Infection and Neurocytotoxicity*. *Viruses*, 2019. **11**(2): p. 157.

87. Valente, A.P. and A.H. Moraes, *Zika virus proteins at an atomic scale: how does structural biology help us to understand and develop vaccines and drugs against Zika virus infection?* Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 2019. **25**.
88. Hamel, R., et al., *Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells*. J Virol, 2015. **89**(17): p. 8880-96.
89. Munjal, A., et al., *Advances in Developing Therapies to Combat Zika Virus: Current Knowledge and Future Perspectives*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 1469.
90. White, M.K., et al., *Zika virus: An emergent neuropathological agent*. Ann Neurol, 2016. **80**(4): p. 479-89.
91. Ming, G.L., H. Tang, and H. Song, *Advances in Zika Virus Research: Stem Cell Models, Challenges, and Opportunities*. Cell Stem Cell, 2016. **19**(6): p. 690-702.
92. Nambala, P. and W.-C. Su, *Role of Zika Virus prM Protein in Viral Pathogenicity and Use in Vaccine Development*. Frontiers in microbiology, 2018. **9**: p. 1797-1797.
93. Abrams, R.P.M., J. Solis, and A. Nath, *Therapeutic Approaches for Zika Virus Infection of the Nervous System*. Neurotherapeutics, 2017. **14**(4): p. 1027-1048.
94. Abd Kadir, S.L., H. Yaakob, and R. Mohamed Zulkifli, *Potential anti-dengue medicinal plants: a review*. Journal of natural medicines, 2013. **67**(4): p. 677-689.
95. Rodríguez MGM, B.-R.K., Reyes SP, Estupiñán AC., *Lista comentada de las plantas vasculares de bosques secos prioritarios para la conservación en los departamentos de Atlántico y Bolívar (Caribe colombiano)*. Biota colombiana, 2012. **13**.
96. Miers, J., *On the Apocynaceae of South America: With Some Preliminary Remarks on the Whole Family*. 1878: Williams and Norgate.
97. Caro Fuentes, D.D.C., et al., *Extractos del Caribe Colombiano con actividad antiproliferativa frente a líneas celulares de cáncer de pulmón*. 2019, 2019. **51**(4).
98. Tropicos. *Tabernaemontana cymosa Jacq.* [cited 2019; Available from: <http://tropicos.org/Name/1801099>].
99. Silveira, D., et al., *Tabernaemontana Species: Promising Sources of New Useful Drugs*. 2017. **54**: p. 227-289.
100. Díaz Castillo, F., et al., *Actividad larvicida de extractos etanólicos de Tabernaemontana cymosa y Trichilia hirta sobre larvas de estadio III y IV de Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)*. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 2012. **17**(3): p. 256-267.
101. Hernández-Castro, C., F. Diaz-Castillo, and M. Martínez-Gutierrez, *Ethanol extracts of Cassia grandis and Tabernaemontana cymosa inhibit the in vitro replication of dengue virus serotype 2*. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2015. **5**(2): p. 98-106.
102. Planchuelo, A.M., *Estudio de los frutos y semillas del género Chenopodium en la Argentina*. Darwiniana, 1975: p. 528-565.
103. Tropicos. *Chenopodium ambrosioides L.* . [cited 2019; Available from: <http://tropicos.org/Name/7200092>].
104. Perez-Cruz, F., et al., *Use of pyrogallol red and pyranine as probes to evaluate antioxidant capacities towards hypochlorite*. Molecules, 2013. **18**(2): p. 1638-52.
105. Javid, A. and M. Amin, *Antifungal activity of methanol and n-hexane extracts of three Chenopodium species against Macrophomina phaseolina*. Nat Prod Res, 2009. **23**(12): p. 1120-7.
106. Beatriz E. Jaramillo C, E.D.R., Wilman Delgado, *Bioactividad del aceite esencial de Chenopodium ambrosioides colombiano*. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 2012. **17**: p. 54-64.

107. Verma, H.N. and V.K. Baranwal, *Antiviral activity and the physical properties of the leaf extract of Chenopodium ambrosoides L.* Proceedings: Plant Sciences, 1983. **92**(6): p. 461-465.
108. Moreno Mendoza, M.Á., et al., *Toxicología subcrónica de infusión de Chenopodium ambrosioides (epazote) por administración oral en ratones NIH.* Revista Cubana de Plantas Medicinales, 2013. **18**: p. 157-170.
109. Gupta, V.K., *Bioactive Phytochemicals. Perspectives for modern medicine.* 2015: Daya PublishingHous.
110. Beltrán Villanueva, C.E., F. Díaz Castillo, and H. Gómez Estrada, *Tamizaje fitoquímico preliminar de especies de plantas promisorias de la costa atlántica colombiana.* Revista Cubana de Plantas Medicinales, 2013. **18**: p. 619-631.
111. Del Valle, J.R., Jorge; Herrera, David *Experiencias dendroclimáticas con árboles de ecosistemas contrastantes de Colombia.* REVISTA COLOMBIANA DE GEOGRAFÍA 2012. **21**(2): p. 2256-5442.
112. Tropicos. *Capparis odoratissima Jacq.* 2019; Available from: <http://tropicos.org/Name/5900351>.
113. Espinosa Torres JA, D.C.F., *Estudio químico biodirigido contra virus el dengue del extracto etanólico de dos Plantas Del Caribe Colombiano: croton malambo karst y capparis odoratissima Jacq,* in *Facultad de Ciencias Farmacéutica.* 2011, Universidad de Cartagena.
114. Zhao, L., et al., *Methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis.* Annual review of biochemistry, 2013. **82**: p. 497-530.
115. Triana Salcedo, L., *PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS EN Cecropia telenitida,* in *Facultad de Ciencias Farmacéuticas.* 2018, Universidad ICESI. p. 46.
116. Tholl, D., *Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants.* Adv Biochem Eng Biotechnol, 2015. **148**: p. 63-106.
117. Brahmshatriya, P.P. and P.S. Brahmshatriya, *Terpenes: Chemistry, Biological Role, and Therapeutic Applications,* in *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes,* K.G. Ramawat and J.-M. Mérillon, Editors. 2013, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 2665-2691.
118. *Chapter 13 - Membrane Structure and Dynamics,* in *Cell Biology (Third Edition),* T.D. Pollard, et al., Editors. 2017, Elsevier. p. 227-239.
119. Calpe-Berdiel, L., et al., *Plant sterols, cholesterol metabolism and related disorders.* 2010. p. 223-242.
120. NCBI, N.C.f.B.I. *PubChem Database. Lupeol, CID=259846.* Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lupeol>.
121. EMBL-EBI, E.B.I. *CHEBI:5171 - friedelin.* July 21, 2019; Available from: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:5171>.
122. Thimmappa, R., et al., *Triterpene biosynthesis in plants.* Annu Rev Plant Biol, 2014. **65**: p. 225-57.
123. Benveniste, P., *Sterol metabolism.* The arabidopsis book, 2002. **1**: p. e0004-e0004.
124. Hosseini, S., et al., *Latest Updates in Dengue Fever Therapeutics: Natural, Marine, and Synthetic Drugs.* Curr Med Chem, 2018.
125. Mottin, M., et al., *Computational drug discovery for the Zika virus.* Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018. **54**(SPE).
126. Newman, D.J. and G.M. Cragg, *Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014.* J Nat Prod, 2016. **79**(3): p. 629-61.

