

**EL COMPUESTO 18- (FTALIMIDA-2-IL)-FERRUGINOL AFECTA LA
TRADUCCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES Y LA REMODELACIÓN DE ACTINA
DURANTE LA INFECCIÓN *IN VITRO* POR EL VIRUS DENGUE**

VICKY CONSTANZA ROA LINARES, Bact, M.Sc

**Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de Doctora en
Ciencias Básicas Biomédicas con énfasis en Virología**

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
CORPORACIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
MEDELLÍN-COLOMBIA**

2020

**EL COMPUESTO 18- (FTALIMIDA-2-IL)-FERRUGINOL AFECTA LA
TRADUCCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES Y LA REMODELACIÓN DE ACTINA
DURANTE LA INFECCIÓN *IN VITRO* POR EL VIRUS DENGUE**

VICKY CONSTANZA ROA LINARES, Bact, M.Sc

**Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de Doctora en
Ciencias Básicas Biomédicas con énfasis en Virología**

Tutor:

Juan Carlos Gallego Gómez, B.Sc,Ph.D.

Co-tutor:

Liliana Betancur Galvis, Ph.D.

Comité Tutorial:

Leonardo Padilla, M.Sc, Ph.D.

Jhon Carlos Castaño, MD, M.Sc, Ph.D.

Homero San Juan Vergara, MD, M.Sc, Ph.D.

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
CORPORACIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
MEDELLÍN-COLOMBIA**

2020

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todas las instituciones, docentes, investigadores, compañeros, amigos y familia que estuvieron a mi lado guiándome y apoyándome en cada paso durante el desarrollo y culminación de este proceso; el cual, más que un trabajo de investigación concluido, hoy se convierte en un proyecto y en un sueño de vida cumplido.

A todos, sencillamente muchas gracias desde lo más profundo de mi corazón.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	7
ABREVIATURAS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. MARCO TEÓRICO	15
2.1 Arbovirus	15
2.2 Género Flavivirus: generalidades	15
2.3. Virus Dengue: clasificación clínica.....	17
2.3.1 Epidemiología.....	18
2.3.2 Interacción virus-célula: importancia del sistema de endomembranas y el citoesqueleto	18
2.4 Estrategias antivirales para el control del virus dengue	22
2.4.1 Potencial de las pequeñas moléculas como medicamentos	22
2.4.2 Antivirales dirigidos al hospedero vs antivirales de acción directa.....	23
2.4.3 Derivados de plantas como antivirales de amplio espectro.....	26
2.5 Actividad antiviral del ferruginol y análogos	27
2.5.1 Mecanismos de acción reportados.....	29
3. OBJETIVOS	30
3.1. Objetivo general	30
3.2. Objetivos específicos.....	30
4. HIPÓTESIS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
4.1. Hipótesis nula	31
4.2. Hipótesis alternativa	31
4.3 Planteamiento del problema	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
5.1. Compuestos y reactivos	33
5.2 Virus y líneas celulares.....	34
5.3 Amplificación y cuantificación de stocks virales	34
5.4 Evaluación de la actividad antiviral.....	35

5.4.1	Ensayos de inhibición.....	35
5.4.2	Curvas de crecimiento viral.....	36
5.4.3	Ensayos de tiempo-adición.....	36
5.5	Ensayos <i>in silico</i>	37
5.5.1	Acoplamiento (<i>Docking</i>) molecular.....	37
5.5.2	Predicción de los parámetros ADME y <i>drug-likeness</i>	37
5.6	Determinación del mecanismo de acción antiviral.....	37
5.6.1	Efecto en la replicación del genoma y/o traducción de proteínas virales.....	37
5.6.2	Efecto en la entrada y traducción inicial de proteínas virales.....	38
5.6.3	Efecto post-infección sobre traducción de proteínas virales.....	38
5.6.4	Efecto sobre elementos celulares y componentes virales.....	40
5.6.5	Ensayo de activación de RhoA.....	40
5.7	Ensayos de integridad metabólica y celular.....	41
5.7.1	3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT).....	41
5.7.2	Detección de apoptosis empleando anexina V.....	41
5.7.3	Ensayo de migración celular (<i>wound healing assay</i>).....	42
5.8	Análisis estadísticos.....	42
6.	RESULTADOS.....	43
6.1	Evaluación de la actividad antiviral.....	43
6.1.1	El compuesto 8 no afecta la adherencia y/o la entrada de DENV-2.....	43
6.1.2	Los tratamientos antes y después de la infección con la molécula 8, inducen actividad antiviral y cambios en la morfología celular.....	43
6.1.3	El compuesto 8 posiblemente altera la traducción de proteínas y/o la replicación del genoma viral, así como la propagación del virus.....	45
6.2	Ensayos <i>in silico</i>	47
6.2.1	El análogo del ferruginol se acopla de forma predictiva con elementos del citoesqueleto, proteínas implicadas en la señalización de la polimerización de actina y proteínas virales.....	47
6.2.2	El compuesto 8 presenta similitud con los fármacos (<i>drug-likeness</i>) y podría postularse como potencial fármaco antiviral.....	51
6.3	Determinación del potencial mecanismo de acción antiviral.....	52
6.3.1	El compuesto 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol afecta la traducción de proteínas y/o replicación del genoma de DENV-2.....	52

6.3.2 El tratamiento post-infección con la molécula 8 disminuye la síntesis de proteínas virales.....	53
6.3.3 La molécula 8 induce cambios drásticos en la reorganización de los filamentos de actina y reduce la cantidad de envoltura viral.....	56
6.3.4 El compuesto 8 inhibe la activación de la Rho GTPasa RhoA durante la infección por DENV-2.....	59
6.3.5 El tratamiento con el compuesto 8 reduce la intensidad media de fluorescencia y altera la distribución de componentes virales que hacen parte de los complejos replicativos	60
6.3.6 El tratamiento con el compuesto 8 no tiene efectos notables sobre el retículo endoplasmático	63
6.4 Caracterización de la integridad celular	66
6.4.1 La molécula 18-(ftalimida-2-il) ferruginol no afecta el funcionamiento celular durante tiempo cortos de exposición	66
6.4.2 Los cambios morfológicos y moleculares inducidos por la molécula 8 son potencialmente reversibles	68
7. DISCUSIÓN.....	69
8. CONCLUSIONES.....	79
9. PERSPECTIVAS	80
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
MATERIAL SUPLEMENTARIO	91

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Ciclo replicativo de los flavivirus.	16
Figura 2. Esquema de la regulación del citoesqueleto durante la infección por flavivirus. .	21
Figura 3. Relación entre la tasa de error y el tamaño del genoma en diferentes sistemas genéticos, incluidos los virus.....	23
Figura 4. Ventajas y desventajas de HTA vs DAA.	25
Figura 5. Productos naturales con sus principales dianas y espectros de actividad antiviral.	26
Figura 6. Estructura química del ferruginol y de dos de sus análogos, 18-(ftalimida-2-il) ferruginol (compuesto 8) y 18-oxoferruginol (compuesto 9).....	29
Tabla 1. Primers empleados para realizar el ensayo de qPCR.	40
Figura 7. Efecto del compuesto 8 en etapas iniciales de la infección viral.	43
Figura 8. La molécula 8 induce actividad antiviral y cambios en la morfología celular cuando se adiciona antes y después de la infección.....	45
Figura 9. El compuesto 8 posiblemente altera la traducción de proteínas y/o la replicación del genoma viral, así como la propagación de DENV-2.	47
Tabla 2. Afinidad de unión del compuesto 8 con elementos del citoesqueleto, proteínas implicadas en la señalización de la polimerización de actina y proteínas virales.	48
Figura 10. Principales interacciones del compuesto 8 con elementos del citoesqueleto, proteínas implicadas en la señalización de la polimerización de actina y proteínas virales.	49
Figura 11. El compuesto 8 presenta similitud a los fármacos (drug-likeness) y podría postularse como potencial fármaco antiviral.	51
Tabla 3. Predicción de las propiedades farmacocinéticas del compuesto 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol	52
Figura 12. La molécula 8 reduce la cantidad de proteína y RNA viral de DENV-2.....	53
Figura 13. El tratamiento post-infección con la molécula 8 disminuye la síntesis de proteínas virales.	55
Figura 14. La molécula 8 reduce la formación de filamentos de actina.	58
Figura 15. El compuesto 8 inhibe la activación de RhoA durante la infección por DENV-2.	60
Figura 16. La molécula 8 altera componentes virales que hacen parte de los complejos replicativos.	63
Figura 17. El tratamiento con el compuesto 8 no tiene efecto sobre el retículo endoplasmático.	65

.....	67
Figura 18. El tratamiento con el compuesto 8 no genera disrupción de la integridad metabólica o celular.....	67
Figura 19. Potencial mecanismo de acción antiviral del compuesto 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol.	77
Figura S1. Concentración efectiva 50% en células BHK-21 y Huh-7.	91
Figura S2. Porcentaje de infección y número de células durante el tratamiento con el compuesto 8 en células Huh-7.....	92
Figura S3. Interacciones entre el compuesto 8 y algunas proteínas involucradas en la señalización de la remodelación de actina.....	93
Figura S4. El tratamiento previo a la infección con el compuesto 8 no afecta la entrada viral ni la síntesis inicial de proteínas.	94
Figura S5. El análogo 8 no induce cambios relevantes en la distribución de tubulina y vimentina.	96

ABREVIATURAS

DAA: *Direct acting antivirals*

CM: membranas convuladas

DENV: virus dengue

dsRNA: *double stranded RNA*, intermediarios replicativos

EMT: transición epitelial a mesenquimal

ER: retículo endoplasmático

FDA: *Food and Drug Administration U.S*

FBS: Suero fetal bovino

HBV: virus de la hepatitis B

HCV: virus de la hepatitis C

HIV: virus de inmunodeficiencia humana

HPV: virus del papiloma humano

HTA: *Host-targeted antivirals*

IV: virus de la influenza

JEV: virus de la encefalitis japonesa

MV: virus del sarampión

RC: complejos replicativos

RLUC: *Renilla luciferase*

SLEV: virus de la encefalitis de St. Louis

TBEV: virus de la encefalitis transmitida por garrapatas

VP: paquetes vesiculares

VEEV: virus de la encefalitis equina venezolana

WB: *Western blot*

WNV: virus del Nilo Occidental

YFV: virus de la fiebre amarilla

ZIKV: virus zika

RESUMEN

La infección por el virus dengue es la arbovirosis más importante del mundo. Sin embargo, no se han aprobado medicamentos antivirales para su tratamiento. Como un nuevo enfoque de investigación antiviral, los denominados antivirales dirigidos al hospedero (HTA, por sus siglas en inglés) aparecen como una estrategia prometedora, principalmente por su alta barrera genética y su baja probabilidad de seleccionar cepas virales resistentes a los medicamentos. Utilizando ensayos de unidades formadoras de placa, acoplamiento molecular, microscopía de fluorescencia cuantitativa y análisis de imágenes, encontramos que el compuesto 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol, un análogo semi-sintético del ferruginol, se acopla con alta afinidad a la GTPasa RhoA (-9.8 kcal/mol) y a la proteína NS5 de DENV-2 (-9.6 kcal/mol). Además, esta molécula reduce drásticamente la formación de filamentos de actina e induce cambios en la morfología celular cuando se agrega a los cultivos celulares antes o después de la infección por DENV-2, pero no tiene efecto sobre los microtúbulos o filamentos intermedios. La activación de RhoA en células infectadas se vio afectada cuando el compuesto se adicionó después de 6 h.p.i. Asimismo, esta molécula disminuye la intensidad de fluorescencia de la proteína de la envoltura viral, la proteína NS3 y el dsRNA, generando alteraciones en el patrón de distribución de estos componentes virales, así como la reducción del rendimiento del virus, especialmente cuando se adicionó después de 6 y 12 h.p.i. Los ensayos de Western blot y RT-qPCR revelan que este análogo disminuye la traducción de la poliproteína viral cuando se utilizó una línea celular que expresa establemente un replicón de DENV-2 y el virus recombinante, RLuc-tagged DENV-2. El tratamiento antes y en las primeras etapas de la infección no afecta la adhesión y/o entrada viral. Por otra parte, los experimentos de citometría de flujo y wound-healing sugieren que los efectos celulares provocados por este compuesto no se relacionan con eventos apoptóticos tempranos y que podrían ser reversibles. En general, estos hallazgos sugieren que el compuesto 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol tiene un mecanismo de acción relacionado con HTA, posiblemente interrumpiendo la traducción de la poliproteína de DENV-2 a través de la alteración de la remodelación de actina y alterando otros procesos celulares y virales relacionados con la formación de los complejos replicativos.

ABSTRACT

Dengue virus infection is the most important arbovirolosis around the world. However, no antiviral drugs have been approved for its treatment. As a new antiviral research approach, the named Host-Targeted Antivirals (HTA) appears as a promising strategy, mainly by its high barrier to resistance and low probability to select drug-resistant viral strains. Using plaque-forming units assays, molecular docking, fluorescence microscopy and image analysis, we found that the 18-(phthalimide-2-yl)-ferruginol, a semi-synthetic ferruginol analogue, couples with high affinity to RhoA GTPase (-9.8 kcal/mol) and to DENV-2 NS5 protein (-9.6 kcal/mol). Also, this molecule dramatically reduces actin filament formation and induces cellular morphological changes when it was added to cell cultures prior to or after DENV-2 infection but has no effect on microtubules or intermediate filaments. RhoA activation in infected cells was affected when the compound was added after 6 h.p.i. Further, this molecule decreases the fluorescence intensity of viral envelope protein, NS3 protein and dsRNA, with alterations in the distribution pattern of these viral components, as well as reducing the yield of the virus, especially when it was added after 6 and 12 h.p.i. Western blot and RT-qPCR assays reveal that this analog decreases viral protein translation when a DENV-2 replicon stable cell line and recombinant RLuc-tagged DENV-2 were used. Treatment before and in the early stages of infection does not affect viral attachment and/or entry. Additionally, flow cytometry and wound-healing experiments hint that cellular effects prompted for this compound do not relate to early apoptotic events and it could be reversible. Overall, our findings strongly suggest that 18-(phthalimide-2-yl)-ferruginol has an HTA-related mechanism of action, possibly disrupting the polyprotein translation of DENV-2 via alteration of actin remodeling and other related cellular and viral processes involved on replicative complexes formation.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad del dengue es la infección viral transmitida por mosquitos más prevalente en todo el mundo, causando aproximadamente 60 millones de casos sintomáticos y 13,000 muertes (1). Actualmente, las estrategias de erradicación, incluido el control químico o biológico de los mosquitos, no son suficientes para contrarrestar esta enfermedad, ya que el uso continuo de insecticidas puede seleccionar vectores resistentes (2,3); por otra parte, la vacuna recientemente autorizada tiene una eficacia limitada y podría aumentar el riesgo de enfermedad grave (4). Por esta razón, la investigación antiviral es un enfoque necesario para considerar.

De manera similar a otros virus de RNA monocatenario de sentido positivo ((+) ssRNA), la replicación del virus dengue (DENV) ocurre en el citoplasma de las células hospederas y es altamente dependiente de ciertos orgánulos, proteínas, vías de señalización y complejos macromoleculares para llevar a cabo un ciclo replicativo exitoso (5–7). Entre estos factores celulares, se ha descrito ampliamente que los elementos del citoesqueleto y algunas proteínas de transducción de señales relacionadas desempeñan un papel esencial en muchos pasos del ciclo de replicación viral, incluyendo: la entrada, el tráfico, la replicación del genoma, la liberación y la diseminación de célula a célula (8–11).

El citoesqueleto contiene tres elementos principales: filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios; todos ellos cruciales para el mantenimiento de la morfología, división, tráfico intracelular y señalización celular. Específicamente, las Rho GTPasas (Cdc42, Rac1 y RhoA), actúan como interruptores moleculares que regulan estas funciones del citoesqueleto (12). Durante la infección por DENV, el virus modula la vía de señalización de los filamentos de actina y Rac1, durante la entrada y salida en diferentes líneas celulares endoteliales (13–16). Además, la activación de las GTPasas Cdc42 y Rac1 inducida por la unión de DENV en células HMEC-1(17), desencadena la reorganización de actina y la formación de filopodios para permitir la entrada del virus (18). En esta misma línea celular, la infección por DENV y el tratamiento directo con la proteína NS1, aumentan la permeabilidad transendotelial. Dicho efecto se debe principalmente a que hay fosforilación de RhoA y pérdida de la proteína VE-Cadherina, encargada de mantener las uniones interendoteliales (19).

En células fibroblásticas infectadas con DENV, los microtúbulos y sus proteínas motoras asociadas, dinamina y dineína, mostraron ser esenciales para la entrada viral y el tráfico retrógrado, respectivamente (15). Asimismo, la integridad de los microtúbulos se considera necesaria para la entrada, replicación y salida del DENV, ya que estos pasos de la infección se interrumpen cuando las células se tratan con inhibidores de microtúbulos (13,15). Por otro lado, algunos hallazgos indican que los filamentos intermedios de vimentina co-localizan con el retículo endoplásmico, la proteína NS4A y el RNA bicatenario viral (dsRNA), lo que sugiere que el reordenamiento de vimentina inducido por la infección por DENV es importante para la formación de los complejos replicativos (RC) (20). Además, se ha reportado que los cambios de vimentina inducidos por este virus podrían estar mediados por la activación de la quinasa ROCK (21).

En la búsqueda de nuevas alternativas antivirales para el control de la infección por DENV, la investigación de los denominados antivirales dirigidos al hospedero (HTA, por sus siglas en inglés) ha demostrado ser muy relevante. Estos compuestos no inducen la selección de mutantes resistentes a los fármacos, pueden mostrar una actividad antiviral de amplio espectro y tendrían mecanismos de acción complementarios a los antivirales de acción directa (22,23). Además, existen evidencias de una lista extensa de productos naturales, moléculas sintéticas y semi-sintéticas como posibles HTA contra DENV (23–25), algunas de las cuales ya se encuentran en ensayos clínicos (26). Siguiendo esta misma línea de investigación, previamente hemos publicado que el compuesto semi-sintético 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol, también denominado compuesto **8** (numeración dada en el artículo original, ver estructura en la **figura 6**), tiene actividad contra DENV-2 en etapas post-infectivas ($EC_{50}=1,4 \mu\text{M}$), además de una reducción dramática en el tamaño de la placa viral y un índice de selectividad elevado ($IS=57,7$) en células Vero (27). Estos efectos podrían estar relacionados con disminución del efecto citopático, alteraciones en la eficiencia de la replicación viral y reducción de la liberación y/o la propagación intercelular, eventos donde, entre otros, la reorganización del citoesqueleto es fundamental. De manera adicional, el amplio espectro de acción antiviral de este compuesto se ha demostrado, ya que inhibe la infección de los Herpesvirus Humanos tipo 1 y 2 (27), el virus Zika (28) y el virus Chikungunya (datos no publicados), motivo por el cual se hace elemental conocer cómo dicha molécula ejerce tal efecto antiviral.

En este estudio, se encontró que el análogo del ferruginol, 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol, tiene un mecanismo de acción relacionado con HTA, posiblemente asociado a la interrupción de la traducción de la poliproteína de DENV-2 a través de la alteración de la remodelación de actina y alterando otros procesos celulares y virales relacionados con la formación de los complejos replicativos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Arbovirus

Los virus transmitidos por artrópodos, o arbovirus, son un diverso grupo de virus transmitidos por vectores (mosquitos, garrapatas o flebótomos) (29). Si bien la mayoría de las infecciones causadas por estos virus son consideradas zoonosis, el virus Dengue es una excepción, ya que los humanos son el principal vertebrado hospedero, siendo esta infección fundamental para mantener el ciclo de transmisión viral.

Los principales arbovirus que causan enfermedades en humanos pertenecen a tres familias; *Togaviridae* (género Alphavirus), *Flaviviridae* (género Flavivirus) y *Bunyaviridae* (géneros Bunyavirus, Orthobunyavirus, Nairovirus y Phlebovirus) (30). En las últimas dos décadas, se ha detectado una gran expansión en el rango territorial de dichos virus, lo que ha generado un aumento significativo en la actividad epidémica global y provocado importantes problemas de salud internacional.