127. Malakar, S., et al., *Drug repurposing of quinine as antiviral against dengue virus infection*. *Virus Res*, 2018. **255**: p. 171-178.
128. Li, C., et al., *Chloroquine, a FDA-approved Drug, Prevents Zika Virus Infection and its Associated Congenital Microcephaly in Mice*. *EBioMedicine*, 2017. **24**: p. 189-194.
129. Subudhi, B.B., et al., *Current Strategies for Inhibition of Chikungunya Infection*. *Viruses*, 2018. **10**(5): p. 235.
130. Teixeira, R.R., et al., *Natural products as source of potential dengue antivirals*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2014. **19**(6): p. 8151-8176.
131. Calixto, J.B., *The role of natural products in modern drug discovery*. *An Acad Bras Cienc*, 2019. **91 Suppl 3**: p. e20190105.
132. Oliveira, A.F., et al., *Potential Antivirals: Natural Products Targeting Replication Enzymes of Dengue and Chikungunya Viruses*. *Molecules*, 2017. **22**(3).
133. Keivan Zandi<sup>1</sup>, Boon-Teong Teoh<sup>1</sup>, et al., *In vitro antiviral activity of Fisetin, Rutin and Naringenin against Dengue virus type-2*. *Journal of Medicinal Plants Research* 2011. **5**(23): p. 5534-5539.
134. Martinez-Gutierrez, 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.
135. Lee, C.J., et al., *Cholesterol effectively blocks entry of flavivirus*. *J Virol*, 2008. **82**(13): p. 6470-80.
136. Ekins, S., J. Mestres, and B. Testa, *In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling*. *British journal of pharmacology*, 2007. **152**(1): p. 9-20.
137. Talarico, L.B., et al., *The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell*. *Antiviral Res*, 2005. **66**(2-3): p. 103-10.
138. Moghaddam, E., et al., *Baicalin, a metabolite of baicalein with antiviral activity against dengue virus*. *Sci Rep*, 2014. **4**: p. 5452.
139. Vazquez-Calvo, A., et al., *Antiviral Properties of the Natural Polyphenols Delphinidin and Epigallocatechin Gallate against the Flaviviruses West Nile Virus, Zika Virus, and Dengue Virus*. *Front Microbiol*, 2017. **8**: p. 1314.
140. Jasso-Miranda, C., et al., *Antiviral and immunomodulatory effects of polyphenols on macrophages infected with dengue virus serotypes 2 and 3 enhanced or not with antibodies*. *Infect Drug Resist*, 2019. **12**: p. 1833-1852.
141. Mir, A., et al., *Identification of bioflavonoid as fusion inhibitor of dengue virus using molecular docking approach*. *Informatics in Medicine Unlocked*, 2016. **3**: p. 1-6.
142. Qaddir, I., et al., *Computer-aided analysis of phytochemicals as potential dengue virus inhibitors based on molecular docking, ADMET and DFT studies*. *Journal of vector borne diseases*, 2017. **54**: p. 255-262.
143. Fang, X.K., J. Gao, and D.N. Zhu, *Kaempferol and quercetin isolated from *Euonymus alatus* improve glucose uptake of 3T3-L1 cells without adipogenesis activity*. *Life Sci*, 2008. **82**(11-12): p. 615-22.
144. Zhang, Y., et al., *Quercetin Isolated from *Toona sinensis* Leaves Attenuates Hyperglycemia and Protects Hepatocytes in High-Carbohydrate/High-Fat Diet and Alloxan Induced Experimental Diabetic Mice*. *Journal of Diabetes Research*, 2016. **2016**: p. 1-10.
145. Zahoor, M., et al., *Isolation of quercetin and mandelic acid from *Aesculus indica* fruit and their biological activities*. *BMC biochemistry*, 2018. **19**(1): p. 5-5.