La propagación y efectiva transmisión de los arbovirus en varias regiones se debe principalmente a tres elementos: el vector, el hospedero vertebrado y las condiciones del entorno ambiental (30). No obstante, los cambios demográficos y sociales en la población humana han tenido el mayor impacto en la reactivación de estas infecciones.

2.2 Género Flavivirus: generalidades

El género flavivirus, perteneciente a la familia *Flaviviridae*, está conformado aproximadamente por un grupo de 50 arbovirus. Desde la perspectiva de las enfermedades humanas, entre los flavivirus que son motivo de preocupación para la salud mundial se encuentran: virus dengue (DENV), virus del Nilo Occidental (WNV), virus Zika (ZIKV) y virus de la fiebre amarilla (YFV) (31). Otros, incluido el virus de la encefalitis japonesa (JEV), virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV), virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV) y el virus de la encefalitis de St. Louis (SLEV) suelen estar restringidos a regiones específicas.

Estructuralmente, estos virus son pequeñas partículas esféricas (~ 50 nm), que contienen una cadena simple de RNA genómico de polaridad positiva ((+) ssRNA), el cual codifica tres proteínas estructurales (C, PrM/M y E) y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). Como se ilustra en la **figura 1**, el ciclo replicativo general de los flavivirus inicia con la unión de la proteína E a los receptores (TIM-1, AXL, DC-SIGN, receptor de manosa o heparán sulfato) presentes en la membrana celular. Una vez adheridas las partículas virales, se desencadena el proceso de endocitosis seguido de la fusión de membranas (dependiente de pH) en el endosoma, lo que facilita la liberación del RNA viral en el citoplasma (32).

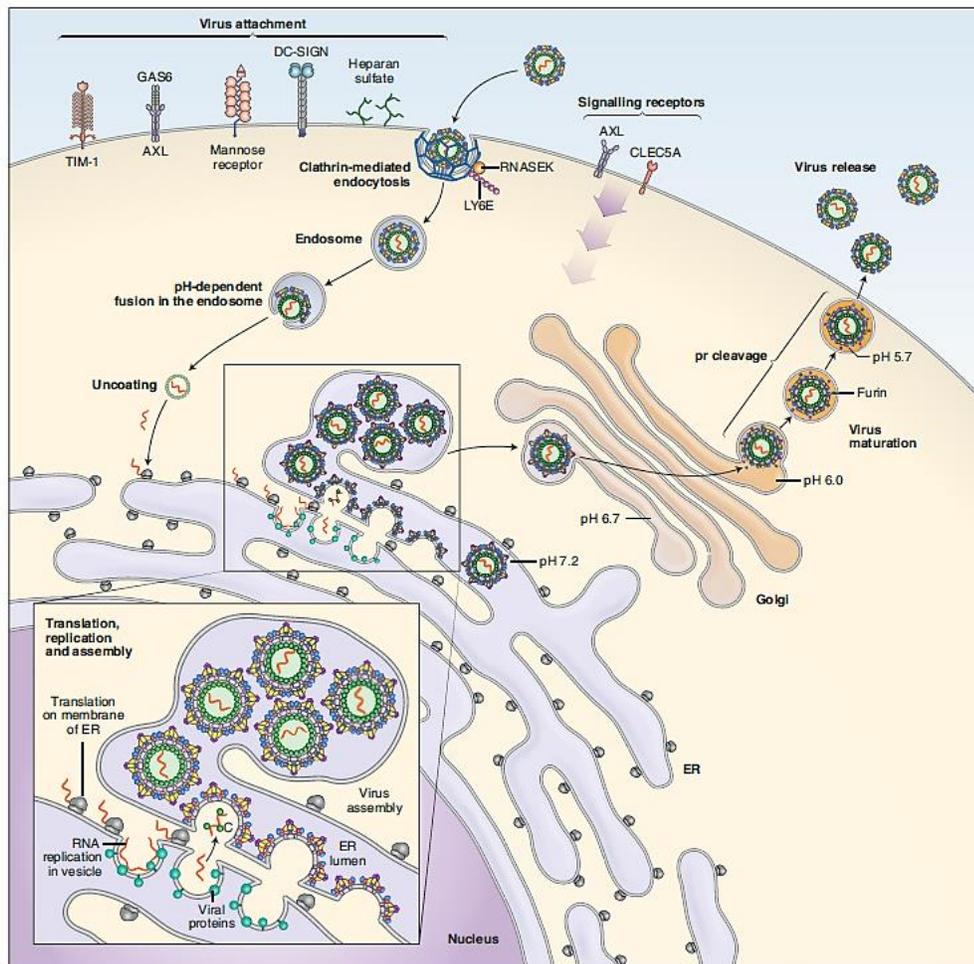


Figura 1. Ciclo replicativo de los flavivirus.

(Tomado de: Pierson and Diamond. Nat Microbiol. 2020;5(6):796-812)

El complejo de replicación (RNA viral, proteínas no estructurales y factores celulares) se forma en asociación con membranas intracelulares y se ha reportado que los eventos de traducción y replicación del genoma viral se realizan en paquetes vesiculares derivados del retículo endoplasmático (ER) (33). El ensamblaje de la cápside con los nuevos genomas ocurre en el lumen del ER, seguido del paso de las nuevas partículas virales a través del aparato de Golgi; en este proceso el virus obtiene su envoltura, en la que están ancladas el precursor de la proteína de membrana (prM) y la proteína E. El proceso de maduración viral inicia en la red *trans*-Golgi donde la prM es separada por proteasas celulares (34). Finalmente, cuando el virus es liberado, el pH neutro del espacio extracelular induce el desprendimiento del péptido pr y la proteína E adquiere su conformación final, que puede ser reconocida por los receptores de otra célula susceptible e iniciar un nuevo ciclo de infección.

2.3. Virus Dengue: clasificación clínica

El virus dengue (DENV) es actualmente uno de los causantes de arbovirosis más importantes del mundo y su incidencia ha aumentado aproximadamente 30 veces en las últimas décadas debido a la expansión geográfica de los mosquitos responsables de su transmisión, *Aedes aegypti* y *A. albopictus*. A la fecha, se han identificado cuatro virus dengue estrechamente relacionados, pero antigénicamente distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4), que causan un espectro de enfermedad muy similar en humanos (35).

La enfermedad del dengue se clasifica clínicamente como dengue con o sin signos de alarma y dengue grave. Esta clasificación fue emitida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2009 con el propósito de mejorar el manejo clínico. Además, esta enfermedad también se puede dividir en tres fases diferentes: fase aguda (febril), fase crítica (extravasación plasmática) y fase de convalecencia (36). El riesgo de infección por DENV se presenta principalmente en áreas tropicales y subtropicales de América Central, América del Sur, África, Asia y Australia, con nuevos casos que ocurren y se propagan hacia áreas no endémicas como Estados Unidos y Europa (37) .

Se han realizado diversos esfuerzos para contrarrestar la propagación del DENV mediante el control biológico y químico de los mosquitos y la reciente implementación de una vacuna tetravalente. No obstante, estas estrategias pueden causar ciertas consecuencias, como la selección de vectores resistentes (3) y un mayor riesgo de progresión de la enfermedad a estados más graves (4). Además, al no existir un tratamiento antiviral disponible para el

manejo de estas infecciones, las epidemias de dengue imponen altos costos a los servicios de salud y a los sistemas económicos de los países afectados.

2.3.1 Epidemiología

Según lo reportado en la Plataforma de Información en Salud para la Américas (PLISA) de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la OMS, en el transcurso del año 2020 se han reportado en total 2,201,350 casos de Dengue en las Américas, de los cuales 5,262 se diagnosticaron como dengue grave, dejando un saldo de 900 defunciones (38).

En el territorio colombiano, durante la semana epidemiológica 49 de 2020 se notificaron 576 nuevos casos probables de dengue. En el sistema se encuentran reportados hasta el momento 76,518 casos, 37,646 (49,2%) sin signos de alarma, 38,005 (49,7%) con signos de alarma y 867 (1,1%) de dengue grave; con co-circulación de los cuatro serotipos en el país (39).

2.3.2 Interacción virus-célula: importancia del sistema de endomembranas y el citoesqueleto

Los virus son mucho más simples que incluso los microorganismos más pequeños y carecen de sistemas biosintéticos y generadores de energía necesarios para su existencia independiente; por esta razón, los virus son parásitos intracelulares obligados que requieren infectar organismos vivos para llevar a cabo una infección exitosa (40).

En el curso de su ciclo replicativo, los virus pueden modular una amplia variedad de procesos celulares que abarcan: remodelación del sistema de endomembranas (41) cambios en la dinámica del citoesqueleto (42), modulación de expresión de genes y proteínas del hospedero (43), inducción de apoptosis y autofagia (44,45), activación del ciclo celular (46), evasión de la respuesta inmune (47), inducción de la transición epitelial a mesenquimal (EMT) (48) y regulación del metabolismo lipídico (49).

Específicamente, los virus con genoma de RNA requieren la participación de estos factores celulares para lograr prácticamente todos los pasos del ciclo replicativo, incluida la entrada y liberación del material genético, la traducción, el procesamiento de poliproteínas, la replicación del genoma, el ensamblaje y la liberación de la nueva progenie viral (50).

Para adherirse e ingresar al hospedero, los virus necesitan emplear receptores celulares. Los receptores de Heparán sulfato son los más empleados por varias familias de virus, incluido

el DENV (51). El virus dengue utiliza diferentes vías de entrada según el serotipo y el tipo de célula que infecta; algunos de los mecanismos empleados son: endocitosis mediada por receptores, endocitosis dependiente de clatrina, dependiente de dinamina (independiente de clatrina, caveolas o balsas lipídicas) y macropinocitosis (52).

Aunque casi todas las estructuras celulares son esenciales para la traducción/replicación del genoma, ensamblaje, maduración y liberación de estos virus, el sistema de endomembranas es el más notable. Después de la internalización de los viriones y la liberación del genoma viral en el citoplasma, por regla general, todos los virus ssRNA (+) modifican el sistema de endomembranas (53), con el fin de asegurar un ambiente adecuado para la traducción y síntesis del material genético y evitar ser reconocidos por los mecanismos de defensa del hospedero.

Los virus de RNA, forman varias estructuras derivadas del sistema de endomembranas conocidas como fábricas virales (54). Particularmente para el género *Flavivirus* (DENV y WNV), se han descrito al menos dos estructuras de membranas intracelulares inducidas por virus: paquetes vesiculares (VP) y membranas convuladas (CM), donde ocurre la replicación del genoma viral y la traducción del RNA/ procesamiento de poliproteínas, respectivamente (33).

Según lo informado por los autores (33), las CM se forman por remodelación de la membrana del retículo endoplásmico, y los VP posiblemente se derivan del aparato de Golgi. La formación de estas estructuras puede ser inducida por cambios en la composición lipídica, influencia de las proteínas integrales de la membrana, actividad de las proteínas del citoesqueleto y proteínas motoras de los microtúbulos (41). Además, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi proporcionan a los virus diferentes conjuntos de proteínas celulares necesarias para el procesamiento, el plegamiento y funcionamiento de las glicoproteínas virales, como las α -glucosidasas del ER (55) y enzimas como la furina que escinden las proteínas virales para que alcancen su forma madura/activa (56).

Se conoce que muchos virus pueden provocar una reorganización del sistema de endomembranas y del citoesqueleto para generar las fábricas virales mencionadas anteriormente. Si bien algunos estudios indican que los virus no utilizan los componentes del citoesqueleto (filamentos de actina y microtúbulos) para sus ciclos replicativos (57), está ampliamente aceptado y conocido el papel crucial de este complejo macromolecular para

garantizar la entrada, tráfico (de partículas, genomas y proteínas virales), liberación y diseminación intercelular de nuevos viriones (8,11).

El DENV es el flavivirus más estudiado respecto a su interacción con la red del citoesqueleto (**figura 2**) y se ha encontrado que los filamentos de actina son el componente más destacado. Las Rho GTPasas Rac1, Cdc42 y RhoA son los principales reguladores del ensamblaje, dinámica y formación de estructuras (lamelipodios, filopodios y fibras de estrés), del citoesqueleto de actina. En células endoteliales se ha reportado que la señalización mediada por Rac1 y Cdc42 así como la reorganización de actina son esenciales para la internalización y liberación de DENV-2 (13,16,18). Así mismo, se ha reportado que en células epiteliales el tratamiento con Citocalasina D, un inhibidor de la polimerización de actina, afecta la entrada de DENV-2 (15).

En células HMEC-1, la infección por DENV, así como el tratamiento directo con la proteína NS1 de este virus, aumentan la permeabilidad transendotelial. Este efecto se debe principalmente a que hay fosforilación de RhoA y pérdida de la proteína VE-Cadherina, encargada de mantener las uniones inter-endoteliales (19). Por lo tanto, es probable que la internalización de VE-Cadherina y la contractilidad del citoesqueleto mediada por RhoA contribuyan a la permeabilidad vascular durante la enfermedad del dengue.

De manera consistente, se ha demostrado que durante la infección por DENV-2 en una línea celular de hepatocitos se desencadena la activación de la ruta PI3K/Akt/Rho GTPasas. Como resultado, se genera la activación simultánea de las Rho GTPasas Rac1 y Cdc42, produciendo un fenotipo combinado de lamelipodios y filopodios a partir de la remodelación de actina (14). Además, la alteración de la vía de señalización PI3K/Akt/Rho GTPasas y de los filamentos de actina empleando inhibidores químicos, redujo significativamente la nueva progenie viral (14).

En células P388D1 de tipo macrófago, se ha evidenciado que la potenciación dependiente de anticuerpos (ADE, por sus siglas en inglés) inducida por DENV depende de la actina y de Rab5 en el endosoma. Empleando imagenología de células vivas, se detectaron protuberancias en la membrana celular mediadas por actina para facilitar la captación del virus unido a los anticuerpos (58). Otro trabajo identificó una interacción entre la actina de 43 kDa y el dominio III de la proteína E de DENV-2, en donde la red de actina se reorganizó después de 1 hora de infección en células ECV304, lo que indica que un contacto directo

entre estas dos proteínas puede tener una función crucial en la infección (59). Estos hallazgos sugieren que el citoesqueleto de actina es importante durante la infección por DENV y posiblemente induce un cambio fenotípico comparable al reportado en la EMT, siendo una de las causas de la permeabilidad endotelial que conduce a la pérdida de plasma durante los casos graves de la infección.

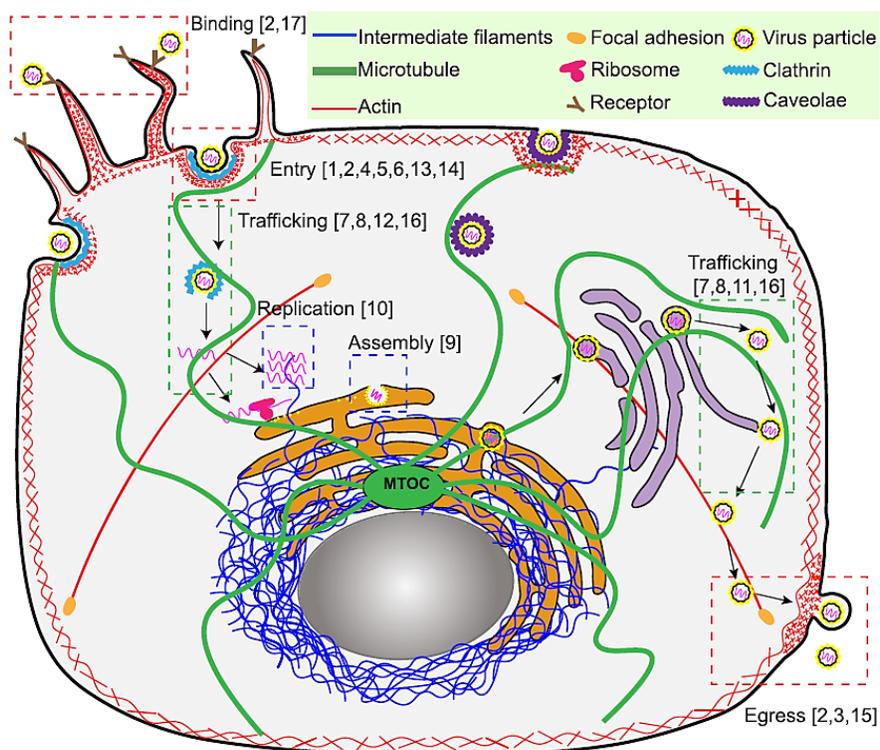


Figura 2. Esquema de la regulación del citoesqueleto durante la infección por flavivirus.

(Tomado de: Zhang et al. *Virologia Sinica*. 2019; 34(1): 30-41)

Un estudio centrado en el papel de los microtúbulos y su proteína motora dineína en eventos iniciales de la infección por DENV-2 en células BHK-21, revela una asociación de la proteína E con la subunidad α -tubulina a partir de las 8 horas post-infección (h.p.i), lo que indica que la proteína recién traducida es transportada por los microtúbulos (60). De igual forma, la integridad de los microtúbulos se considera necesaria para la entrada, replicación y salida del DENV, ya que estos pasos de la infección se interrumpen cuando las células se tratan con inhibidores de los microtúbulos (13,15).

La participación de los filamentos intermedios del citoesqueleto en la replicación de DENV ha sido menos explorada, no obstante, se cree que los filamentos intermedios de vimentina

están involucrados en la infectividad y replicación de este virus. Se ha evidenciado una interacción directa entre la vimentina y la proteína no estructural 4A (NS4A) de DENV, un componente importante del complejo de replicación (20). Por otra parte, se ha demostrado que la vimentina está involucrada en el ensamblaje de partículas DENV-2 (61). Además, se encontró que la proteína NS1 de DENV tiene una fuerte asociación con vimentina, jugando un papel crucial tanto en la replicación como en la liberación del virus (62).

En las últimas dos décadas, el estudio y la investigación de la célula y los virus se ha enfocado de manera diferente, considerando a la célula como la unidad estructural y funcional de la infección viral (15). Por tanto, este panorama permite apreciar la importancia de los factores, compartimentos y estructuras celulares, así como su interacción con los virus para permitir una infección exitosa. Asimismo, aporta conocimiento sobre una gran cantidad de posibilidades terapéuticas que permiten abordar, desde otro frente de batalla, la constante lucha en el desarrollo de nuevos antivirales; especialmente ahora que el mundo está enfrentando la pandemia causada por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2.

2.4 Estrategias antivirales para el control del virus dengue

2.4.1 Potencial de las pequeñas moléculas como medicamentos

Desde el descubrimiento de las pequeñas moléculas para bloquear eventos fisiopatológicos, sus ventajas han sido notables, incluyendo buena absorción, biodisponibilidad y distribución (63). Las propiedades particulares de estas moléculas como el pequeño tamaño (del orden de 1 nm) y el bajo peso molecular (menos de 900 daltons) les permiten atravesar membranas celulares, buena permeabilidad intestinal, rápida disolución en agua y metabolismo moderado a bajo (64,65).

Debido al sitio de acción altamente específico de estos compuestos, pueden usarse como sondas moleculares para diseccionar la fisiología celular y, por lo tanto, podrían ser útiles como agentes terapéuticos. Por lo general, desde el punto de vista farmacológico, una molécula pequeña actúa como un efector al unirse a biomacromoléculas específicas, alterando su actividad/función (66).

La mayoría de los medicamentos aprobados actualmente por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) son pequeñas moléculas y solo algunos de ellos son proteínas o péptidos. Esto es importante considerando que una de las ventajas de

esta clase de fármacos, es que estos se pueden ingerir por vía oral y no es necesaria la administración parenteral (67).

2.4.2 Antivirales dirigidos al hospedero vs antivirales de acción directa

Desde una perspectiva evolutiva, los virus RNA mutan a un ritmo mucho más rápido que las células que infectan (**figura 3**), siendo esta característica fundamental en el proceso de patogénesis. La principal razón por la que esto ocurre está relacionada con la tasa de error de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) y la transcriptasa inversa (RT) utilizadas por estos virus, que es aproximadamente tres órdenes de magnitud más alta que las DNA polimerasas dependientes de DNA (68).

Además, los virus RNA existen en la naturaleza como cuasiespecies, es decir, como distribuciones dinámicas de genomas virales no idénticos, pero estrechamente relacionados entre sí sometidos a un proceso continuo de variación genética, competición y selección. Estas características otorgan a las poblaciones virales cierta capacidad de adaptación que les permite escapar de las presiones del hospedero, como la respuesta inmune, los tratamientos antivirales y la vacunación (69).