146. Das, S., et al., *QUERCETIN ALTERS PRO-INFLAMMATORY CYTOKINE CHANGES IN WILD DENGUE VIRUS CHALLENGED HEPG2 CELL LINE*. World Journal of Pharmaceutical Research, 2018. **7**: p. 1137-1149.
147. Peng, M., et al., *Luteolin restricts dengue virus replication through inhibition of the proprotein convertase furin*. Antiviral Research, 2017. **143**: p. 176-185.
148. Balasubramanian, A., et al., *Inhibition of dengue virus by curcuminoids*. Antiviral Res, 2019. **162**: p. 71-78.
149. Padilla, S.L., et al., *Inhibitory effects of curcumin on dengue virus type 2-infected cells in vitro*. Arch Virol, 2014. **159**(3): p. 573-9.
150. Vora, J., et al., *Pharmacophore modeling, molecular docking and molecular dynamics simulation for screening and identifying anti-dengue phytochemicals*. J Biomol Struct Dyn, 2019: p. 1-15.
151. Quintana, V.M., et al., *Antiviral activity of natural and synthetic beta-carbolines against dengue virus*. Antiviral Res, 2016. **134**: p. 26-33.
152. Sangeetha, K., I. Purushothaman, and S. Rajarajan, *Spectral characterisation, antiviral activities, in silico ADMET and molecular docking of the compounds isolated from Tectona grandis to chikungunya virus*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017. **87**: p. 302-310.
153. Bourjot, M., et al., *Chemical constituents of Anacolosa pervilleana and their antiviral activities*. Fitoterapia, 2012. **83**(6): p. 1076-1080.
154. Mounce, B.C., et al., *Curcumin inhibits Zika and chikungunya virus infection by inhibiting cell binding*. Antiviral Res, 2017. **142**: p. 148-157.
155. Weber, C., et al., *The green tea catechin, epigallocatechin gallate inhibits chikungunya virus infection*. Antiviral Res, 2015. **113**: p. 1-3.
156. Lu, J.W., et al., *Synergistic effects of combination treatment using EGCG and suramin against the chikungunya virus*. Biochem Biophys Res Commun, 2017. **491**(3): p. 595-602.
157. Seyedi, S.S., et al., *Computational Approach Towards Exploring Potential Anti-Chikungunya Activity of Selected Flavonoids*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 24027.
158. Kaur, P., et al., *Inhibition of chikungunya virus replication by harringtonine, a novel antiviral that suppresses viral protein expression*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2013. **57**(1): p. 155-167.
159. Gupta, D., et al., *Anti-Chikungunya viral activities of aplysiatoxin-related compounds from the marine cyanobacterium Trichodesmium erythraeum*. Marine drugs, 2014. **12**(1): p. 115-127.
160. Ramalingam, S., et al., *Isolation of Fisetin from Elaeagnus indica Serv. Bull. (Elaeagnaceae) with antioxidant and antiproliferative activity*. Free Radicals and Antioxidants, 2016. **6**: p. 145-150.
161. Shaker, E., H. Mahmoud, and S. Mnaa, *Silymarin, the antioxidant component and Silybum marianum extracts prevent liver damage*. Food Chem Toxicol, 2010. **48**(3): p. 803-6.
162. Lani, R., et al., *Antiviral activity of silymarin against chikungunya virus*. Scientific reports, 2015. **5**: p. 11421.
163. Lani, R., et al., *Antiviral activity of selected flavonoids against Chikungunya virus*. Antiviral research, 2016. **133**: p. 50-61.
164. Allard, P.-M., et al., *Antiviral chlorinated daphnane diterpenoid orthoesters from the bark and wood of Trigonostemon cherrieri*. Phytochemistry, 2012. **84**: p. 160-168.
165. Lani, R., et al., *Antiviral activity of selected flavonoids against Chikungunya virus*. Antiviral Research, 2016. **133**: p. 50-61.
166. Oo, A., et al., *Deciphering the potential of baicalin as an antiviral agent for Chikungunya virus infection*. Antiviral Res, 2018. **150**: p. 101-111.

167. Varghese, F.S., et al., *The Antiviral Alkaloid Berberine Reduces Chikungunya Virus-Induced Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling*. J Virol, 2016. **90**(21): p. 9743-9757.
168. 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.
169. Carneiro, B.M., et al., *The green tea molecule EGCG inhibits Zika virus entry*. Virology, 2016. **496**: p. 215-218.
170. Gaudry, A., et al., *The Flavonoid Isoquercitrin Precludes Initiation of Zika Virus Infection in Human Cells*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(4).
171. Batista, M.N., et al., *Natural Products Isolated from Oriental Medicinal Herbs Inactivate Zika Virus*. Viruses, 2019. **11**(1).
172. Pratap, A., Kumar, Ajay, Srivastava, Vivek, *In Silico Molecular Docking of antiviral Drugs against NS3 Protein of Zika virus*. International Journal of Scientific and Innovative Research 2017. **5**(1): p. 37-40.
173. Cirne-Santos, C.C., et al., *In Vitro Antiviral Activity Against Zika Virus From a Natural Product of the Brazilian Brown Seaweed Dictyota menstrualis*. Natural Product Communications, 2019. **14**(7): p. 1934578X1985912.
174. Csupor-Loffler, B., et al., *Antiproliferative constituents of the roots of Conyza canadensis*. Planta Med, 2011. **77**(11): p. 1183-8.
175. Meneses-Sagrero, S.E., et al., *Antiproliferative activity of spinasterol isolated of Stegnosperma halimifolium (Benth, 1844)*. Saudi Pharm J, 2017. **25**(8): p. 1137-1143.
176. Borges, F.R., et al., *Anti-inflammatory action of hydroalcoholic extract, dichloromethane fraction and steroid alpha-spinasterol from Polygala sabulosa in LPS-induced peritonitis in mice*. J Ethnopharmacol, 2014. **151**(1): p. 144-50.
177. Socala, K. and P. Wlaz, *Evaluation of the antidepressant- and anxiolytic-like activity of alpha-spinasterol, a plant derivative with TRPV1 antagonistic effects, in mice*. Behav Brain Res, 2016. **303**: p. 19-25.
178. Jeong, G.S., et al., *Cytoprotective and anti-inflammatory effects of spinasterol via the induction of heme oxygenase-1 in murine hippocampal and microglial cell lines*. Int Immunopharmacol, 2010. **10**(12): p. 1587-94.
179. Trevisan, G., et al., *Identification of the plant steroid alpha-spinasterol as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive properties*. J Pharmacol Exp Ther, 2012. **343**(2): p. 258-69.
180. Saleem, M., *Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene*. Cancer Lett, 2009. **285**(2): p. 109-15.
181. Gabay, O., et al., *Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties*. Osteoarthritis Cartilage, 2010. **18**(1): p. 106-16.
182. Antonisamy, P., V. Duraipandiyan, and S. Ignacimuthu, *Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from Azima tetracantha Lam. in mouse and rat models*. J Pharm Pharmacol, 2011. **63**(8): p. 1070-7.
183. Woyengo, T.A., V.R. Ramprasath, and P.J. Jones, *Anticancer effects of phytosterols*. Eur J Clin Nutr, 2009. **63**(7): p. 813-20.
184. Kangsamaksin, T., et al., *Lupeol and stigmasterol suppress tumor angiogenesis and inhibit cholangiocarcinoma growth in mice via downregulation of tumor necrosis factor-alpha*. PLoS One, 2017. **12**(12): p. e0189628.
185. Subash-Babu, P., D.K. Li, and A.A. Alshatwi, *In vitro cytotoxic potential of friedelin in human MCF-7 breast cancer cell: Regulate early expression of Cdkn2a and pRb1, neutralize mdm2-*