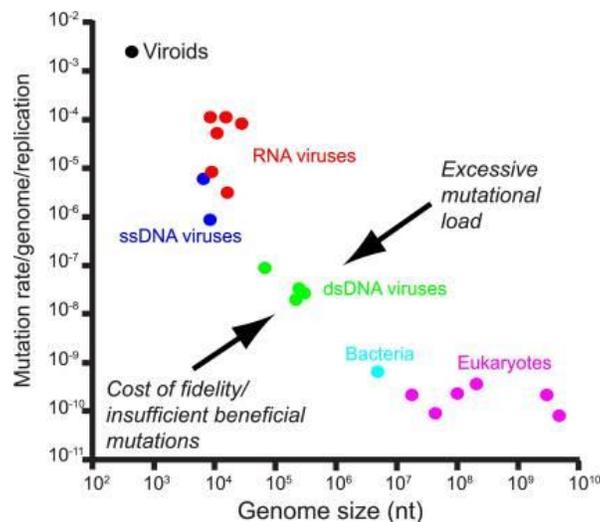


Figura 3. Relación entre la tasa de error y el tamaño del genoma en diferentes sistemas genéticos, incluidos los virus.

(Tomado de: Holmes EC. J Virol 2011;85:5247–5251).

Desde el inicio de la búsqueda y desarrollo del primer fármaco antiviral en la década de 1970, el principal enfoque para encontrar antivirales ha consistido en alterar proteínas o genes virales. Este camino se ha empleado para asegurar la selectividad y especificidad antiviral,

debido a que, como se ha descrito previamente, los virus tienen una gran dependencia de su hospedero lo que limita el número de dianas disponibles para la terapia (70). Actualmente, esta afirmación está bajo revisión, ya que existe amplia evidencia sobre el potencial de los factores del hospedero como dianas antivirales, especialmente para prevenir y tratar infecciones causadas por virus RNA.

Los antivirales de acción directa (DAA, por sus siglas en inglés) se emplean tradicionalmente para tratar infecciones causadas por virus como el virus de inmunodeficiencia humana (HIV), el virus de la hepatitis C (HCV) y el virus de la influenza (IV), lo que resulta en la erradicación de variantes susceptibles a estos medicamentos; sin embargo, esta terapia deja espacio para la selección y expansión de poblaciones menores que pueden desarrollar resistencia, lo que lleva al fracaso del régimen antiviral (69). Asimismo, y con muy pocas excepciones, esta terapia es específica de virus y, por lo tanto, solo algunos DAA tiene actividad antiviral de amplio espectro. Lo anterior, representa una estrategia poco eficaz en cuanto al tiempo de desarrollo y el dinero invertido, ya que requiere la producción de varios fármacos para el tratamiento de diferentes serotipos de virus (incluso si pertenecen a la misma familia viral), siendo este proceso lento y costoso.

Por otro lado, los antivirales dirigidos al hospedero (HTA, por sus siglas en inglés) proporcionan una estrategia interesante y novedosa contra los virus RNA, ya que los factores del huésped tienen una alta barrera genética a la resistencia (son genéticamente más estables que los factores virales) (22). Además, los HTA tienen actividad antiviral de amplio espectro, ya que los virus que pertenecen a la misma o diferentes familias virales pueden emplear los mismos factores del hospedero. Otra ventaja importante, es que estas moléculas tienen mecanismos de acción diferentes y complementarios a los DAA que ya se encuentran en desarrollo clínico y, por tanto, pueden actuar de forma sinérgica apoyando la terapia antiviral combinada (71). Por último, muchos compuestos catalogados como HTA son medicamentos aprobados por la FDA para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, inflamatorias y el cáncer, lo que asegura que estos tengan mínimos o nulos efectos adversos (72). En la **figura 4** se muestra una lista comparativa de características entre HTA y DAA.

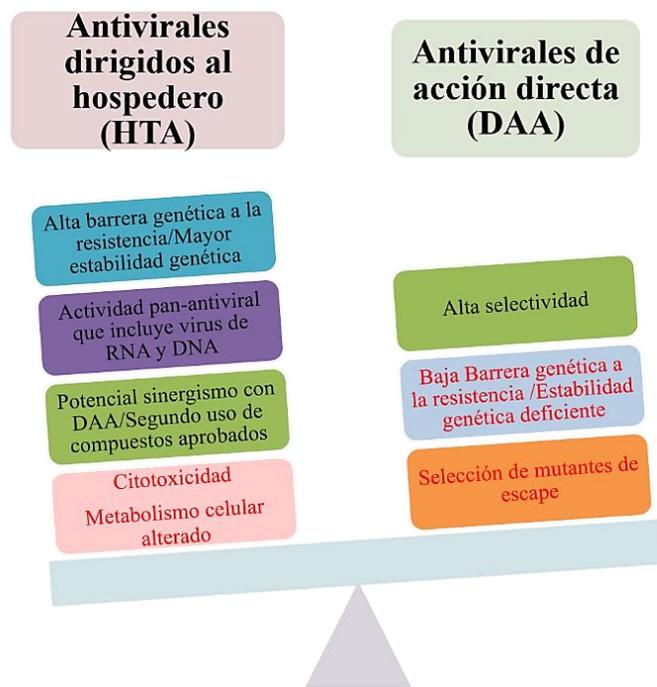


Figura 4. Ventajas y desventajas de HTA vs DAA.

(Adaptado de: Roa-Linares et al. 2020. En revisión)

Muchos de los antivirales dirigidos hacia el hospedero avalados por la FDA son medicamentos basados en interferón (INF) y han sido desarrollados para el control de enfermedades crónicas como HIV, virus del papiloma humano (HPV), virus de la hepatitis B (HVB) y HCV (74).

Para el tratamiento de enfermedades agudas como el dengue, algunos compuestos como Modipafant, un antagonista de la activación del receptor del factor activador de plaquetas (PAFR), el cual se cree está implicado en la patogenia del dengue grave a través de la inflamación, y celgosivir un derivado natural que inhibe la proteína α -glucosidasa I, necesaria para el plegamiento de las glicoproteínas virales, se encuentran actualmente en ensayos clínicos fase II (75). Estos dos compuestos se seleccionaron para el desarrollo clínico por la seguridad que han demostrado previamente en humanos y porque inhiben la replicación del virus dengue *in vitro* y mejoran la supervivencia en modelos *in vivo* (76,77).

2.4.3 Derivados de plantas como antivirales de amplio espectro

Los productos naturales derivados de plantas son utilizados como primera opción de tratamiento por alrededor del 80% de la población mundial, principalmente en los países en desarrollo. Su papel en la medicina tradicional ha sido reconocido desde la antigüedad, teniendo en cuenta que estos productos proporcionan opciones ilimitadas para encontrar y desarrollar nuevos agentes terapéuticos debido a su amplia disponibilidad y diversidad química (78). Como se puede observar en la **figura 5** diversas publicaciones han descrito una extensa lista de derivados de plantas y otros productos naturales con amplio espectro antiviral.

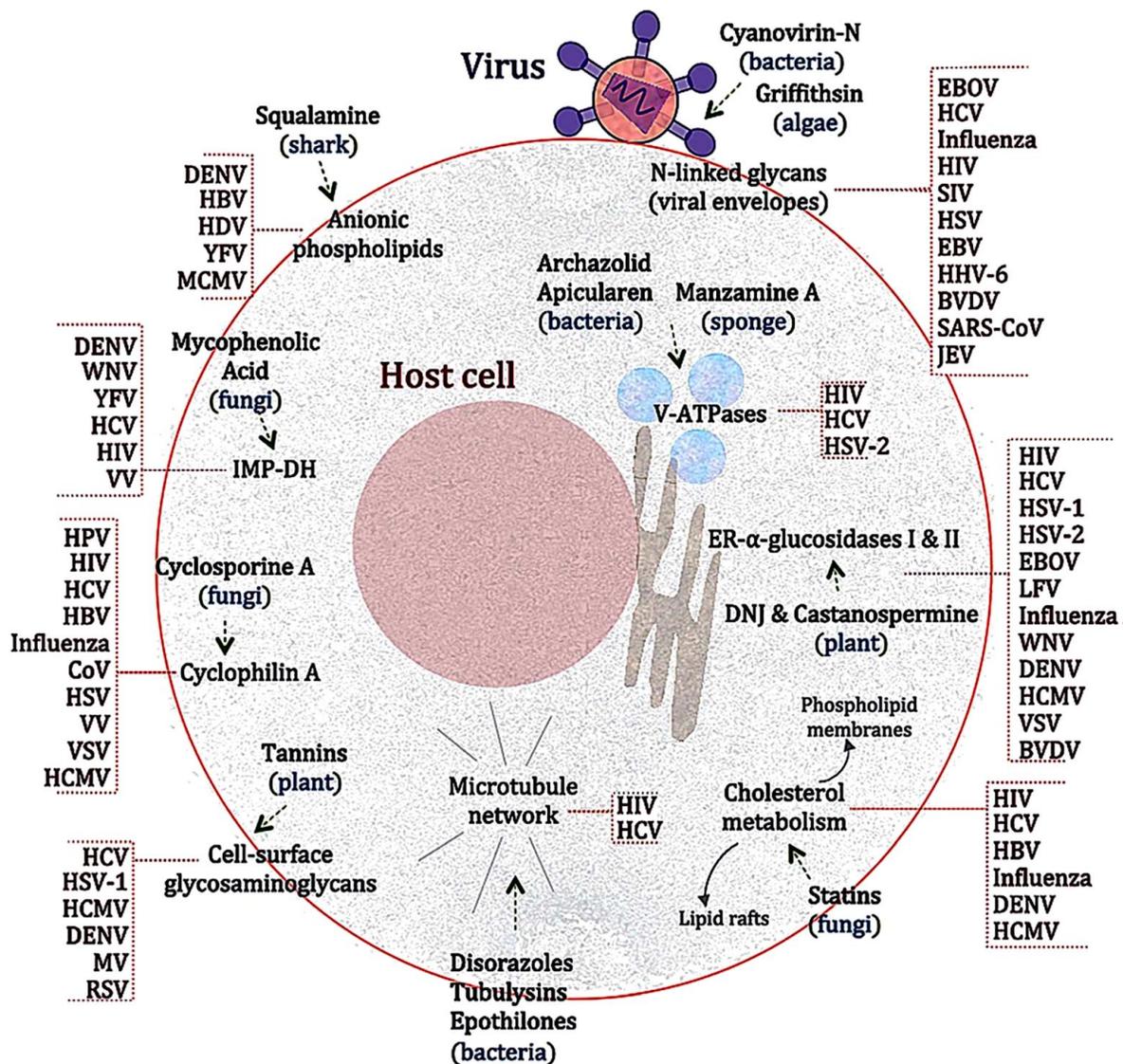


Figura 5. Productos naturales con sus principales dianas y espectros de actividad antiviral.

(Tomado de: Martinez et al. Nat Prod Rep. 2015;32(1):29-48).

Lin y colaboradores informaron que el ácido chebulágico y la punicalagina, dos taninos hidrolizables aislados a partir de *Terminalia chebula* han mostrado ser activos contra DENV, (79). Se ha descrito que la castanospermina, un alcaloide aislado del castaño *Castanospermum australe* y su derivado, el celgosivir, inhiben la replicación de múltiples virus *in vitro* e *in vivo*, incluidos los flavivirus DENV y WNV. En células de mamíferos, estos compuestos bloquean la función de las α -glucosidasas I y II de ER; por lo tanto, se sugiere el mecanismo antiviral puede ser la alteración del plegamiento de algunas glicoproteínas virales, lo que afecta la maduración de los viriones y reduce la infectividad (77).

La curcumina (*Curcuma longa*) tiene efectos sobre varios sistemas celulares como el citoesqueleto, el sistema ubiquitina-proteasoma o la inducción de apoptosis, interfiriendo en diferentes procesos de la infección por DENV-2 (80). La baicalina, un flavonoide derivado de *Scutellaria baicalensis* y el principal metabolito de la baicaleína liberado tras su administración en diferentes modelos animales y humanos, interfiere e inhibe la replicación *in vitro* en diferentes estadios del ciclo replicativo de DENV-2 (81).

2.5 Actividad antiviral del ferruginol y análogos

El ferruginol (**figura 6**), es un fenol diterpenoide aislado a partir de plantas pertenecientes a las familias *Podocarpaceae*, *Cupressaceae*, *Lamiaceae* y *Verbenaceae*. Esta molécula tiene un amplio espectro de actividad biológica, tales como antibacteriana, antifúngica y antimicrobiana, acaricida, cardioactiva, antioxidante, antiplasmodio antileishmania, nematocida, antiulcerosa y citotóxica sobre células tumorales, entre otras (82). Sin embargo, existen pocos reportes relacionados con la actividad antiviral del ferruginol y sus análogos. Previamente hemos reportado que dos análogos del ferruginol (**figura 6**), el 18-(ftalimida-2-il) ferruginol (**compuesto 8**) y el 18-oxoferruginol (**compuesto 9**), controlan la infección *in vitro* por los Herpesvirus Humanos tipo 1 y 2 y dengue serotipo 2, cuando se adicionan en etapas posteriores a la infección. Además, el compuesto **8** redujo significativamente el tamaño de la placa viral cuando se trataron células infectadas con DENV-2 (27). Estos hallazgos derivaron en la publicación de una patente (82) debido a que este fue el primer reporte de actividad antiviral de esta clase de compuestos.

El compuesto el 18-(ftalimida-2-il) ferruginol, presenta una sustitución con un grupo ftalimida en el anillo A del ferruginol, específicamente en el carbono 18, tal como se señala en la **figura 6**. La ftalimida, con fórmula química $C_6H_4(CO)_2NH$, es una imida derivada del ácido ftálico con dos grupos carbonilo unidos a una amina secundaria. Estos compuestos son hidrofóbicos y neutros, y por tanto, puede atravesar membranas biológicas *in vivo* con facilidad (83). Entre las estructuras heterocíclicas, las ftalimidias son de particular interés biológico y se han reportado como herbicidas, insecticidas y agentes antiinflamatorios. Además, estas moléculas y algunos de sus derivados se caracterizan por tener actividad antibacteriana, antifúngica, analgésica, antitumoral, ansiolítica, hipolipemiante y analgésica, así como por presentar bajos efecto tóxicos en ensayos con animales (84).

Estudios adicionales realizados por la Línea de Actividad Biológica de Productos Naturales del GMMT, sugieren el potencial amplio espectro antiviral del compuesto **8**, ya que inhibe la infección por virus Zika en células Vero (células epiteliales de riñón de mono verde africano) (28), PC3 (adenocarcinoma de próstata) y HeLa (adenocarcinoma de cérvix) a concentraciones de 12,5 μM y 6,25 μM , respectivamente (datos no publicados). Así mismo, esta molécula tiene actividad antiviral en células Vero infectadas con CHIKV (género *Alphavirus*) a una concentración de 10 μM (datos no publicados).

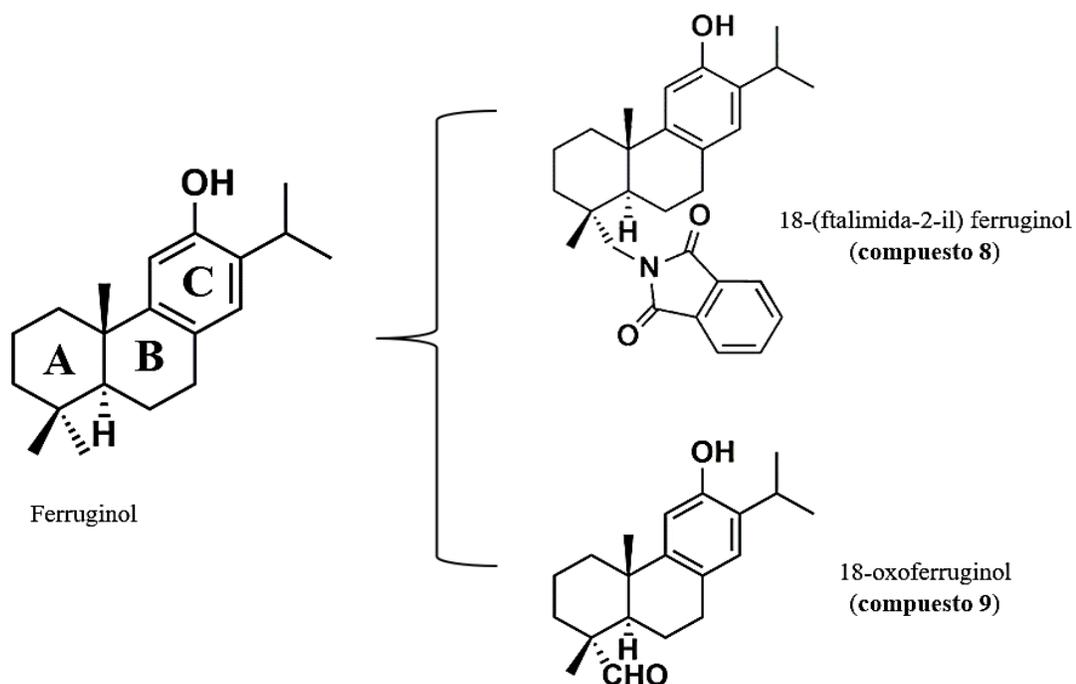


Figura 6. Estructura química del ferruginol y de dos de sus análogos, 18-(ftalimida-2-il) ferruginol (compuesto 8) y 18-oxoferruginol (compuesto 9).

Por otra parte, se ha demostrado el efecto antiviral de ciertos diterpenos tipo abietano, entre ellos el ferruginol, durante la infección *in vitro* por el coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) (85). Lo anterior hace promisorio el uso de este tipo de moléculas para combatir las infecciones por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2 (86).

2.5.1 Mecanismos de acción reportados

Estudios previos sugieren que el mecanismo antitumoral del ferruginol en la línea celular de leucemia K562, está relacionado con su capacidad de potenciar la expresión de la proteína proapoptótica BAX. Se ha reportado que este compuesto inhibe dos vías de señalización implicadas en la supervivencia y proliferación celular (Ras/PI3K y Jak/STAT) y que disminuye la expresión de ciclinas dependientes de quinasas, conllevando a la detención del ciclo celular específicamente en la fase G0/G1 (87).

También se ha descrito que la actividad gastroprotectora de esta molécula es debida a la reducción de la acidez estomacal y a la mejora de la capacidad antioxidante en la mucosa gástrica (88,89). De forma adicional, se ha evidenciado que el mecanismo antioxidante del ferruginol está relacionado con la inhibición de la oxidación al atrapar radicales libres y evitar su propagación (90). No obstante, la base celular o molecular por la cual el ferruginol o sus análogos presentan actividad antiviral aún no ha sido descrita.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar el potencial mecanismo de acción antiviral del compuesto 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol durante la infección *in vitro* por el virus dengue serotipo 2.

3.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto antiviral del 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol sobre uno o varios ciclos replicativos.
- Identificar la interacción *in silico* del 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol con dianas celulares y virales necesarias para la infección viral.
- Determinar el efecto del 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol en la síntesis de proteínas virales y en la replicación del genoma viral durante el curso temporal de la infección.
- Evaluar el efecto morfológico y molecular del 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol sobre elementos del citoesqueleto y el retículo endoplasmático.
- Describir el efecto del compuesto 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol sobre la integridad celular en presencia o ausencia de la infección viral.

4. HIPÓTESIS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

4.1. Hipótesis nula

El análogo del ferruginol, 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol, no inhibe factores celulares y virales durante la infección *in vitro* por el virus dengue.

4.2. Hipótesis alternativa

El análogo del ferruginol, 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol, inhibe factores celulares y virales durante la infección *in vitro* por el virus dengue.

4.3 Planteamiento del problema

En las últimas dos décadas, el aumento de enfermedades causadas por arbovirus ha aumentado considerablemente, por factores concernientes al cambio climático, desplazamiento continuo de la población humana, fallas en el control del vector, elevada tasa de mutación viral, entre otros (91). Una de las principales arbovirosis en el mundo es la causada por el virus dengue. El dengue se presenta en los climas tropicales y subtropicales de todo el planeta, sobre todo en las zonas urbanas y semiurbanas. Si bien esta es una enfermedad aguda y que en la mayoría de los casos se auto resuelve, la infección grave es una complicación potencialmente mortal porque cursa con extravasación de plasma, acumulación de líquidos, dificultad respiratoria, hemorragias graves o falla orgánica (1).

A pesar de las estrategias de prevención implementadas hasta el momento (erradicación del mosquito vector y aprobación de una vacuna tetravalente), aún existen muchas dificultades para evitar la expansión del virus. Por otra parte, no hay medicamentos disponibles para el tratamiento de esta enfermedad cuando ya se ha establecido la infección. Tradicionalmente, la búsqueda de antivirales se ha dirigido a alterar proteínas o genes específicos de los virus, no obstante, el uso de esta estrategia contra virus con genoma de RNA, puede derivar en la selección de mutantes resistentes a dichos fármacos (69). Considerando este problema, la investigación antiviral se ha redireccionado al estudio de pequeñas moléculas (derivadas de productos naturales, sintéticas o semi-sintéticas) que afecten blancos del hospedero (25), ya que los virus son altamente dependientes de la maquinaria metabólica de las células que infectan.

Los antivirales dirigidos hacia blancos celulares, se caracterizan por tener un amplio espectro de acción, y por ende controlan la infección de virus pertenecientes a diferentes géneros y familias virales; tal es el caso del compuesto celgosivir, un derivado natural que afecta la proteína α -glucosidasa I, necesaria para el plegamiento de las glicoproteínas de DENV y que ya se encuentran en fase II de estudios clínicos (75).

Siguiendo esta misma línea estudio, en nuestro grupo de investigación se ha determinado la actividad antiviral de una pequeña molécula semi-sintética, el compuesto 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol, cuyo potencial amplio espectro antiviral ha sido demostrado (27,28), ya que inhibe la infección de virus DNA (Herpesvirus) y RNA: Flavivirus (DENV, ZIKV) y Alphavirus (CHIKV), lo que hace necesario determinar el mecanismo de acción por el cual ejerce dichos efectos.

El presente trabajo de investigación tiene como propósito explorar el potencial mecanismo de acción antiviral del compuesto 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol durante la infección *in vitro* por el virus dengue serotipo 2. Para tal fin, se llevarán a cabo ensayo *in vitro*, empleando líneas celulares de hámster y humanas para evaluar el efecto de esta molécula sobre uno y varios replicativos del virus, así como en procesos específicos que incluyen la síntesis de proteínas y replicación del genoma viral. Además, se identificará la interacción *in silico* del compuesto en estudio con dianas celulares y virales requeridas para la infección por DENV. Las interacciones encontradas se confirmarán evaluando el efecto morfológico y molecular, así como el impacto del compuesto sobre la integridad celular en presencia o ausencia de la infección.

Lo anterior, permitirá esclarecer el interrogante sobre si esta molécula altera factores celulares (actuando como un HTA), lo cual explicaría su potencial amplio espectro de acción antiviral, o si afecta tanto factores celulares y virales que potencien su actividad.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Compuestos y reactivos

El análogo del ferruginol, 18- (ftalimida-2-il)-ferruginol (**compuesto 8**), fue sintetizado por el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Valencia-España, siguiendo la ruta de síntesis previamente reportada por González-Cardenete & Pérez-Guaita, 2012 (92). La ribavirina (Riba) se adquirió de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA.). El ácido micofenólico (MPA), la citocalasina D (CytD), el nocodazol (NZ) y el taxol (TX) se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA.). El NITD008 y la cicloheximida (CHX) fueron proporcionados por el Dr. Mariano García-Blanco (Department of Biochemistry and Molecular Biology, UTMB, Galveston). Las soluciones stock de todos los compuestos se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO, Merck KGaA, Alemania) y se congelaron a -20°C hasta su uso. La concentración de DMSO en los ensayos biológicos fue igual al 0,05%. Controles celulares con DMSO (0,05%) fueron incluidos en todos los experimentos.

El Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), el medio Leibovitz (L-15), el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) y el reactivo XtremeGENE™ HP DNA Transfection Reagent fue suministrado por Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, USA). El suero bovino fetal (FBS) y el antibiótico Penicilina-Estreptomicina (PS), fueron provistos por Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, USA). El FluorSave se obtuvo de Calbiochem (La Jolla, USA).

El anticuerpo anti-envoltura de DENV producido en células 4G2 de hibridoma (anti-ENV policlonal) fue donado por la Dra. Eva Harris y Robert Beatty (Universidad de California, Berkeley). El anti-dsRNA mAb J2 se obtuvo de Scicons (Budapest, Hungría). El anticuerpo monoclonal anti- α/β -tubulina, el anti-NS3 mAb, los anticuerpos secundarios (Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 594), la micotoxina faloidina conjugada con Alexa Fluor 594 y la sonda Hoechst 33258 se adquirieron de Molecular Probes Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, USA). Los anticuerpos anti-vimentina y anti-KDEL fueron suministrados por la empresa Abcam. El kit de anexina V conjugada a ficoeritrina (PE) fue suministrado por la casa comercial BD Pharmingen (USA).

5.2 Virus y líneas celulares

El virus dengue tipo 2 (DENV-2, cepa de Nueva Guinea), donado por María Elena Peñaranda y Eva Harris (Universidad de California, Berkeley) y el virus DENV-2 recombinante (cepa de Nueva Guinea) diseñado para expresar *Renilla* luciferasa (RLUC DENV-2), suministrado por Mariano García-Blanco (Department of Biochemistry and Molecular Biology, UTMB, Galveston), se amplificaron en células C6/36 HT (*Aedes albopictus*-ATCC® CRL-1660™) y fueron titulados en células BHK-21 (riñón de hámster -ATCC® CCL-10™) de acuerdo con nuestras condiciones de laboratorio (27). Para la determinación de potenciales mecanismos de acción, se emplearon células Huh-7 (carcinoma hepatocelular humano) y Huh-7 que expresan establemente un replicón subgenómico de DENV-2 y que contienen el gen reportero de luciferasa (Huh-7 Rep DENV-2).

Las células BHK-21, Huh-7 y Huh-7 Rep DENV-2, se mantuvieron en DMEM suplementado con 10% de FBS inactivado y las células C6/36 HT se mantuvieron con medio L-15 suplementado al 10% de FBS inactivado. Los medios de cultivo se suplementaron además con penicilina (100 unidades/mL) y estreptomicina (100 mg/mL). Las células BHK-21 se incubaron a 37 °C y las células C6/36 HT a 34 °C en atmósfera humidificada de CO₂ al 5%.

5.3 Amplificación y cuantificación de stocks virales

Para la replicación y amplificación viral, se sembraron células C6/36 HT (70% de confluencia) en medio L-15 suplementado al 10% de FBS y antibióticos en frascos de 75cm², y se infectaron con una multiplicidad de infección (MOI: 0,01 PFU/célula) de DENV-2 en un volumen final de 1mL. Luego, las células se incubaron a 34°C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 2 horas y cumplido el tiempo de incubación, se adicionaron 6mL de L-15 al 2% de FBS sin retirar el inóculo viral. Transcurridos 6 días de infección y tras observar sincitios en un 50% de la monocapa celular, los sobrenadantes fueron colectados y almacenados a -70°C hasta su posterior cuantificación (27).

Con el fin de cuantificar el virus en los sobrenadantes colectados, se empleó el método de Unidades Formadoras de Placas (PFU) (93). Para ello, se sembraron 5.5×10^4 células BHK-21 en platos de 24 pozos en DMEM suplementado al 2% de FBS. Al día siguiente, se prepararon siete diluciones seriadas (1:10) de los sobrenadantes y se adicionó cada dilución por triplicado. Los platos se incubaron a 37°C en CO₂ al 5% durante 2 horas y posteriormente se descartó el inóculo viral de todos los pozos y se agregó Carboximetilcelulosa (CMC) de

mediana viscosidad al 1.5%. Al sexto día de la infección, se realizó la fijación y coloración de los platos con una solución de 3.5% de formaldehído/0.2% de cristal violeta y se cuantificaron las unidades formadoras de placas. Los títulos virales fueron expresados en PFU/mL (27).

5.4 Evaluación de la actividad antiviral

5.4.1 Ensayos de inhibición

Para evaluar el efecto antiviral del compuesto **8**, se utilizaron cuatro protocolos experimentales diferentes teniendo en cuenta las condiciones previamente estandarizadas en nuestro de laboratorio (27,94).

Pre-infección: Células BHK-21 ($5,5 \times 10^4$ células/pozo) se trataron con varias concentraciones (1,8 μ M-14,5 μ M) de la molécula durante 24 horas. Luego, el compuesto fue removido, las células se lavaron dos veces con PBS 1X y se infectaron con una MOI:0,01 PFU/célula de DENV-2 por 1 hora a 37°C (5% de CO₂) para asegurar la entrada del virus. Inmediatamente, se retiró el inóculo viral y se añadió CMC al 1,5 % y se incubaron durante 6 días a 37°C.

Adherencia: Células BHK-21 previamente incubadas durante 1 hora a 4°C, se infectaron con una MOI:1 PFU/célula de DENV-2 en presencia del compuesto (7,5 μ M-60 μ M) y se incubaron durante 1 hora (4°C). Después de la incubación, la molécula y los virus no adheridos se removieron con PBS 1X frío; posteriormente, las células se cubrieron con CMC al 1,5 % y se incubaron durante 6 días a 37°C.

Entrada: Células BHK-21 previamente incubadas durante 1 hora a 4°C, fueron inoculadas con una MOI:1 PFU/célula de DENV-2 y se incubaron durante 1 a 4°C. Pasado este tiempo, los virus no adheridos se eliminaron con PBS 1X frío, las células se trataron con diferentes concentraciones de compuesto (7,5 μ M-60 μ M) y se incubaron durante 1 hora (37°C). Los virus que no ingresaron se inactivaron usando buffer citrato (pH = 3,0) y luego se lavaron con PBS 1X; finalmente, las células se cubrieron con CMC al 1,5% y se incubaron durante 6 días a 37°C.

Cumplido el tiempo de incubación, las células se fijaron y tiñeron y se realizó el conteo de las placas. Para los ensayos de adherencia y entrada se incluyó la heparina como control positivo.

Post-infección: Células BHK-21 ($5,5 \times 10^4$ células/pozo) se inocularon con DENV2 (MOI: 0,01 PFU/célula) durante 1 hora a 37°C. Luego se realizó lavado con PBS (pH=7,0) y se adicionó el compuesto **8** ($1,8\mu\text{M}$ - $14,5\mu\text{M}$) previamente preparado en CMC al 1,5%. Después de 6 días de incubación, las células se fijaron y tiñeron para llevar a cabo el conteo de las placas. La ribavirina se incluyó como control positivo para este ensayo.

5.4.2 Curvas de crecimiento viral

La dinámica de crecimiento de DENV-2 en células BHK-21 durante uno o varios ciclos replicativos, se determinó realizando curvas de un solo paso y múltiples pasos, respectivamente (93).

Curva de un solo paso (*One-step growth curve*): Células BHK-21 ($5,5 \times 10^4$ células/pozo) se inocularon con DENV-2 (MOI:5 PFU/célula) durante 1 hora a 4°C para permitir la adherencia de los viriones y posteriormente, se incubaron a 37°C para asegurar la entrada. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron dos veces con PBS 1X, se adicionó DMEM 1X al 2% de FBS e incubaron a 37°C durante 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24 y 36 horas post-infección (h.p.i). Los sobrenadantes se colectaron en los tiempos previamente definidos y se almacenaron a -80°C hasta su posterior titulación.

Curva de múltiples pasos (*Multi-step growth curve*): Células BHK-21 ($5,5 \times 10^4$ células/pozo) se infectaron con DENV-2 (MOI:0,01 PFU/célula) durante 1 hora a 4°C para permitir la adherencia de los viriones y posteriormente, se incubaron a 37°C para asegurar la entrada de los virus. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron dos veces con PBS 1X, se adicionó DMEM 1X al 2% de FBS e incubaron a 37°C durante 24, 48, 72, 96 y 120 horas post-infección (h.p.i). Los sobrenadantes se colectaron una vez cumplidos los tiempos previamente definidos y se almacenaron a -80°C hasta su posterior titulación.

5.4.3 Ensayos de tiempo-adición

Para elucidar en cual etapa del ciclo replicativo se produce el efecto antiviral del compuesto **8**, células BHK-21 ($5,5 \times 10^4$ células/pozo) se infectaron a una MOI: 5 PFU/célula o MOI:0,01 PFU/célula de DENV-2, se incubaron durante 1 hora y posteriormente se trataron (una vez) con la molécula en diferentes momentos: 6, 12, 24 (curva sincronizada) y 24, 48, 72, 96 y 120 (curva no sincronizada) horas post infección (h.p.i). En todos los casos, los sobrenadantes

fueron colectados después de 24 horas adicionales de tratamiento y los viriones se cuantificaron mediante titulación por unidades formadoras de placa (PFU/mL). El ácido micofenólico (MPA) y la Ribavirina (Riba) se incluyeron como controles positivos.

5.5 Ensayos *in silico*

5.5.1 Acoplamiento (*Docking*) molecular

La parametrización de los ligandos, proteínas celulares y virales se realizó utilizando el software AutoDock Tools (95). Átomos de hidrógeno se adicionaron a las cadenas laterales polares y las cargas parciales se calcularon mediante la metodología de Gasteiger. Luego, se delimitó un área de interacción en los sitios de unión previamente informados con algunos inhibidores de las proteínas de estudio. El acoplamiento molecular se ejecutó empleando el programa AutoDock Vina (96), utilizando una exhaustividad (número de repeticiones) de 20 para cada par proteína-compuesto, con el fin de obtener las interacciones (enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas) y los valores de energía libre de unión en kcal/mol. La visualización de los resultados se generó con el paquete Discovery Studio.

5.5.2 Predicción de los parámetros ADME y *drug-likeness*

El compuesto **8** se sometió a un análisis *in silico* con el fin de valorar su toxicidad y seguridad, empleando la plataforma informática SwissADME disponible en el servidor <http://www.swissadme.ch/>. Esta herramienta, permite predecir un conjunto de parámetros relacionados con la lipofilidad, biodisponibilidad, y el metabolismo de la molécula, entre otros (97). Además, para predecir las características farmacológicas de este compuesto, se llevó a cabo un análisis de la similitud con los fármacos y de sus propiedades moleculares usando la herramienta *on line* Molsoft (98).

5.6 Determinación del mecanismo de acción antiviral

5.6.1 Efecto en la replicación del genoma y/o traducción de proteínas virales

Células Huh-7 Rep DENV-2 previamente sembradas en platos de 12 pozos fueron incubadas con dos concentraciones del compuesto **8** (11,2 μ M y 22,5 μ M) o NITD008 (20 μ M), durante 24, 48 y 72 horas (37°C-5% de CO₂). Una vez finalizado el tiempo de exposición, la molécula se retiró, se realizaron dos lavados con PBS 1X y se añadió Passive Lysis Buffer 1X (Biotium, USA), Buffer RIPA 1X (Cell Signaling Technology, USA) o TRIzol reagent

(Invitrogen Life Technologies, USA) a los pozos teniendo en cuenta el diseño experimental. Las muestras se congelaron inmediatamente a -80°C hasta que se efectuaron los ensayos de luciferasa, Western Blot y RT-qPCR.

5.6.2 Efecto en la entrada y traducción inicial de proteínas virales

Células Huh-7 (6×10^4 células/pozo) se sembraron en platos de 24 pozos. Un día después, fueron tratadas con el compuesto **8** ($45 \mu\text{M}$) por un periodo de 24 horas. Cumplido el tiempo de exposición, las células se lavaron dos veces con PBS 1X y se trataron con NITD008 ($20 \mu\text{M}$) durante 2 horas y CHX ($200 \mu\text{M}$) por 5 minutos, de acuerdo con el diseño experimental. Posteriormente, se llevó a cabo la infección empleando el virus recombinante RLUC DENV-2 (MOI:1 PFU/célula) durante 1 hora a 37°C (5% de CO_2), en presencia de los compuestos previamente mencionados. Luego, el virus y los tratamientos se removieron, se realizaron 5 lavados con PBS 1X y se adicionó DMEM 2% FBS en presencia de los compuestos; los platos se incubaron durante 3 horas adicionales. Finalmente, las células se lavaron 5 veces con PBS 1X y se adicionaron $50 \mu\text{L}$ de Passive Lysis Buffer 1X (Biotium, USA) agitando suavemente hasta cubrir la monocapa celular. Las muestras se congelaron inmediatamente a -80°C hasta que se realizó la lectura de la luciferasa.

5.6.3 Efecto post-infección sobre traducción de proteínas virales

Células Huh-7 (8×10^4 células/pozo) se sembraron en platos de 24 pozos. Luego, el medio se removió, las células se lavaron dos veces con PBS 1X y se trataron con NITD008 ($20 \mu\text{M}$) durante 2 horas y CHX ($200 \mu\text{M}$) por 5 minutos, de acuerdo con el diseño experimental. Terminado el periodo de incubación, las células se inocularon con RLUC DENV-2 (MOI:1 PFU/célula) durante 1 hora a 37°C (5% de CO_2), en presencia de los compuestos previamente mencionados. Posteriormente, el virus y los tratamientos se removieron, se realizaron 5 lavados con PBS 1X y se adicionó DMEM 2% FBS en presencia de los compuestos, según el caso. Los pozos correspondientes, se trataron con dos concentraciones del compuesto **8** ($11,2 \mu\text{M}$ y $22,5 \mu\text{M}$) y los platos se incubaron durante 3 horas adicionales. Finalmente, las células se lavaron 5 veces con PBS 1X y se agregó Passive Lysis Buffer 1X (Biotium, USA), Buffer RIPA 1X (Cell Signaling Technology, USA) y TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies, USA) a los pozos considerando el diseño experimental. Las muestras se

congelaron inmediatamente a -80°C hasta que se efectuaron los ensayos de luciferasa, Western Blot y RT-qPCR.

- **Ensayo de luciferasa**

Las muestras conservadas en Passive Lysis Buffer, fueron transferidas ($20\mu\text{L}$) a una microplaca de 96 pozos. Luego, se preparó la solución de trabajo empleando el kit Renilla Luciferase Assay Kit 2.0 (Biotium, USA) y se ubicó en el inyector de reactivos del lector de placas EnSpire (PerkinElmer). Un volumen de $100\mu\text{L}$ de dicha solución fue depositada en cada pozo y la actividad de la luciferasa fue determinada de acuerdo con el protocolo previamente establecido en el equipo.

- **Western blot**

Las células lisadas en buffer RIPA, se centrifugaron y la concentración de proteína presente se cuantificó empleando el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay). Las proteínas se fraccionaron en condiciones desnaturizantes en geles de acrilamida del 4 al 12% (GenScript SurePAGE, USA). Posteriormente, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se realizó el marcaje (overnight) utilizando los siguientes anticuerpos: anti-DENV-2 NS4B (GTX113375, GeneTex), anti-DENV-2 NS3 (GTX124252, GeneTex), y α -tubulina (2144S, Cell Signaling Technology). Al día siguiente, se agregaron los colorantes infrarrojos IRDye 800 CW o IRDye 680 CW y la membrana se escaneo empleando el equipo Odyssey® CLx Imaging System (LI-COR, USA).

- **PCR en tiempo real (RT-qPCR)**

El RNA se extrajo utilizando el kit Direct-zol RNA Miniprep (Zymo Research) y la transcripción inversa (RT) se efectuó empleando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific). La qPCR se realizó con una mezcla de SYBR Green PCR Máster Mix en el instrumento StepOne Plus (Applied Biosystems) para medir el RNA de DENV-2 y el RNA del gen constitutivo GAPDH. Se utilizó el método $\Delta\Delta C_T$ para calcular los niveles de expresión relativos. Los cebadores (primers) utilizados se indican en la **tabla 1**.

Primer	Secuencia 5'→3'
DENV-2 forward	GAAATGGGTGCCAACTTCAAGGCT
DENV-2 reverse	TCTTTG TGCTGC ACTAGA GTGGGT
GAPDH forward	AGCCACATCG CTCAGACAC
GAPDH reverse	GCCCAATACG ACCAAATCC

Tabla 1. Primers empleados para realizar el ensayo de qPCR.