- p53 amalgamation and functional stabilization of p53*. Exp Toxicol Pathol, 2017. **69**(8): p. 630-636.
186. WAL, A.e.a., *Lupeol as a magical drug*. Pharmaceutical and Biological Evaluations, [S.I.], 2015. **2**(5): p. 142-15.
  187. Yenn, T.W., et al., *Stigmasterol: An adjuvant for beta lactam antibiotics against beta-lactamase positive clinical isolates*. Steroids, 2017. **128**: p. 68-71.
  188. Kuete, V., et al., *Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from Vismia laurentii De Wild (Guttiferae)*. J Ethnopharmacol, 2007. **109**(3): p. 372-9.
  189. Petretera, E., A.G. Nittolo, and L.E. Alche, *Antiviral action of synthetic stigmasterol derivatives on herpes simplex virus replication in nervous cells in vitro*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 947560.
  190. Heidary Navid, M., et al., *Pentacyclic triterpenes in birch bark extract inhibit early step of herpes simplex virus type 1 replication*. Phytomedicine, 2014. **21**(11): p. 1273-80.
  191. Silva, F.C., et al., *Antidiarrheal activity of extracts from Maytenus gonoclada and inhibition of Dengue virus by lupeol*. An Acad Bras Cienc, 2017. **89**(3): p. 1555-1564.
  192. Parvez, M.K., et al., *Plant-derived antiviral drugs as novel hepatitis B virus inhibitors: Cell culture and molecular docking study*. Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society, 2019. **27**(3): p. 389-400.
  193. INS, I.N.d.S. *Boletín epidemiológico semana 30 - Arbovirus*. 2019; Available from: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2019%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2030.pdf>.
  194. INS, I.N.d.S., *Guía para la atención clínica integral del paciente con dengue*. 2010.
  195. 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.
  196. OMS, O.M.d.I.S. *Inmunización, Vacunas y Productos Biológicos*. 2019; Available from: [https://www.who.int/immunization/research/development/dengue\\_q\\_and\\_a/es/](https://www.who.int/immunization/research/development/dengue_q_and_a/es/).
  197. OMS, O.M.d.I.S. *Lucha contra el dengue*. 2019 [cited 2019; Available from: [https://www.who.int/denguecontrol/control\\_strategies/es/](https://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/es/)].
  198. Dorigatti, I., et al., *Using Wolbachia for Dengue Control: Insights from Modelling*. Trends in parasitology, 2018. **34**(2): p. 102-113.
  199. Vanlerberghe V, G.m.-D.s.H., Vazquez-Prokopec G, Alexander N, Manrique-Saide P, Coelho G, *Changing paradigms in Aedes control: considering the spatial heterogeneity of dengue transmission*. Rev Panam Salud Publica, 2017. **41**.
  200. Alphey, L. and N. Alphey, *Five things to know about genetically modified (GM) insects for vector control*. PLoS pathogens, 2014. **10**(3): p. e1003909-e1003909.
  201. Basavannacharya, C. and S.G. Vasudevan, *Suramin inhibits helicase activity of NS3 protein of dengue virus in a fluorescence-based high throughput assay format*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **453**(3): p. 539-44.
  202. Albuлесcu, I.C., et al., *Suramin inhibits chikungunya virus replication through multiple mechanisms*. Antiviral Research, 2015. **121**: p. 39-46.
  203. 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.
  204. Coronado, M.A., et al., *Zika virus NS2B/NS3 proteinase: A new target for an old drug - Suramin a lead compound for NS2B/NS3 proteinase inhibition*. Antiviral Res, 2018. **160**: p. 118-125.

205. Tan, C.W., et al., *Polysulfonate suramin inhibits Zika virus infection*. *Antiviral Res*, 2017. **143**: p. 186-194.
206. Chen, Y., et al., *Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate*. *Nature Medicine*, 1997. **3**(8): p. 866-871.
207. Acharya, D., et al., *Loss of Glycosaminoglycan Receptor Binding after Mosquito Cell Passage Reduces Chikungunya Virus Infectivity*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015. **9**(10): p. e0004139.
208. Martinez-Gutierrez, M., J.E. Castellanos, and J.C. Gallego-Gomez, *Statins reduce dengue virus production via decreased virion assembly*. *Intervirology*, 2011. **54**(4): p. 202-16.
209. Pires de Mello, C.P., et al., *Antiviral Effects of Clinically-Relevant Interferon- $\alpha$  and Ribavirin Regimens against Dengue Virus in the Hollow Fiber Infection Model (HFIM)*. *Viruses*, 2018. **10**(6): p. 317.
210. Kamiyama, N., et al., *Ribavirin inhibits Zika virus (ZIKV) replication in vitro and suppresses viremia in ZIKV-infected STAT1-deficient mice*. *Antiviral Res*, 2017. **146**: p. 1-11.
211. Franco, E.J., et al., *The effectiveness of antiviral agents with broad-spectrum activity against chikungunya virus varies between host cell lines*. 2018. **26**: p. 2040206618807580.
212. Plumley, J.A. and J.J. Dannenberg, *The importance of hydrogen bonding between the glutamine side chains to the formation of amyloid VQIVYK parallel beta-sheets: an ONIOM DFT/AM1 study*. *Journal of the American Chemical Society*, 2010. **132**(6): p. 1758-1759.
213. Robert S. Lanciotti, O.L.K., Janeen J., A.J.P. Laven, Jason O. Velez,, and a.G.L.C. Amy J. Lambert, *Chikungunya Virus*

*in US Travelers*

*Returning from*

*India, 2006*. *Emerg Infect Dis*, 2007. **13**(5): p. 764–767.