5.6.4 Efecto sobre elementos celulares y componentes virales

Células BHK-21 (5.5×10^5 células/pozo) y Huh-7 (6×10^4 células/pozo) se sembraron sobre láminas cubreobjetos y después, se realizaron diferentes esquemas de infección y tratamiento (tiempo-adición) como se ha descrito previamente. Luego, los cristales se lavaron con tampón de citoesqueleto (CBS) y se fijaron con paraformaldehído (3,8 % peso/vol) preparado en CBS por 30 minutos (14,15). Posteriormente, las células fueron permeabilizadas con Triton X-100 (0,2 % vol/ vol), posibles sitios de unión no específicos se bloquearon con PBS (5% FBS) y se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios: proteína de envoltura viral (anti-ENV; 1:500), proteína NS3 (anti-NS3; 1:500), RNA de doble cadena (anti-dsRNA J2; 1:500), anti- α/β -tubulina, anti-vimentina y anti-KDEL (1:500). Luego, se adicionaron los anticuerpos secundarios (Alexa fluor 488 o Alexa fluor 594; 1:1000), así como faloidina conjugada a Alexa fluor 488 o 594 (marcaje de actina; 1:1000) y Hoechst 33258 (marcaje de núcleos; 1:10.000). Los anticuerpos secundarios se utilizaron para el marcaje de los elementos celulares y componentes virales, empleando las combinaciones adecuadas para diferenciar los marcajes en cada experimento. Por último, las células se lavaron con PBS y los cristales se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX83P2ZF). Las imágenes fueron procesadas con el software Image J con el fin de cuantificar la intensidad media de fluorescencia (IMF).

5.6.5 Ensayo de activación de RhoA

Células Huh-7 (1.8×10^5 células/pozo) se sembraron en platos de 12 pozos. Al día siguiente, el medio fue removido, se realizaron dos lavados con PBS 1X y se incubaron durante 24 horas adicionales con DMEM sin FBS. Cumplido este tiempo, las células se lavaron una vez con PBS y se realizó la infección con DENV-2 a MOI:1 PFU/célula durante 1 hora a 37°C. Luego de 6 y 12 h.p.i, se adicionó el compuesto **8** (11,2 μ M), y se incubó durante 24 horas

adicionales. Una vez finalizado el tratamiento, se retiró el compuesto, se realizaron tres lavados con PBS 1X y se adicionó buffer RIPA para realizar la lisis de las células. Una vez obtenidos los lisados, se cuantificó la concentración de proteína utilizando el kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) y todas las muestras se ajustaron a una concentración de 0,4 mg/mL. La activación de la proteína RhoA se determinó empleando el kit G-LISA® RhoA Activation Assay Biochem Kit™ (Absorbance Based) de Cytoskeleton, Inc.

5.7 Ensayos de integridad metabólica y celular

5.7.1 3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT)

Para determinar las concentraciones no citotóxicas del compuesto **8**, se llevó a cabo el ensayo del MTT, realizando dos diferentes esquemas de tratamiento. Brevemente, células BHK-21 (1.0×10^4 células/pozo) se sembraron en platos de cultivo de 96 pozos hasta la formación de la monocapa celular. Luego, las células fueron expuestas a varias concentraciones de la molécula durante 24 horas o 6 días. Transcurrido este tiempo, el compuesto se retiró y se añadió una solución MTT (4 mg/mL), la cual se incubó por 2 horas a 37° C. Después, se adicionó DMSO para disolver los cristales de formazán y se realizó la lectura de absorbancias en un lector de Elisa (Microplate reader, BioRad). La lectura espectrofotométrica se llevó a cabo a 570 nm para determinar la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀), definida como la concentración de compuesto que inhibe el 50% del crecimiento celular. Los valores de IC₅₀ se obtuvieron mediante análisis de regresión lineal de curvas de concentración-respuesta generadas a partir de los datos de absorbancia, con el software estadístico GraphPad Prisma 5.0 y se expresaron como la media geométrica \pm la desviación estándar ($M \pm DE$) de dos experimentos independientes realizados por cuadruplicado (27).

5.7.2 Detección de apoptosis empleando anexina V

Células BHK-21 (2×10^4 células/pozo) previamente infectadas con DENV-2 y tratadas con el compuesto **8**, se tripsinizaron y centrifugaron para inmediatamente ser resuspendidas en 250 μ L de una solución de buffer de unión y anexina V. Dicha mezcla se incubó durante 15 minutos a 4°C; posteriormente se adicionaron 600 μ L de buffer de unión y se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos. Finalmente, se descartó un volumen de 500 μ L del sobrenadante,

se resuspendió el pellet y se realizó la lectura empleando un citómetro BD FACS Canto II, de Becton Dickinson (99). Por otro lado, se determinó la complejidad (tamaño y granularidad) de las células infectadas y tratadas, considerando los parámetros FSC (Forward Scatter) y SSC (Side Scatter).

5.7.3 Ensayo de migración celular (*wound healing assay*)

Células BHK-21 (5.5×10^4 células/pozo) previamente sembradas en platos de 24 pozos fueron tratadas e incubadas por 24 horas y 6 días con la molécula **8**. Cuando se cumplió el tiempo de exposición, el compuesto se retiró, se adicionó medio fresco (DMEM al 2% FBS) y los platos se incubaron por 24 horas más. Luego, se realizó una incisión sobre la monocapa celular, las células se incubaron durante 24 horas adicionales y posteriormente, la migración celular fue evidenciada (100). En cada etapa del proceso, se monitoreó el estado de las células usando un microscopio Olympus CKX41 (objetivo de 10X) acoplado a una cámara Nikon DS-L1.

5.8 Análisis estadísticos

Para comparar los títulos virales (PFU/mL) y la IMF de los componentes virales se empleó la prueba T Student de datos no apareados. La comparación de los genomas virales (RT-qPCR) y proteínas virales (Western Blot), se llevó a cabo usando la prueba de ANOVA de una vía.

6. RESULTADOS

6.1 Evaluación de la actividad antiviral

6.1.1 El compuesto 8 no afecta la adherencia y/o la entrada de DENV-2

La capacidad del análogo del ferruginol para inhibir las etapas iniciales de la infección viral se determinó empleando un ensayo de unidades formadoras de placa. Como se observa en la **figura 7**, el compuesto **8** no afecta la adherencia y/o entrada de los viriones, ya que no hubo reducción estadísticamente significativa de los títulos virales en ninguna de las concentraciones evaluadas, respecto al control sin tratamiento. Como se esperaba, la heparina empleada en estos ensayos como control positivo, redujo de manera significativa ($p < 0,001$) la formación de placas.

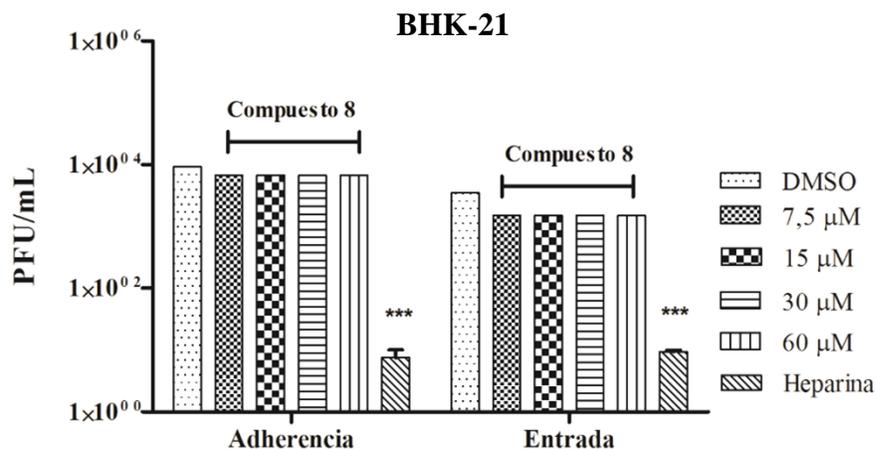


Figura 7. Efecto del compuesto 8 en etapas iniciales de la infección viral.

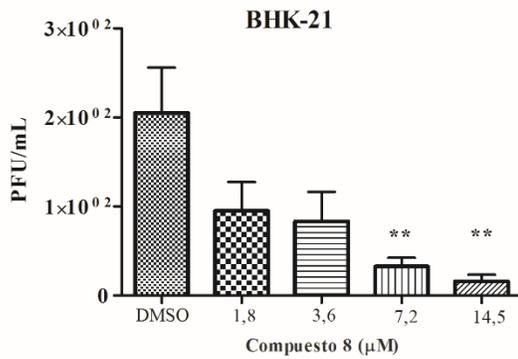
Diferentes concentraciones del compuesto **8** (7,5-60 μ M) se adicionaron a las células con el fin de evidenciar su capacidad de controlar la adherencia y/o entrada del virus a las células. Las barras representan la media \pm s.e.m de tres experimentos independientes realizados por duplicado. (***) : valor de $p < 0,001$. DMSO: dimetilsulfóxido.

6.1.2 Los tratamientos antes y después de la infección con la molécula 8, inducen actividad antiviral y cambios en la morfología celular

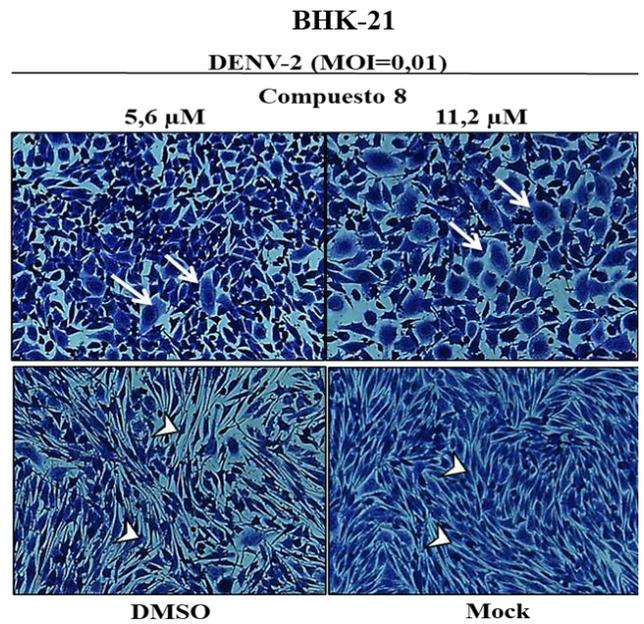
El tratamiento con el compuesto **8** por 24 horas previo a la infección viral, disminuye significativamente el número de placas en comparación con el control de células infectadas (**figura 8A**). El cálculo de la concentración efectiva 50 (EC_{50}), se realizó empleando curvas de concentración-respuesta siendo equivalente a 2,2 μ M (**figura S1A**). Además, en las

concentraciones de 7,2 μM y 14,5 μM se observaron cambios drásticos en la morfología celular en comparación con el control de infección y el mock (**figura 8B**). En condiciones normales, las células BHK-21 tienen una morfología similar a un fibroblasto con una forma alargada (**figura 8B, flecha**), mientras que, durante el tratamiento con el análogo del ferruginol, las células cambian a una forma poligonal con dimensiones más regulares (**figura 8B, punta de flecha**), relacionada con una morfología de tipo epitelial.

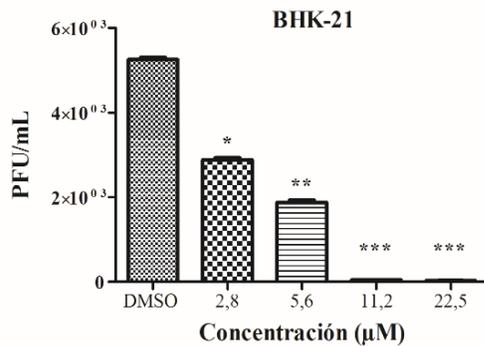
A.



B.



C.



D.

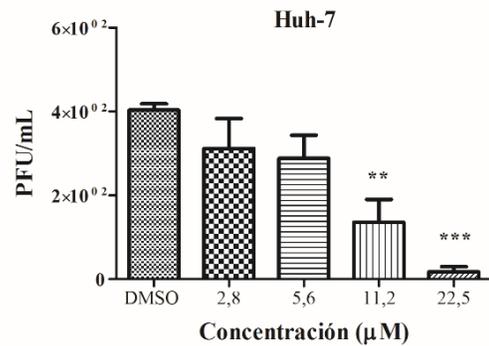


Figura 8. La molécula 8 induce actividad antiviral y cambios en la morfología celular cuando se adiciona antes y después de la infección.

Diferentes concentraciones del compuesto **8** se agregaron 24 horas previo a la infección induciendo actividad antiviral relevante (A) y cambios drásticos en la morfología celular (B). Caso similar se observó cuando el tratamiento se realizó después de la infección durante 24 horas en células BHK-21 (C) y Huh-7 (D). Las barras representan la media \pm s.e.m de tres experimentos independientes realizados por duplicado. (*): valor de $p < 0,05$; (**): $< 0,01$; (***) : $< 0,001$. DMSO: dimetilsulfóxido.

Cuando el tratamiento se adicionó después de la infección, se observó una inhibición estadísticamente significativa en células BHK-21 (**figura 8C**) y Huh-7 (**figura 8D**) infectadas con DENV-2, lo cual coincide con los datos previamente reportados en células Vero (27). Los valores de EC_{50} determinados en células BHK-21 (**figura S1B**) y Huh-7 fueron equivalentes a $3,5 \mu\text{M}$ y $7,7 \mu\text{M}$ (**figura S1C**), respectivamente. Por otra parte, el porcentaje de infección en células Huh-7, definido en este caso como la cantidad de proteína de envoltura viral, así como el número de núcleos presenten en los diferentes campos estudiados se cuantificó por microscopía de fluorescencia (**figura S2A y S2B**); lo anterior con el propósito de descartar cambios morfológicos y potenciales efectos tóxicos del compuesto en las concentraciones evaluadas.

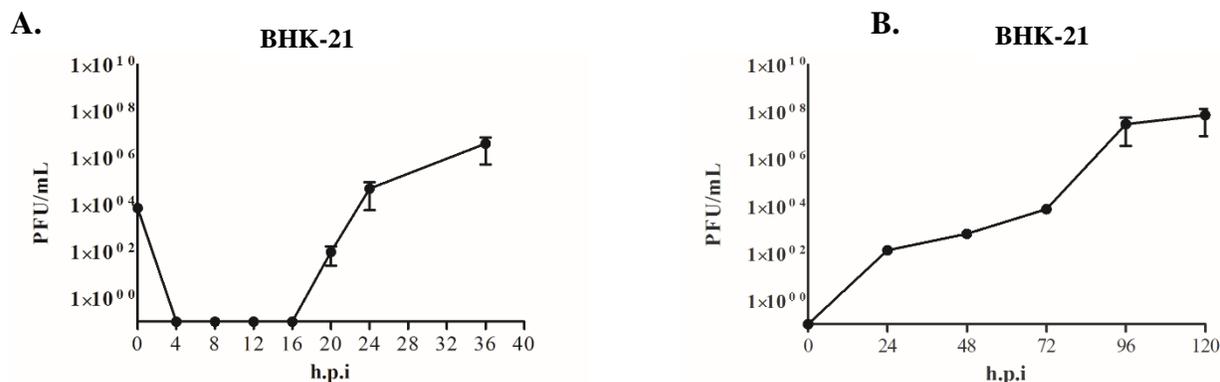
6.1.3 El compuesto 8 posiblemente altera la traducción de proteínas y/o la replicación del genoma viral, así como la propagación del virus.

Para identificar el efecto del compuesto **8** sobre uno o varios ciclos de replicación viral, se llevó a cabo un ensayo de tiempo de adición. Inicialmente, se realizaron curvas de uno y múltiples pasos, para determinar la cinética de crecimiento del DENV-2 en células BHK-21. La curva de un paso mostró que el virus ingresa a las células durante las primeras 4 horas de infección, tiempo donde posiblemente se da la unión a los receptores de la superficie celular y se desencadenan las vías endocíticas (52). Entre las 4 y 16 h.p.i. se observa una extensa fase de eclipse, intervalo en el cual no se pueden cuantificar partículas infecciosas, ya que probablemente se está efectuando la traducción de la poliproteína, replicación del genoma y el ensamblaje de la progenie viral (93). Finalmente, la liberación de nuevos viriones comienza a las 20 h.p.i. y aumenta después de 24 y 36 h.p.i (**figura 9A**). La curva de crecimiento de múltiples pasos, que es indicativa de las tasas de propagación del virus (40),

revela que el primer periodo de liberación se da a las 24 h.p.i y una segunda ronda replicativa ocurre a partir de las 72 h.p.i (**figura 9B**).

Los experimentos de tiempo-adición, muestran que el compuesto **8** induce una reducción importante (entre 10 y 1000 veces) de los títulos de DENV-2 en comparación con los controles no tratados, independientemente del tiempo en el cual fue agregado (**figura 9C**). No obstante, el efecto más evidente se observó cuando la molécula se añadió después de 6 y 12 h.p.i ($p < 0,001$). Cabe destacar que, a diferencia del ácido micofenólico (MPA) y la ribavirina (Riba), reportados previamente como inhibidores de la replicación del genoma viral (101), la molécula **8** disminuye los títulos virales cuando se agrega a las 24 h.p.i ($p < 0,05$), lo que indica que dicho compuesto probablemente reduce la liberación de nuevos viriones o interrumpe la propagación viral.

Para comprobar si estos eventos tardíos se están viendo afectados, se realizó un ensayo de tiempo-adición usando el esquema de la curva de múltiples pasos. La **figura 9D** muestra que el análogo del ferruginol reduce significativamente ($p < 0,01$) la producción de viriones cuando se adicionó en diferentes puntos de la infección, especialmente a las 72 h.p.i, lo cual confirma la capacidad de este compuesto de inhibir la diseminación viral.



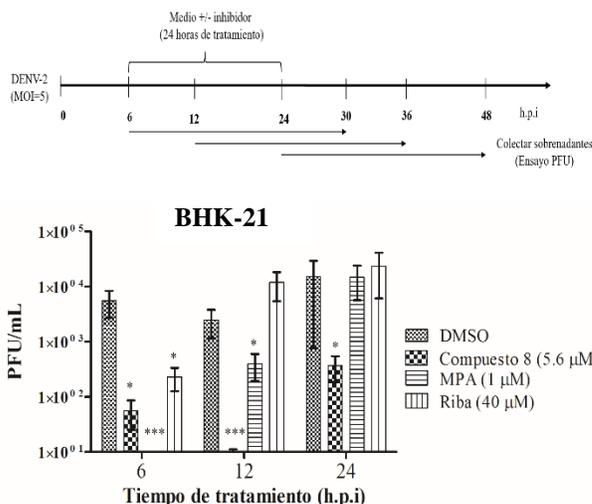
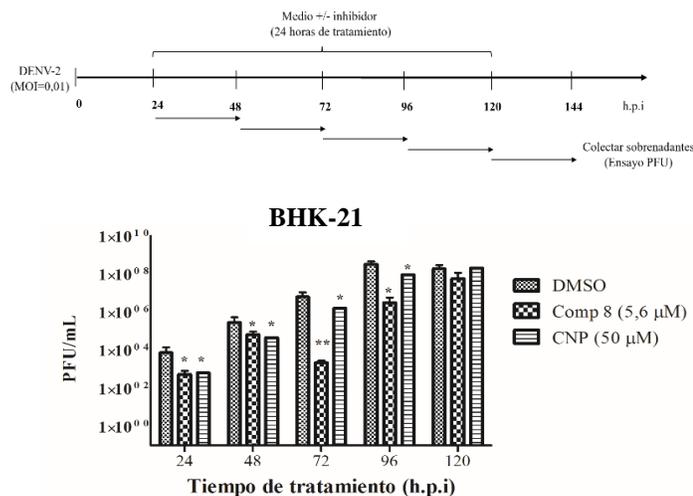
C.**D.**

Figura 9. El compuesto 8 posiblemente altera la traducción de proteínas y/o la replicación del genoma viral, así como la propagación de DENV-2.

Las curvas de crecimiento (A) y (B) se realizaron para conocer la dinámica de crecimiento del virus dengue en células BHK-21. Empleando estos esquemas de infección, se realizaron ensayos de tiempo-adición para evidenciar el efecto del compuesto **8** durante uno (C) o varios (D) ciclos replicativos. Los tiempos donde se adicionó el tratamiento, así como el momento en que los sobrenadantes se colectaron para la posterior cuantificación, se encuentran esquematizados en las figuras C y D. En todos los casos, el tiempo total de exposición al compuesto fue de 24 horas. Las barras representan la media \pm s.e.m de tres experimentos independientes realizados por duplicado. (*): valor de $p < 0,05$; (**): $< 0,01$; (***) : $< 0,001$. DMSO: dimetilsulfóxido; MPA: ácido micofenólico; Riba: Ribavirina; CNP: Castanospermina.

6.2 Ensayos *in silico*

6.2.1 El análogo del ferruginol se acopla de forma predictiva con elementos del citoesqueleto, proteínas implicadas en la señalización de la polimerización de actina y proteínas virales.

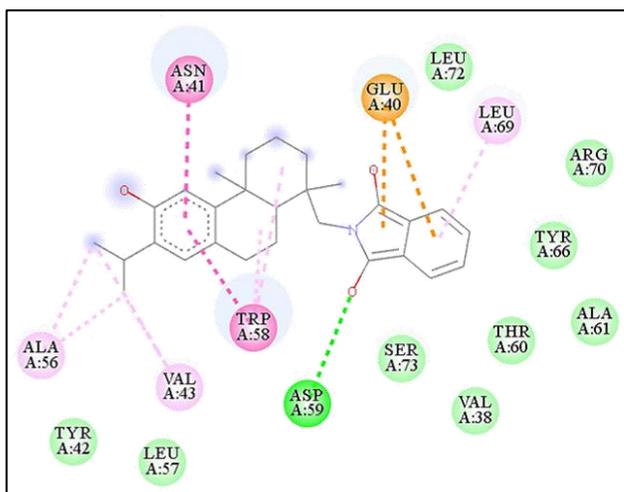
Para predecir la interacción del compuesto **8** con proteínas celulares y virales requeridas para llevar a cabo la infección por DENV-2, se realizó un análisis de acoplamiento molecular utilizando el software Autodock Vina. La **tabla 2** resume las dianas celulares y virales, el código de identificación en el Protein Data Bank, las funciones y las puntuaciones de energía libre de unión (kcal/mol) predichas por Vina para el análogo del ferruginol, así como para algunos inhibidores previamente reportados.

Blanco celular/viral	Código PDB	Función	Afinidad (kcal/mol)	
			Compuesto 8	Inhibidores reportados
RhoA	5C4M	Pequeña GTPasa; formación de fibras de tensión de actina	-9.8	Rhosin (-9.2)
Subunidad β -tubulina	1JFF	Polimerización de microtúbulos	-9.7	Taxol (-10.0)
NS5 RdRp	3VWS	Replicación del genoma viral; síntesis de RNA de cadenas (-) y (+)	-9.6	NITD-107 (-8.1)
NS5 Metiltransferasa	3P97	Actividad enzimática de metiltransferasa y guanidiltransferasa	-9.5	SAH analogo (-7.8)
NS3 helicasa	2BMF	Desenrolla el dsRNA formado durante la síntesis del genoma viral	-9.4	
G-actina	3EKS	Proteína globular que forma microfilamentos	-9.3	Citocalasina D (11.3)
PI3K γ	1E7U	Enzima transductora de señales intracelulares	-8.8	Wortmanina (-9.2)
Complejo Arp2/3	3UKR	Nucleador de nuevos filamentos de actina; ensambla matrices de filamentos ramificados	-8.6	CK-666 (-9.4)
NS3 proteasa de serina	3U1I	Escinde la poliproteína viral en varias posiciones entre las proteínas NS	-8.3	Bz-nKKR-H (-7.1)
Cdc42	1K1I	Pequeña GTPasa; protrusión de actina (filopodios)	-6.8	ZCL278 (-6.5)
Rac1	3TH5	Pequeña GTPasa; protrusión de actina (lamelipodios)	-6.3	NCS23766 (-6.3)

Tabla 2. Afinidad de unión del compuesto 8 con elementos del citoesqueleto, proteínas implicadas en la señalización de la polimerización de actina y proteínas virales.

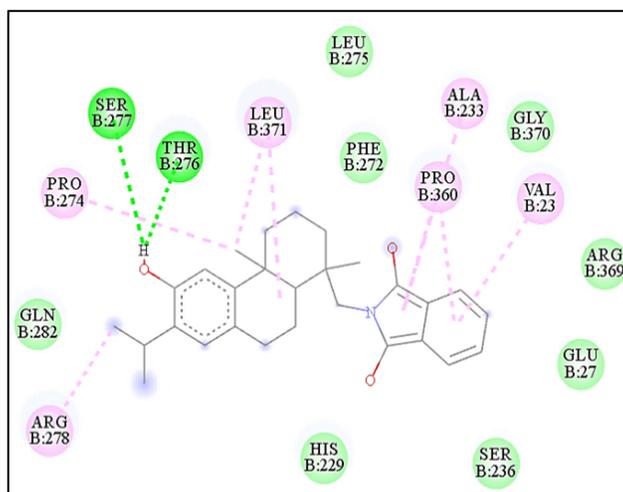
La parametrización de proteínas y ligandos se llevó a cabo utilizando la herramienta Autodock tools y el acoplamiento molecular se realizó con el software Autodock Vina utilizando una exhaustividad de 20 para cada interacción proteína-ligando. Los blancos celulares y virales empleados, los códigos consignados en el Protein Data Bank (PDB) y sus respectivas funciones se indican en la tabla. Además, las puntuaciones de energía libre de unión (kcal/mol) predichas por Vina para el compuesto 8, así como para algunos inhibidores de las proteínas estudiadas, se informan entre paréntesis.

A.



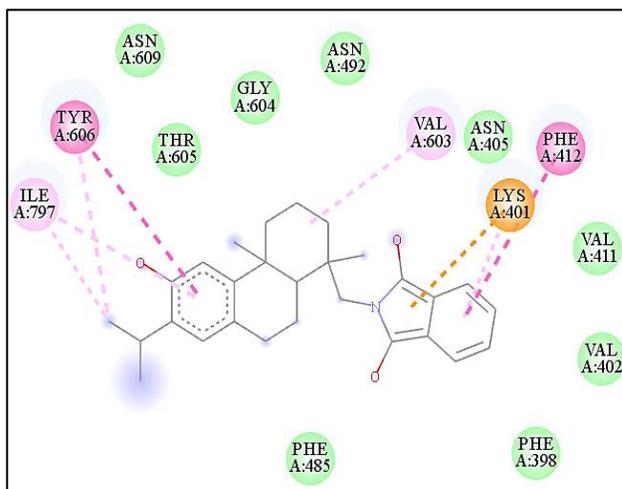
RhoA (-9.8 kcal/mol)

B.



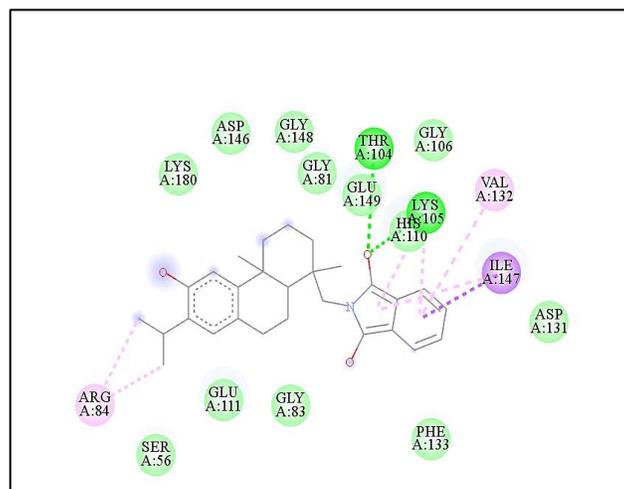
β -tubulina (-9.7 kcal/mol)

C.



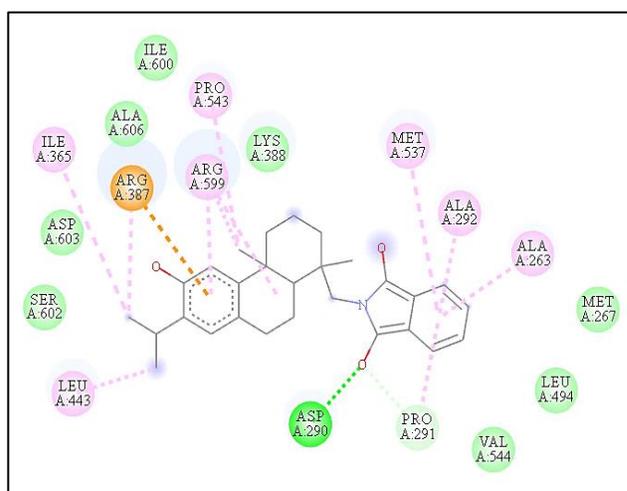
NS5 RdRp (-9.6 kcal/mol)

D.



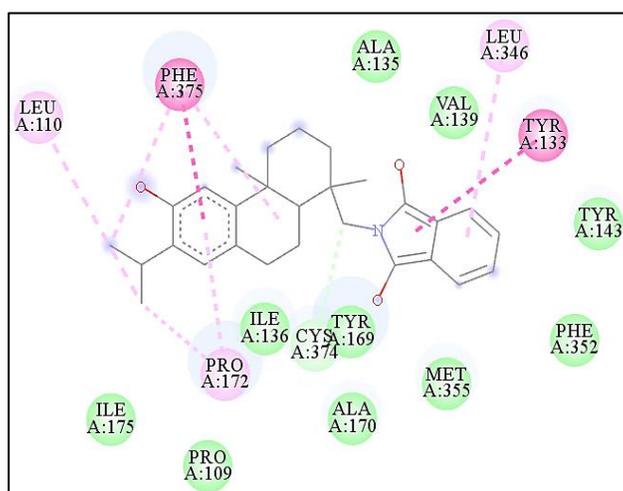
NS5 Metiltransferasa (-9.5 kcal/mol)

E.



NS3 Helicasa (-9.4 kcal/mol)

F.



G-actina (-9.3 kcal/mol)

Tipos de interacción:

- | | |
|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| ■ van der Waals | ■ Amide-Pi Stacked |
| ■ Conventional Hydrogen Bond | ■ Alkyl |
| ■ Pi-Anion | ■ Pi-Alkyl |
| ■ Pi-Pi Stacked | |

Figura 10. Principales interacciones del compuesto 8 con elementos del citoesqueleto, proteínas implicadas en la señalización de la polimerización de actina y proteínas virales.

Las interacciones predichas por Autodock Vina fueron visualizadas empleando el software Discovery Studio.

Comparado con los controles, la molécula **8** se une con afinidad alta a moderada a la GTPasa RhoA (-9.8 kcal/mol), la subunidad β de la tubulina (-9,7 kcal/mol), el dominio RdRP (-9,6 kcal/mol) y el dominio metiltransferasa (-9,5 kcal/mol) de la proteína no estructural 5 (NS5) de DENV, el dominio helicasa de la proteína NS3 (-9,4 kcal/mol) y la actina globular (-9,3 kcal/mol). Las interacciones específicas del ligando con los aminoácidos de estas proteínas se observan en la **figura 10**. El acoplamiento con las proteínas PI3K γ , el complejo Arp2/3, NS3 proteasa de serina, Cdc42 y Rac1 se representan en la **figura S3**.

Entre las proteínas celulares, el compuesto **8** interactúa con mayor afinidad con la GTPasa RhoA, conformando puentes de hidrógeno con Asp59 y uniones tipo hidrofóbicas con Val38, Leu57, Tyr42, Thr60, Ala61, Tyr66, Arg70, Lue72, Ser73. Además, el apilamiento entre los anillos aromáticos del aminoácido Trp58 de RhoA y la molécula **8** también fue evidenciado. El compuesto **8** interactúa con la β -tubulina formando enlaces de hidrógeno con Thr276 y Ser277 e interacciones hidrofobas con Val23, Glu27, Ala233, Phe272, Pro274, Pro360, Arg369 y Leu371 (**figura 10B**). Asimismo, se establecieron contactos hidrofóbicos (Tyr133, Ile136, Tyr143, Tyr169, Pro172, Leu346, Met355, Cys374, Phe375) entre la actina monomérica y el ligando estudiado; no obstante, no se evidenció formación de enlaces de hidrógeno (**figura 10F**).

Referente a la interacción con proteínas virales, la molécula **8** forma principalmente enlaces hidrofóbicos (Phe398, Val402, Asn405, Val411, Phe485, Asn492, Gly604, Thr605, Asn609) con el dominio RdRp (**figura 10C**) de la proteína NS5. Las uniones formadas entre el compuesto y el dominio metiltransferasa (**figura 10D**) de esta proteína son aparentemente más estables, ya que se establecieron dos puentes de hidrógeno con los aminoácidos Thr104 y Lys105, así como contactos hidrofóbicos con los residuos Ser56, Gly81, Gly83, Gly106, His110, Glu111, Asp131, Phe133, Asp146, Gly148, Glu149 y Lys180. La helicasa NS3 forma un enlace de hidrógeno con Asp290 y las uniones restantes fueron de tipo hidrofóbico (Met267, Pro291, Lys399, Leu494, Val544, Ile600, Ser602, Asp603, Ala606).

Es importante señalar que las interacciones más destacadas entre el compuesto **8** y las proteínas previamente descritas fueron contactos de tipo hidrofóbico, lo que sugiere que la

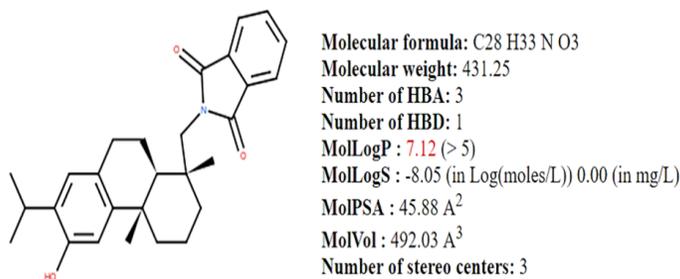
posible asociación *in vivo* de esta molécula y dichas proteínas es potencialmente reversible y menos estable que la reportada para sus inhibidores.

6.2.2 El compuesto 8 presenta similitud con los fármacos (*drug-likeness*) y podría postularse como potencial fármaco antiviral

Con el fin de conocer el potencial farmacológico del compuesto 8, se realizó una predicción computacional de las propiedades moleculares y la similitud con los fármacos de esta molécula, utilizando la herramienta en línea de Molsoft. En la **figura 11A** se muestran las propiedades químicas del análogo del ferruginol, tales como: fórmula y peso molecular, así como los parámetros establecidos en la regla de cinco de Lipinski (64). La regla establece que un principio activo no debe infringir más de uno de los criterios descritos y encontramos que la molécula en estudio solo incumple uno de estos parámetros ($\text{Log P} > 5$), relacionado con el carácter hidrófilo o hidrófobo de una sustancia.

Además, la predicción computacional mostró que la puntuación del modelo de *drug-likeness* para el compuesto 8 fue de 0,63, similar a la puntuación informada para los fármacos disponibles actualmente (**figura 11B**).

A.



B.

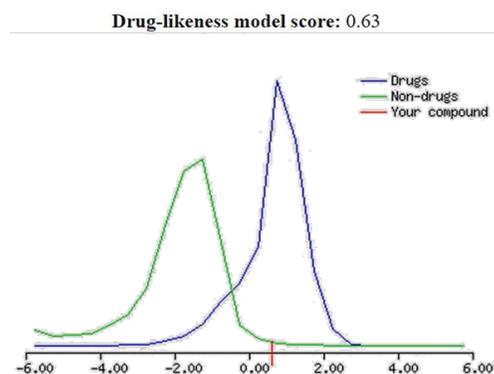


Figura 11. El compuesto 8 presenta similitud a los fármacos (*drug-likeness*) y podría postularse como potencial fármaco antiviral.

Las propiedades moleculares (A) y *drug-likeness* (B) del compuesto 8 se predijeron empleando la herramienta en línea de Molsoft.

Por otra parte, las propiedades farmacocinéticas de este compuesto fueron analizadas usando la plataforma *on line* SwissADME. En la **tabla 3** se aprecian los parámetros estudiados y la predicción obtenida.

Propiedades farmacocinéticas	
Parámetro	Predicción
Absorción gastrointestinal	Elevada
Permeabilidad de la barrera hematoencefálica	Puede atravesar la barrera
Sustrato de la glicoproteína de permeabilidad	Positivo
Interacción con citocromos P450	Actúa como inhibidor de las isoformas: CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4 No inhibe las isoformas: CYP1A2, CYP2D6

Tabla 3. Predicción de las propiedades farmacocinéticas del compuesto 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol

6.3 Determinación del potencial mecanismo de acción antiviral

6.3.1 El compuesto 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol afecta la traducción de proteínas y/o replicación del genoma de DENV-2

La capacidad de la molécula **8** para controlar la síntesis de proteínas virales, así como de nuevas cadenas de RNA, se evaluó empleando células Huh-7 que establemente expresan un replicón para DENV-2 (Huh-7 Rep DENV-2). Las células se incubaron con dos concentraciones del compuesto (11,2µM y 22,5µM) por 24, 48 y 72 horas, y una vez finalizado cada tiempo de tratamiento, fueron colectadas para realizar los ensayos de luciferasa, Western blot y RT-qPCR. Como se observa en las **figuras 12A y 12B**, la actividad de la enzima luciferasa, así como la cantidad de genomas virales se reduce significativamente luego de 48 y 72 horas de exposición al compuesto.

La cuantificación de la proteína viral NS4B indica una disminución significativa de la síntesis proteica en todos los tiempos y concentraciones evaluadas (**figuras 12C y 12D**). No obstante, este sistema experimental no permite discernir sobre cual evento específico del ciclo viral (traducción o replicación) tiene efecto la molécula.

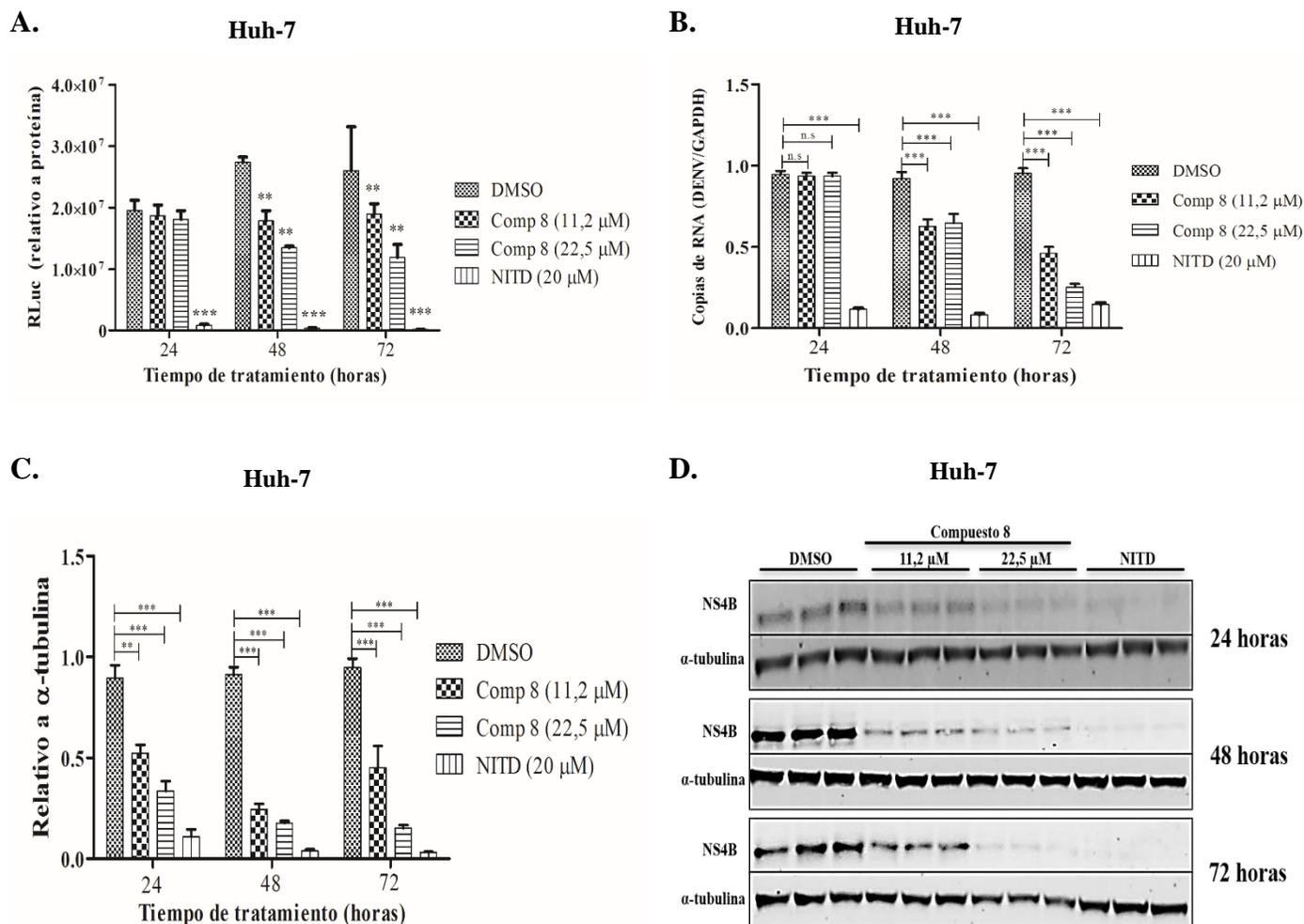


Figura 12. La molécula 8 reduce la cantidad de proteína y RNA viral de DENV-2.