214. Lanciotti, R.S., et al., *Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007*. *Emerg Infect Dis*, 2008. **14**(8): p. 1232-9.
215. Quintero-Gil, D.C., et al., *Differential replication of dengue virus serotypes 2 and 3 in coinfections of C6/36 cells and Aedes aegypti mosquitoes*. *J Infect Dev Ctries*, 2014. **8**(7): p. 876-84.
216. Rincon, V., et al., *Fluorometric cell-ELISA for quantifying rabies infection and heparin inhibition*. *J Virol Methods*, 2005. **127**(1): p. 33-9.
217. Cockburn, J.J., et al., *Mechanism of dengue virus broad cross-neutralization by a monoclonal antibody*. *Structure*, 2012. **20**(2): p. 303-14.
218. Voss, J.E., Vaney, M.C., Duquerroy, S., Vonrhein, C., Girard-Blanc, C., Crublet, E., Thompson, A., Bricogne, G., Rey, F.A., *Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography*. *Nature* 468, 2010. **468**: p. 709-712.
219. Dai, L., et al., *Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody*. *Cell Host Microbe*, 2016. **19**(5): p. 696-704.
220. Yap, T.L., et al., *Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution*. *J Virol*, 2007. **81**(9): p. 4753-65.
221. Cheung, J., Franklin, M., Mancina, F., Rudolph, M., Cassidy, M., Gary, E., Burshteyn, F., Love, J., *Structure of the Chikungunya virus nsP2 protease*

222. Godoy, A.S., et al., *Crystal structure of Zika virus NS5 RNA-dependent RNA polymerase*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 14764.
223. Marks, R.M., et al., *Probing the interaction of dengue virus envelope protein with heparin: assessment of glycosaminoglycan-derived inhibitors*. Journal of medicinal chemistry, 2001. **44**(13): p. 2178-2187.
224. Ho, Y.J., et al., *Suramin Inhibits Chikungunya Virus Entry and Transmission*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0133511.
225. Domingo, C., et al., *2nd International external quality control assessment for the molecular diagnosis of dengue infections*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(10).
226. Wilder-Smith, A., et al., *Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health*. Lancet Infect Dis, 2017. **17**(3): p. e101-e106.
227. Guerrero, N.A.S. and F.J.B. Garcia, *Comparative assessment of the replication efficiency of dengue, yellow fever, and chikungunya arboviruses in some insect and mammalian cell lines*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2019. **52**.
228. Moser, L.A., et al., *Growth and adaptation of Zika virus in mammalian and mosquito cells*. 2018. **12**(11): p. e0006880.
229. Martinez-Betancur, V., M. Marin-Villa, and M. Martinez-Gutierrez, *Infection of epithelial cells with dengue virus promotes the expression of proteins favoring the replication of certain viral strains*. J Med Virol, 2014. **86**(8): p. 1448-58.
230. Glover, K.K.M., et al., *Vero Cell Proteomic Changes Induced by Zika Virus Infection*. Proteomics, 2019. **19**(4): p. e1800309.
231. Murphy, B.R. and S.S. Whitehead, *Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 587-619.
232. Dowd, K.A., et al., *Broadly Neutralizing Activity of Zika Virus-Immune Sera Identifies a Single Viral Serotype*. Cell Reports, 2016. **16**(6): p. 1485-1491.
233. Guirakhoo, F., et al., *Safety and efficacy of chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine formulations in nonhuman primates*. Journal of virology, 2004. **78**(9): p. 4761-4775.
234. Himmelsbach, K. and E. Hildt, *Identification of various cell culture models for the study of Zika virus*. World journal of virology, 2018. **7**(1): p. 10.
235. España, E., et al., *Lipophilic statins inhibit Zika virus production in Vero cells*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 11461.
236. Chiu, H.C., et al., *High-throughput quantitative proteomic analysis of dengue virus type 2 infected A549 cells*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e93305.
237. Londono-Renteria, B., et al., *A relevant in vitro human model for the study of Zika virus antibody-dependent enhancement*. J Gen Virol, 2017. **98**(7): p. 1702-1712.
238. Wikan, N., et al., *Chikungunya virus infection of cell lines: analysis of the East, Central and South African lineage*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e31102.
239. Puerta-Guardo, H., et al., *The cytokine response of U937-derived macrophages infected through antibody-dependent enhancement of dengue virus disrupts cell apical-junction complexes and increases vascular permeability*. J Virol, 2013. **87**(13): p. 7486-501.
240. Lucas, D., Lopes da, Benedito, F., *Characterization of the immune response following in vitro mayaro and chikungunya viruses (Alphavirus, Togaviridae) infection of mononuclear cells*. Virus Res, 2018. **256**: p. 166-173.
241. Hodzic, A., et al., *Differential modulation of membrane structure and fluctuations by plant sterols and cholesterol*. Biophys J, 2008. **94**(10): p. 3935-44.
242. Gong, K.-K., et al., *Cytotoxic and Antiviral Triterpenoids from the Mangrove Plant Sonneratia paracaseolaris*. Molecules (Basel, Switzerland), 2017. **22**(8): p. 1319.

243. Taguwa, S., et al., *Zika Virus Dependence on Host Hsp70 Provides a Protective Strategy against Infection and Disease*. Cell Rep, 2019. **26**(4): p. 906-920 e3.
244. Haralampiev, I., et al., *The Potential of alpha-Spinasterol to Mimic the Membrane Properties of Natural Cholesterol*. Molecules, 2017. **22**(8).
245. Shaghghi, M., et al., *Effect of Sterol Structure on the Physical Properties of 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine Membranes Determined Using (2)H Nuclear Magnetic Resonance*. Langmuir, 2016. **32**(30): p. 7654-63.
246. Halling, K.K. and J.P. Slotte, *Membrane properties of plant sterols in phospholipid bilayers as determined by differential scanning calorimetry, resonance energy transfer and detergent-induced solubilization*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1664**(2): p. 161-71.
247. G. Venkateswarlu, C.S., *Studies on antihyperlipidemic activity of stigmasterol isolated from methanol extract of Acalypha indica*. International Journal of Phytopharmacy 2017. **7**(6): p. 76-78.
248. Duraipandiyar, V., et al., *Hypolipidemic activity of friedelin isolated from Azima tetraacantha in hyperlipidemic rats*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2016. **26**(1): p. 89-93.
249. Sudhahar, V., S.A. Kumar, and P. Varalakshmi, *Role of lupeol and lupeol linoleate on lipemic-oxidative stress in experimental hypercholesterolemia*. Life Sciences, 2006. **78**(12): p. 1329-1335.
250. Calpe-Berdiel, L., J.C. Escolà-Gil, and F. Blanco-Vaca, *New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism*. Atherosclerosis, 2009. **203**(1): p. 18-31.
251. Malinowska, M., et al., *New lupeol esters as active substances in the treatment of skin damage*. PLoS One, 2019. **14**(3): p. e0214216.
252. Osuna-Ramos, J.F., J.M. Reyes-Ruiz, and R.M. Del Angel, *The Role of Host Cholesterol During Flavivirus Infection*. Front Cell Infect Microbiol, 2018. **8**: p. 388.
253. Bernard, E., et al., *Endocytosis of chikungunya virus into mammalian cells: role of clathrin and early endosomal compartments*. PloS one, 2010. **5**(7): p. e11479-e11479.
254. Hans C. Leier , W.B.M., Fikadu G. Tafesse, *Lipids and pathogenic flaviviruses: An intimate union*. PLOS Pathogens, 2018. **14**(5): p. e1006952.
255. Cambi, A., et al., *Microdomains of the C-type lectin DC-SIGN are portals for virus entry into dendritic cells*. J Cell Biol, 2004. **164**(1): p. 145-55.
256. Reyes-Del Valle, J., et al., *Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells*. J Virol, 2005. **79**(8): p. 4557-67.
257. Puerta-Guardo, H., et al., *Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in U937 cells requires cholesterol-rich membrane microdomains*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 2): p. 394-403.
258. Noisakran, S., et al., *Association of dengue virus NS1 protein with lipid rafts*. J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 10): p. 2492-500.
259. García Cordero J, L.J.M., González-Y-Merchand JA, Cedillo Barrón L, Gutiérrez Castañeda B, *Caveolin-1 in Lipid Rafts Interacts with Dengue Virus NS3 during Polyprotein Processing and Replication in HMEC-1 Cells*. PLoS ONE, 2014. **9**: p. e90704.
260. Martín-Acebes, M.A., N. Jiménez de Oya, and J.-C. Saiz, *Lipid Metabolism as a Source of Druggable Targets for Antiviral Discovery against Zika and Other Flaviviruses*. Pharmaceuticals (Basel, Switzerland), 2019. **12**(2): p. 97.
261. Carro, A.C. and E.B. Damonte, *Requirement of cholesterol in the viral envelope for dengue virus infection*. Virus Research, 2013. **174**(1-2): p. 78-87.

262. Soto-Acosta, R., et al., *The increase in cholesterol levels at early stages after dengue virus infection correlates with an augment in LDL particle uptake and HMG-CoA reductase activity*. *Virology*, 2013. **442**(2): p. 132-47.
263. Rothwell, C., et al., *Cholesterol biosynthesis modulation regulates dengue viral replication*. *Virology*, 2009. **389**(1-2): p. 8-19.
264. Samsa, M.M., et al., *Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation*. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(10): p. e1000632.
265. Aoki-Utsubo, C., M. Chen, and H. Hotta, *Virucidal and Neutralizing Activity Tests for Antiviral Substances and Antibodies*. *BIO-PROTOCOL*, 2018. **8**.
266. Meneses, R., et al., *Aceites esenciales de plantas colombianas inactivan el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla*. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 2009. **41**: p. 236-243.
267. Snow, G.E., et al., *Review article: Research on dengue during World War II revisited*. *Am J Trop Med Hyg*, 2014. **91**(6): p. 1203-17.
268. Wu-Hsieh, B.A., Y.T. Yen, and H.C. Chen, *Dengue hemorrhage in a mouse model*. *Ann N Y Acad Sci*, 2009. **1171 Suppl 1**: p. E42-7.
269. Michael S. Diamond , D.E., T. Guy Roberts , Betty Lu , Eva Harris, *Infection of Human Cells by Dengue Virus Is Modulated by*

*Different Cell Types and Viral Strains*. *JOURNAL OF VIROLOGY*., 2000. **74**(17): p. 7814–7823.

270. Martínez, V., Martínez, Marlén, *Proteomic profile of human monocytic cells infected with dengue virus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2016. **6**(11): p. 914-923.
271. PérezVI, D.E.C.G.M.B.-L.F.M.R.H.L.M.D.M.G.G.T.G.A.C., *Propiedades biológicas de cepas venezolanas de DENV-2*

*aisladas de pacientes con fiebre de dengue y fiebre*

*hemorrágica del dengue*. *REV CUBANA MED TROP*, 2009. **61**(3): p. 259-68.

272. Acosta, E.G., et al., *Changes in antiviral susceptibility to entry inhibitors and endocytic uptake of dengue-2 virus serially passaged in Vero or C6/36 cells*. *Virus Res*, 2014. **184**: p. 39-43.
273. Ko, H.Y., Li, Y. T., Chao, D. Y., Chang, Y. C., Li, Z. T., *Inter- and intra-host sequence diversity reveal the emergence of viral variants during an overwintering epidemic caused by dengue virus serotype 2 in southern Taiwan*. 2018. **12**(10): p. e0006827.
274. Leitemeyer, K., Vaughn, David, Villalobos, Iris, Watts, Douglas, Ramos, Celso, Rico-Heisse, Rebeca, Salas, Rosalba, *Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis*. *JOURNAL OF VIROLOGY*., 1999. **73**: p. 4738–4747.
275. Leitmeyer, K.C., et al., *Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis*. *Journal of virology*, 1999. **73**(6): p. 4738-4747.
276. Hapuarachchi, H.C., et al., *Clinical outcome and genetic differences within a monophyletic Dengue virus type 2 population*. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0121696.
277. Acosta, E.G., V. Castilla, and E.B. Damonte, *Differential requirements in endocytic trafficking for penetration of dengue virus*. *PLoS One*, 2012. **7**(9): p. e44835.
278. Roca, P., J. Oliver, and A.M. Rodriguez, *Bioquímica: técnicas y métodos*. 2004: Editorial Hélice.
279. Chandrasekaran, R., et al., *A Computational Approach on Understanding Structural Interactions of Envelope Protein of Dengue Virus Bound with Squalene, a Prototype Anti-*