Células Huh-7 Rep DENV-2 fueron expuestas al compuesto 8 (11,2μM y 22,5μM) por 24, 48 y 72 horas, para evaluar su potencial actividad sobre la traducción de proteínas y la replicación del genoma de DENV-2. La actividad de la enzima *Renilla* luciferasa (A), la cantidad de RNA viral (B) y de proteína viral (C y D), fue determinada para tal fin. Las barras representan la media ± s.e.m de tres experimentos independientes realizados por duplicado. (**): valor de $p < 0,01$; (***): $< 0,001$. DMSO: dimetilsulfóxido. NITD: NITD008.

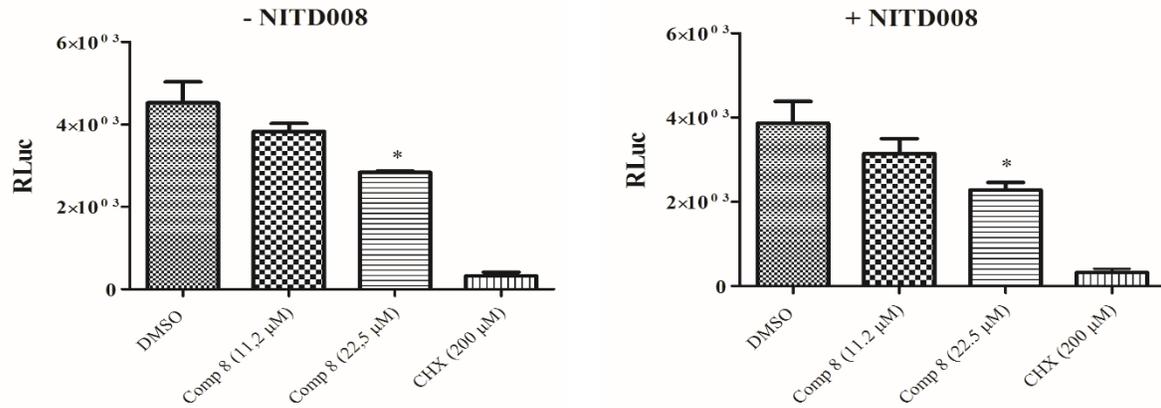
6.3.2 El tratamiento post-infección con la molécula 8 disminuye la síntesis de proteínas virales

Con el propósito de confirmar el si el compuesto 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol afecta eventos tempranos, como la entrada o la síntesis de proteínas virales del virus dengue, dos diferentes esquemas de tratamiento de llevaron a cabo usando el virus recombinante RLuc-tagged DENV-2. Inicialmente, células Huh-7 se trataron por un periodo de 24 horas previo a la

infección para determinar la posible alteración de la entrada, al igual que de la síntesis inicial de proteínas virales. En la **figura S4** se puede observar que la actividad de la proteína luciferasa no disminuye, en comparación al control no tratado, cuando el compuesto **8** se probó a una concentración de 45 μM ; lo que indica que este esquema de tratamiento no afecta las etapas antes descritas.

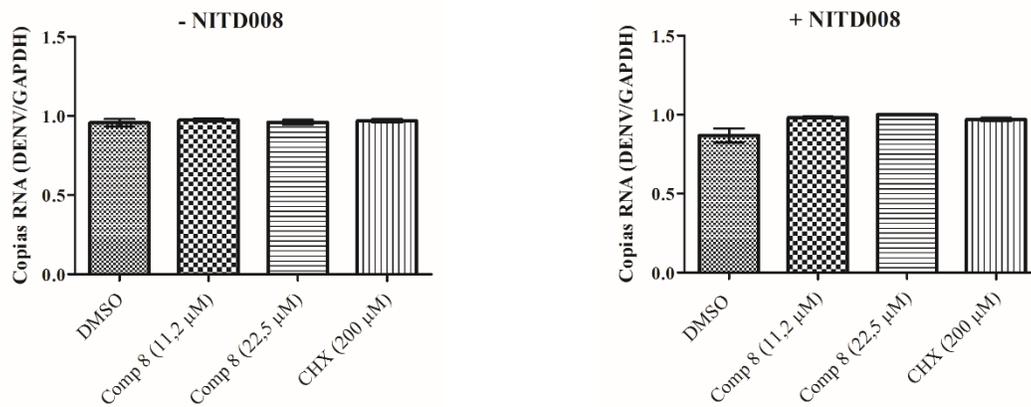
A.

Huh-7



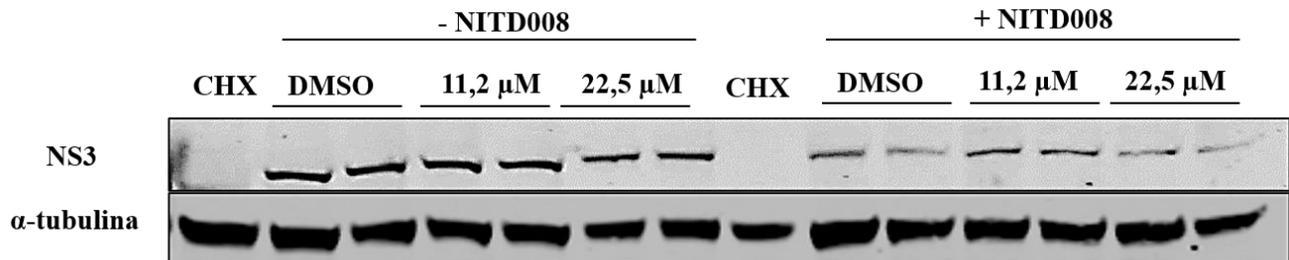
B.

Huh-7



C.

Huh-7



D.

Huh-7

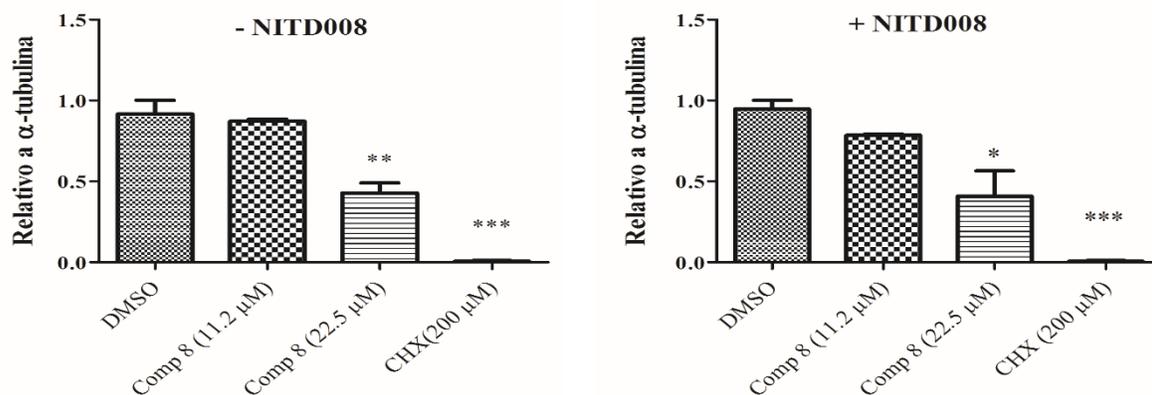


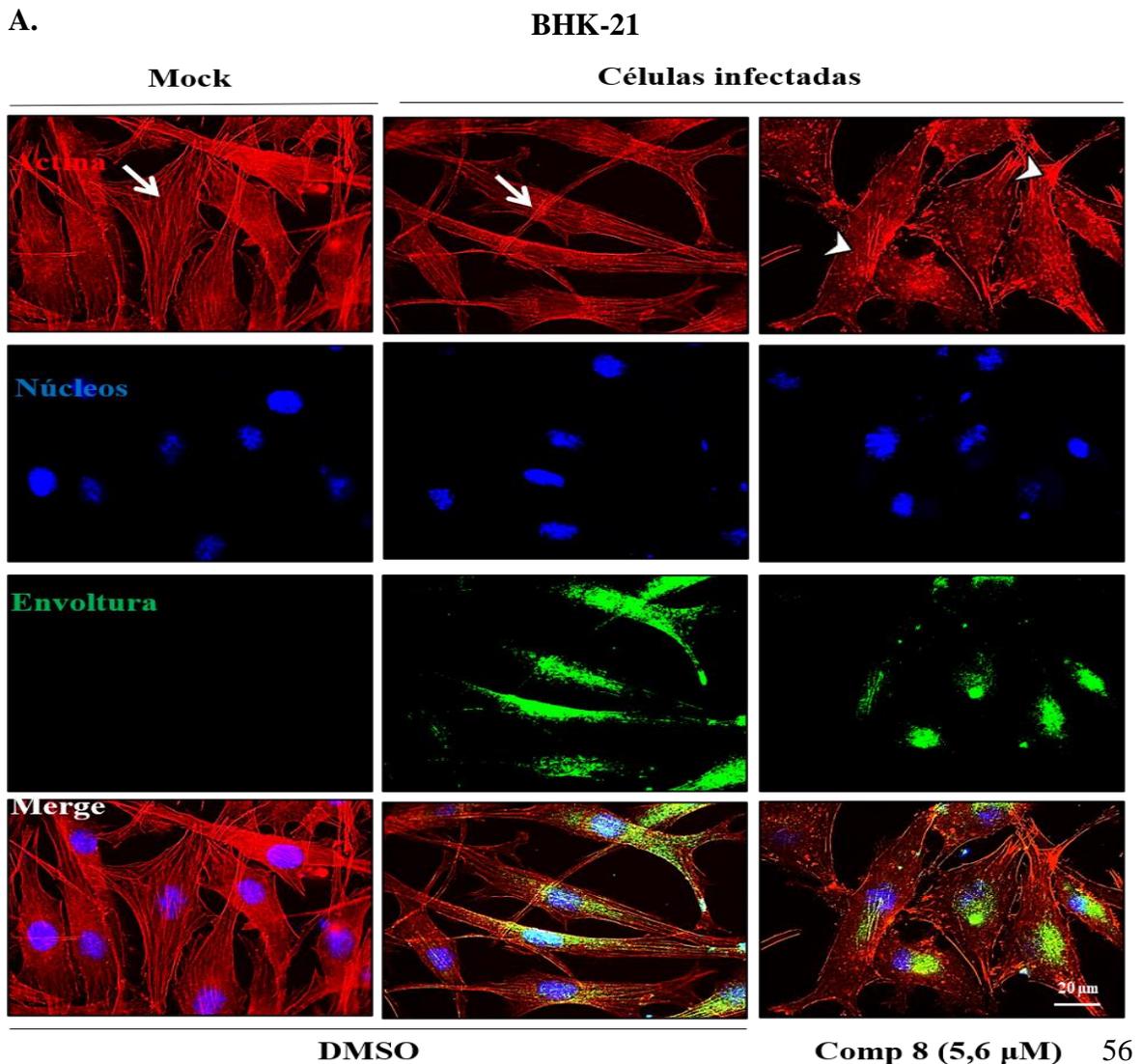
Figura 13. El tratamiento post-infección con la molécula 8 disminuye la síntesis de proteínas virales.

Células Huh-7 se infectaron durante 1 hora con el virus recombinante RLUC DENV-2 y luego se trataron con el compuesto **8** (11,2 μ M y 22,5 μ M) por 3 horas adicionales. La actividad de la enzima Renilla luciferasa (A), la cantidad de RNA viral (B) y de proteína viral (C y D), fue determinada para evaluar el efecto sobre la traducción de proteínas virales. Las barras representan la media \pm s.e.m de tres experimentos independientes realizados por duplicado. (*): valor de $p < 0,05$; (**): $< 0,01$; (***): $< 0,001$. DMSO: dimetilsulfóxido. NITD: NITD008.

Posteriormente, se comprobó la acción de la molécula específicamente sobre la síntesis proteica, para lo cual se realizó el tratamiento (11,2 μ M y 22,5 μ M) después de 1 hora de infección y se dejó actuar por 3 horas adicionales. Pasado este tiempo, las células se lisaron para cuantificar la actividad de la enzima luciferasa, los genomas y proteínas virales. En la concentración de 22,5 μ M se observó una reducción estadísticamente significativa de RLUC (**figura 13A**) y de la proteína NS3 (**figuras 13C y 13D**). Por el contrario, la molécula **8** no generó ningún efecto sobre la producción de nuevas copias de RNA (**figura 13B**), lo que confirma un impacto específico sobre la síntesis de proteínas de DENV-2.

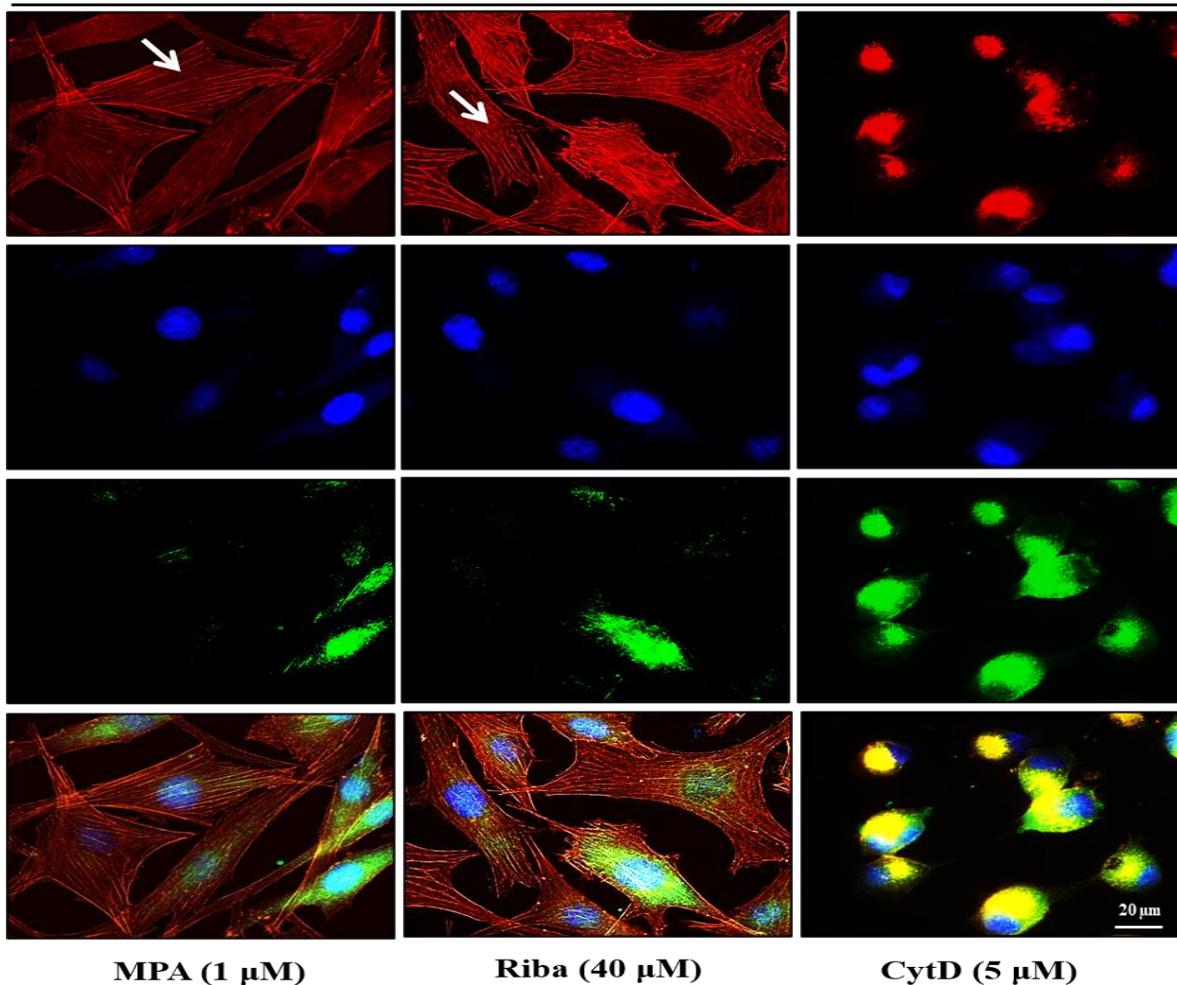
6.3.3 La molécula 8 induce cambios drásticos en la reorganización de los filamentos de actina y reduce la cantidad de envoltura viral

Teniendo en cuenta los datos obtenidos en el análisis de docking molecular y con el fin de validar dichos resultados, se realizó el marcaje de elementos del citoesqueleto, incluyendo microfilamentos de actina, microtúbulos y vimentina. El tratamiento por 24 horas con el análogo 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol después de 6, 12 y 24 h.p.i induce cambios drásticos en la remodelación de los filamentos de actina. Según lo observado, la molécula **8** reduce la cantidad de filamentos y genera agregados en la membrana celular, tanto en células BHK-21 (**figura 14A, punta de flecha**) como en la línea celular Huh-7 (**figura 14C, punta de flecha**). En los controles de infección (DMSO) y mock, se observa la presencia notable de los microfilamentos atravesando el citoplasma (**figura 14A y 14C, flecha**).



B.