- Viral Compound*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2019. **11**(1): p. 113.
280. Sakano, T., et al., *Molecular dynamics analysis to evaluate docking pose prediction*. Biophysics and physicobiology, 2016. **13**: p. 181-194.
281. Alonso, H., A.A. Bliznyuk, and J.E. Gready, *Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design*. Med Res Rev, 2006. **26**(5): p. 531-68.
282. Quintero-Gil, C., et al., *In-silico design and molecular docking evaluation of peptides derivatives from bacteriocins and porcine beta defensin-2 as inhibitors of Hepatitis E virus capsid protein*. Virusdisease, 2017. **28**(3): p. 281-288.
283. Alhoot, M.A., et al., *Inhibition of dengue virus entry into target cells using synthetic antiviral peptides*. Int J Med Sci, 2013. **10**(6): p. 719-29.
284. O. Trott, A.J.O., *AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading*. Journal of Computational Chemistry 31 2010 p. 455-461.
285. Murgueitio, M.S., et al., *In silico virtual screening approaches for anti-viral drug discovery*. Drug Discovery Today: Technologies, 2012. **9**(3): p. e219-e225.
286. 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.
287. Waarts, B.L., R. Bittman, and J. Wilschut, *Sphingolipid and cholesterol dependence of alphavirus membrane fusion. Lack of correlation with lipid raft formation in target liposomes*. J Biol Chem, 2002. **277**(41): p. 38141-7.
288. Wichit, S., et al., *Imipramine Inhibits Chikungunya Virus Replication in Human Skin Fibroblasts through Interference with Intracellular Cholesterol Trafficking*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 3145.
289. Itoh, M., et al., *Lupeol reduces triglyceride and cholesterol synthesis in human hepatoma cells*. Phytochemistry Letters, 2009. **2**(4): p. 176-178.
290. Fernández, C., et al., *Inhibition of cholesterol biosynthesis by Delta22-unsaturated phytosterols via competitive inhibition of sterol Delta24-reductase in mammalian cells*. The Biochemical journal, 2002. **366**(Pt 1): p. 109-119.
291. Batta, A.K., et al., *Stigmasterol reduces plasma cholesterol levels and inhibits hepatic synthesis and intestinal absorption in the rat*. Metabolism, 2006. **55**(3): p. 292-9.
292. Kielian, M.C. and A. Helenius, *Role of cholesterol in fusion of Semliki Forest virus with membranes*. Journal of virology, 1984. **52**(1): p. 281-283.
293. Kreuzer, J., et al., *Chemotaxis of the monocyte cell line U937: dependence on cholesterol and early mevalonate pathway products*. Atherosclerosis, 1991. **90**(2-3): p. 203-9.
294. Frostegard, J., et al., *Low density lipoprotein-induced growth of U937 cells: a novel method to determine the receptor binding of low density lipoprotein*. J Lipid Res, 1990. **31**(1): p. 37-44.
295. Mbaveng, A.T., R. Hamm, and V. Kuete, *19 - Harmful and Protective Effects of Terpenoids from African Medicinal Plants*, in *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*, V. Kuete, Editor. 2014, Elsevier. p. 557-576.
296. Sánchez Fernández, R., et al., *Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina*. TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas, 2013. **16**: p. 132-146.
297. Maxfield, F.R. and G. van Meer, *Cholesterol, the central lipid of mammalian cells*. Current Opinion in Cell Biology, 2010. **22**(4): p. 422-429.

298. Xiao, S., et al., *Recent progress in the antiviral activity and mechanism study of pentacyclic triterpenoids and their derivatives*. Med Res Rev, 2018. **38**(3): p. 951-976.
299. Gueddari, N., et al., *Evidence for up-regulated low density lipoprotein receptor in human lung adenocarcinoma cell line A549*. Biochimie, 1993. **75**(9): p. 811-819.
300. ATCC. Vero (ATCC® CCL-81™). [cited 2019; Available from: <https://www.atcc.org/products/all/CCL-81.aspx>.
301. ATCC. A549 (ATCC® CCL-185™). [cited 2019; Available from: <https://www.atcc.org/products/all/CCL-185.aspx>.
302. Roberts, G.C., et al., *Evaluation of a range of mammalian and mosquito cell lines for use in Chikungunya virus research*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 14641.
303. Hiasa, Y., et al., *Hepatitis C virus replication is inhibited by 22 $\beta$ -methoxyolean-12-ene-3 $\beta$ , 24(4 $\beta$ )-diol (ME3738) through enhancing interferon- $\beta$* . Hepatology (Baltimore, Md.), 2008. **48**: p. 59-69.
304. Chakrabarti, A., et al., *RNase L activates the NLRP3 inflammasome during viral infections*. Cell host & microbe, 2015. **17**(4): p. 466-477.
305. Emeny, J.M. and M.J. Morgan, *Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production*. J Gen Virol, 1979. **43**(1): p. 247-52.
306. Hafer, A., et al., *Differential incorporation of cholesterol by Sindbis virus grown in mammalian or insect cells*. Journal of virology, 2009. **83**(18): p. 9113-9121.
307. Marquardt, M.T., T. Phalen, and M. Kielian, *Cholesterol is required in the exit pathway of Semliki Forest virus*. The Journal of cell biology, 1993. **123**(1): p. 57-65.
308. Kuhn, R.J., et al., *Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion*. Cell, 2002. **108**(5): p. 717-725.
309. Sousa, I.P., Jr., et al., *Envelope lipid-packing as a critical factor for the biological activity and stability of alphavirus particles isolated from mammalian and mosquito cells*. The Journal of biological chemistry, 2011. **286**(3): p. 1730-1736.
310. Nguemfo, E., et al., *Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of some isolated constituents from the stem bark of Allanblackia monticola Staner L.C (Guttiferae)*. Inflammopharmacology, 2009. **17**: p. 37-41.
311. Siddique, H.R. and M. Saleem, *Beneficial health effects of lupeol triterpene: A review of preclinical studies*. Life Sciences, 2011. **88**(7): p. 285-293.
312. Henss, L., et al., *Suramin is a potent inhibitor of Chikungunya and Ebola virus cell entry*. Virology, 2016. **13**: p. 149.
313. Kuo, S.-C., et al., *Suramin treatment reduces chikungunya pathogenesis in mice*. Antiviral Research, 2016. **134**: p. 89-96.
314. Oo, A., et al., *In silico study on anti-Chikungunya virus activity of hesperetin*. PeerJ, 2016. **4**: p. e2602-e2602.
315. Ahmadi, A., et al., *Inhibition of chikungunya virus replication by hesperetin and naringenin*. RSC Adv., 2016. **6**.
316. Saisawang, C., et al., *Full length and protease domain activity of chikungunya virus nsP2 differ from other alphavirus nsP2 proteases in recognition of small peptide substrates*. Bioscience reports, 2015. **35**(3): p. e00196.
317. Li, C., et al., *25-Hydroxycholesterol Protects Host against Zika Virus Infection and Its Associated Microcephaly in a Mouse Model*. Immunity, 2017. **46**(3): p. 446-456.
318. Molina, S., et al., *The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus*. J Hepatol, 2007. **46**(3): p. 411-9.

319. Rocker, A.E., et al., *The molecular tweezer CLR01 inhibits Ebola and Zika virus infection*. Antiviral Res, 2018. **152**: p. 26-35.
320. Lump, E., et al., *A molecular tweezer antagonizes seminal amyloids and HIV infection*. Elife, 2015. **4**.
321. Medigeschi, G.R., et al., *West Nile virus entry requires cholesterol-rich membrane microdomains and is independent of alphavbeta3 integrin*. Journal of virology, 2008. **82**(11): p. 5212-5219.
322. Rodal, S.K., et al., *Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles*. Molecular biology of the cell, 1999. **10**(4): p. 961-974.
323. Owczarek, K., et al., *Zika virus: mapping and reprogramming the entry*. Cell Commun Signal, 2019. **17**(1): p. 41.
324. Vicenti, I., et al., *Comparative analysis of different cell systems for Zika virus (ZIKV) propagation and evaluation of anti-ZIKV compounds in vitro*. Virus Research, 2018. **244**: p. 64-70.
325. Low, J.G.H., E.E. Ooi, and S.G. Vasudevan, *Current Status of Dengue Therapeutics Research and Development*. The Journal of infectious diseases, 2017. **215**(suppl\_2): p. S96-S102.
326. Xie, X., et al., *Small Molecules and Antibodies for Zika Therapy*. The Journal of Infectious Diseases, 2017. **216**(suppl\_10): p. S945-S950.
327. Zaid, A. and P. Gerardin, *Chikungunya Arthritis: Implications of Acute and Chronic Inflammation Mechanisms on Disease Management*. 2018. **70**(4): p. 484-495.
328. Baz, M. and G. Boivin, *Antiviral Agents in Development for Zika Virus Infections*. Pharmaceuticals (Basel), 2019. **12**(3).
329. Couderc, T., et al., *Prophylaxis and therapy for Chikungunya virus infection*. J Infect Dis, 2009. **200**(4): p. 516-23.
330. Clayton, A.M., *Monoclonal Antibodies as Prophylactic and Therapeutic Agents Against Chikungunya Virus*. The Journal of infectious diseases, 2016. **214**(suppl 5): p. S506-S509.
331. Gómez Ochoa, S., *Viremia en plasma como factor asociado a gravedad en la infección por el virus del dengue: revisión sistemática de la literatura*. Revista chilena de infectología: organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectología, 2018. **35**.
332. Cagno, V., et al., *Broad-spectrum non-toxic antiviral nanoparticles with a virucidal inhibition mechanism*. Nature Materials, 2018. **17**.
333. Al-Jabri, A.A. and F.Q. Alenzi, *Vaccines, virucides and drugs against HIV/AIDS: hopes and optimisms for the future*. The open AIDS journal, 2009. **3**: p. 1-3.
334. Siddharta, A., et al., *Virucidal Activity of World Health Organization–Recommended Formulations Against Enveloped Viruses, Including Zika, Ebola, and Emerging Coronaviruses*. The Journal of Infectious Diseases, 2017. **215**(6): p. 902-906.
335. Camacho, D., et al., *Clonación de secuencias de alfavirus y flavivirus para uso como controles positivos en el diagnóstico molecular*. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, 2016. **33**(2): p. 269.
336. H.Strauss2, R.J.K.W.M.G.R.S.V.P.J.E.C.T.J.S.P.R.C.E.G.S.T.S.B.J., *Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion*.

## Anexo 1: Obtención de plásmidos recombinantes

Se construyeron plásmidos recombinantes para CHIKV y ZIKV usando el kit CloneJET PCR Cloning (Thermo Fisher Scientific). Inicialmente, se amplificaron fragmentos de 125 pb del gen de NSP4 de CHIKV y fragmentos de 77 pb del gen de E de ZIKV (a partir de sobrenadante de cultivos celulares infectados) por RT-qPCR, tal como se describió en el ítem 7.3.2. Los amplificados se corrieron por electroforesis en gel de agarosa al 2% y las bandas obtenidas fueron cortadas y purificadas usando el kit de purificación de DNA (QIAGEN). Para la clonación, se empleó el plásmido pJET 1.2/blunt de 2974 pb (Thermo Fisher Scientific). Para la reacción de ligación de los fragmentos de ADNc amplificados y el vector (relación 3:1), se empleó la enzima T4 DNA Ligasa y se incubó durante 5 minutos a 22°C.

Posteriormente, las mezclas de ligación fueron añadidas sobre el bisel de células competentes *Escherichia coli* DH5α para transformarlas mediante choque térmico (30 min 4 °C, 30 segundos 42 °C en agitación, 5 min 4 °C). A cada tubo se agregó medio LB precalentado y se incubaron a 37 °C, 700 rpm durante 60 minutos. Luego se centrifugaron los preparados a 5000 rpm durante 5 minutos, a temperatura ambiente, se descartaron los sobrenadantes y se sembraron 200 µL del pellet en placas con agar LB (Tryptona 10g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7, Ampicilina 100 µg/mL) [335]. Se incubaron a 37 °C durante 12 h. Se observó crecimiento de colonias, se recolectaron, se diluyeron en medio LB con AMP (Dilución 1000X) y se incubaron a 37°C, 16h, 200 rpm. Se evidenció la formación de turbidez. El cultivo fue centrifugado por 15 min a 3015 rpm a 4 °C y el sedimento resuspendido con CaCl<sub>2</sub> 100 mM. Esta mezcla fue centrifugada y el sedimento resuspendido en CaCl<sub>2</sub> 100 mM- Glicerol 20% para su almacenamiento a -80 °C. Se aplicó el protocolo de purificación de DNA plasmídico por lisis alcalina (QIAPREP). El DNA plasmídico fue almacenado a -20°C. Se cuantificó el DNA plasmídico (3099 pb) usando Nanodrop y se confirmó la inserción de los fragmentos de CHIKV por qPCR y electroforesis en gel de agarosa [336].