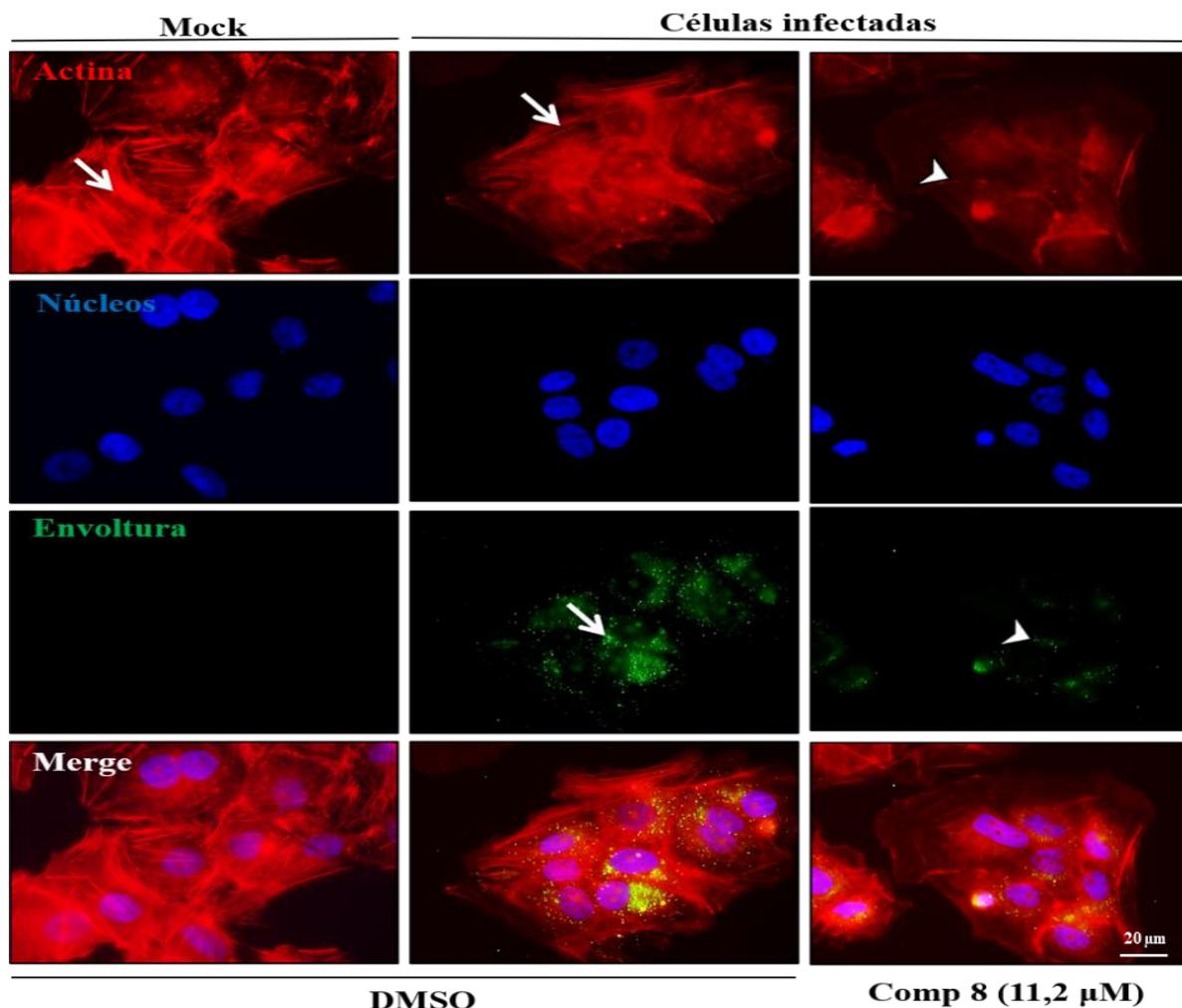
BHK-21
Células infectadas



Caso similar se detecta durante los tratamientos con el ácido micofenólico y ribavirina, ya que, tal como se esperaba, estos compuestos no alteran la remodelación de actina (**figura 14B, flecha**). Por otro lado, la exposición de las células al compuesto **8** no afecta la distribución de los microtúbulos o de los filamentos de vimentina, como se puede evidenciar en las **figuras S5A-C**.

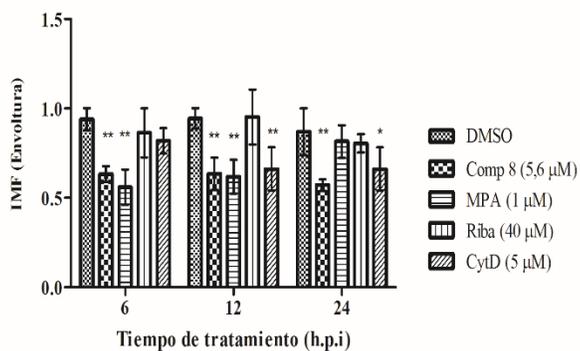
C.

Huh-7



D.

BHK-21



E.

Huh-7

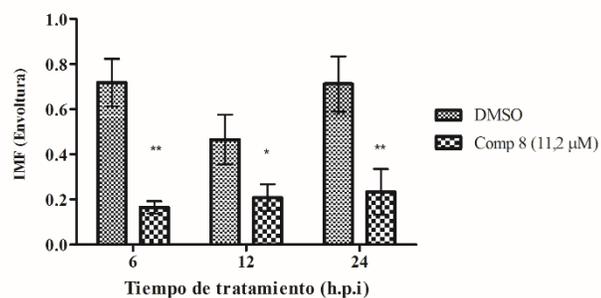


Figura 14. La molécula 8 reduce la formación de filamentos de actina.

Células BHK-21 (A) y Huh-7 (C) se infectaron con DENV-2 y luego se trataron con el compuesto 8 a las 6, 12 y 24 h.p.i, por un periodo de 24 horas. Pasado este tiempo, las células se fijaron y se tiñeron con anticuerpos

para evaluar el efecto de la molécula en la reorganización de actina (rojo) y sobre la infección viral, marcando la proteína de envoltura (verde); los núcleos (azul) también se tiñeron. Se empleó citocalasina D (5 μ M) como control positivo de la interrupción de la polimerización de actina. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes realizados por duplicado y fueron capturadas con el objetivo de 60X. La cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de la proteína de la envoltura (D y E) se hizo empleando el software Image J. Las barras representan la media \pm s.e.m de tres experimentos independientes realizados por duplicado. (*): valor de $p < 0,05$; (**): $< 0,01$. DMSO: dimetilsulfóxido; MPA: ácido micofenólico; Riba: ribavirina; CytD: citocalasina D.

Además, la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de la proteína de envoltura, durante los diferentes esquemas de tratamiento, confirma que esta molécula reduce la infección viral en células BHK-21 (**figura 14D**) y Huh-7 (**figura 14E**), tal como se observó en los ensayos de tiempo-adición.

6.3.4 El compuesto 8 inhibe la activación de la Rho GTPasa RhoA durante la infección por DENV-2

Considerando que la reorganización de actina para la formación de filamentos y fibras de tensión está mediada por la señalización de la Rho GTPasa RhoA, el efecto de la molécula **8** sobre la activación de esta proteína fue evaluado. Células Huh-7 en condiciones de inanición de FBS, se infectaron y se trataron con el compuesto después de 6 y 12 h.p.i, por un periodo de 24 horas. La **figura 15A** muestra que después de 6 horas, el virus (DMSO) induce activación de RhoA cuando se compara con el control de células no infectadas. Además, el compuesto **8** (11,2 μ M) y el inhibidor de RhoA (Rhosin- 30 μ M) reducen significativamente la activación de esta proteína en células infectadas con DENV-2.

De otra parte, no se observan diferencias en el estado de activación de RhoA luego de 12 horas de infección con respecto al control no infectado (**figura 15B**); lo anterior podría sugerir que la activación de esta proteína se da principalmente en etapas tempranas de la infección.

Huh-7

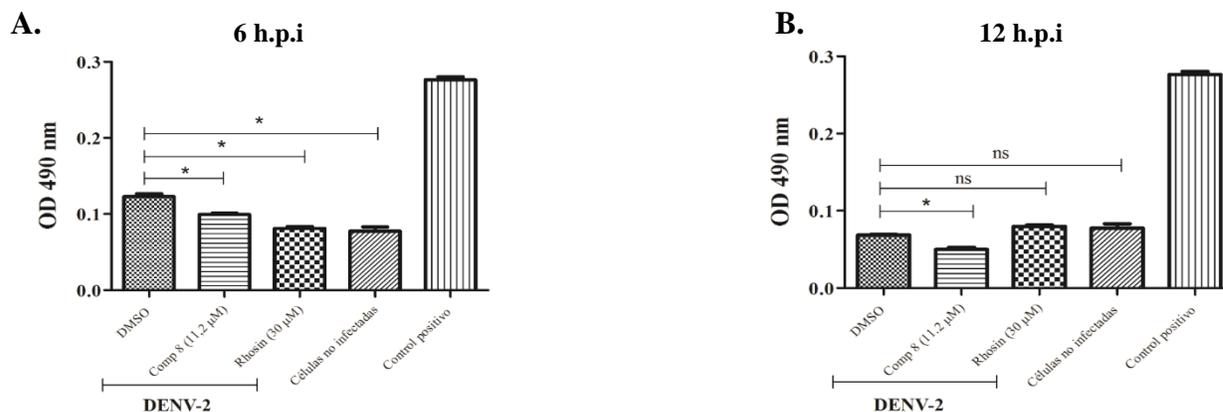


Figura 15. El compuesto 8 inhibe la activación de RhoA durante la infección por DENV-2.

El efecto de la molécula **8** en la activación de RhoA fue determinada cuando se adicionó después de 6 horas (A) y 12 horas de infección (B). Las barras representan la media \pm s.e.m de dos experimentos independientes realizados por duplicado. (*): valor de $p < 0,05$. ns: no significativo. Control positivo: RhoA constitutivamente activa; DMSO: dimetilsulfóxido.

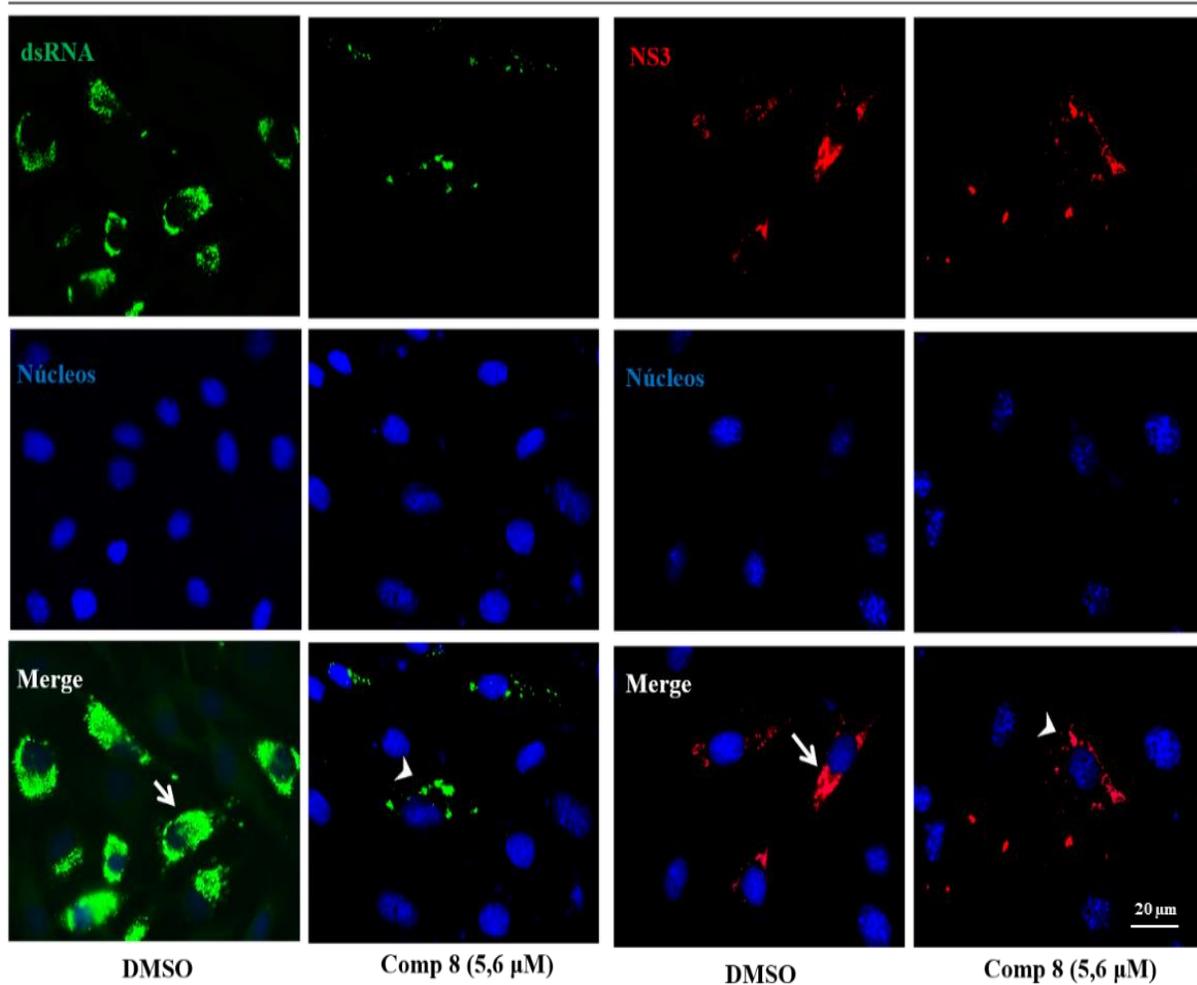
6.3.5 El tratamiento con el compuesto 8 reduce la intensidad media de fluorescencia y altera la distribución de componentes virales que hacen parte de los complejos replicativos

Para evidenciar el efecto la molécula **8** sobre elementos virales esenciales para la conformación de los complejos replicativos, condiciones de tratamiento similares a las empleadas en el ensayo de tiempo-adición (curva de un solo paso) se realizaron en células BHK-21 y Huh-7 infectadas con DENV-2. Indistintamente del tiempo en el que se agrega el compuesto, se observa que hay una menor cantidad, así como un cambio en el patrón de distribución de los intermediarios de replicación (dsRNA) y de la proteína NS3. En el control de infección se puede reconocer que el dsRNA y la NS3 se distribuyen como focos citosólicos puntiformes localizados principalmente en la región perinuclear (**figuras 16A y 16D, flecha**). En presencia del compuesto **8** se evidenció una disminución notable de la señal de dsRNA y NS3 a niveles apenas detectables. Además, el dsRNA y la NS3 se dispersan especialmente en la periferia celular (**figuras 16A y 16D, punta de flecha**) y solo unas pocas células conservan la distribución de focos puntiformes perinucleares. La cuantificación de la IMF de estos componentes virales corrobora una reducción estadísticamente significativa tanto en células BHK-21 (**figuras 16B y 16C**) como en Huh-7 (**figuras 16E y 16F**) durante el

tratamiento con la molécula. Caso similar se observó con los controles antivirales incluidos en el ensayo (MPA y Riba).

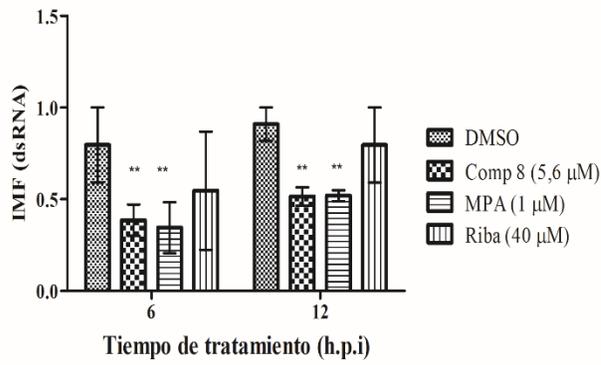
A. BHK-21

Células infectadas

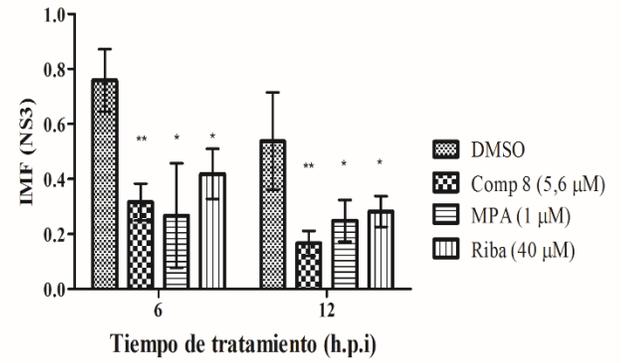


B.

BHK-21



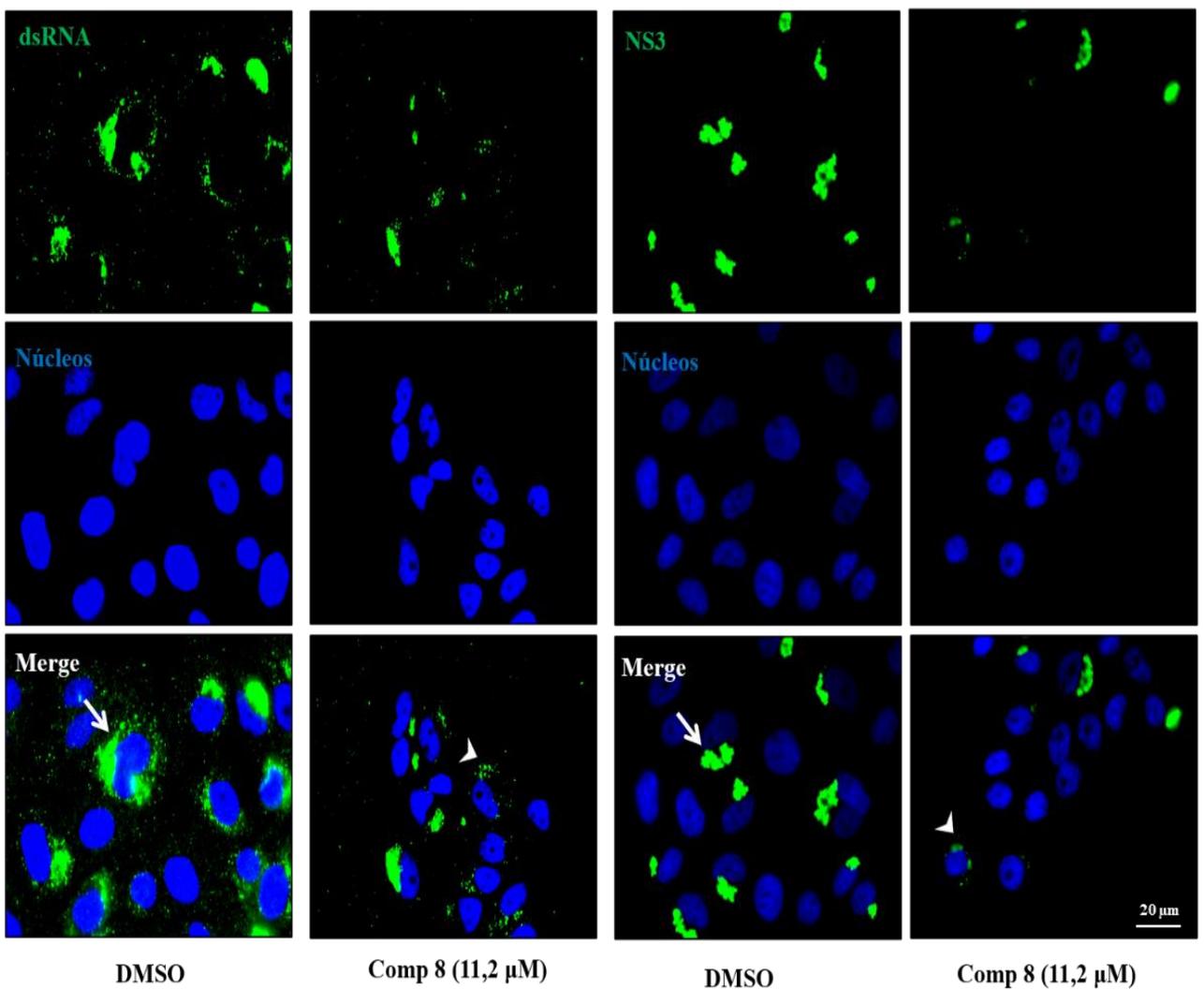
C.



D.

Huh-7

Células infectadas



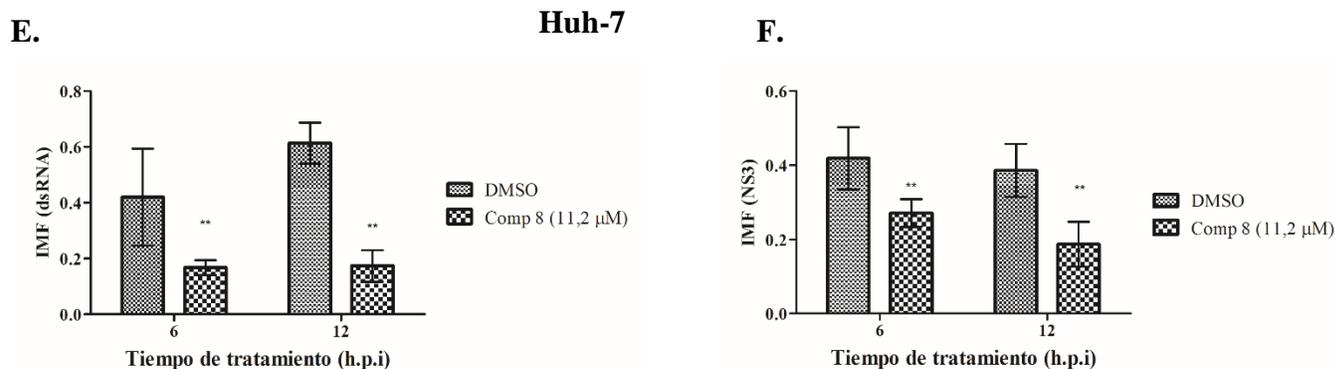


Figura 16. La molécula 8 altera componentes virales que hacen parte de los complejos replicativos.

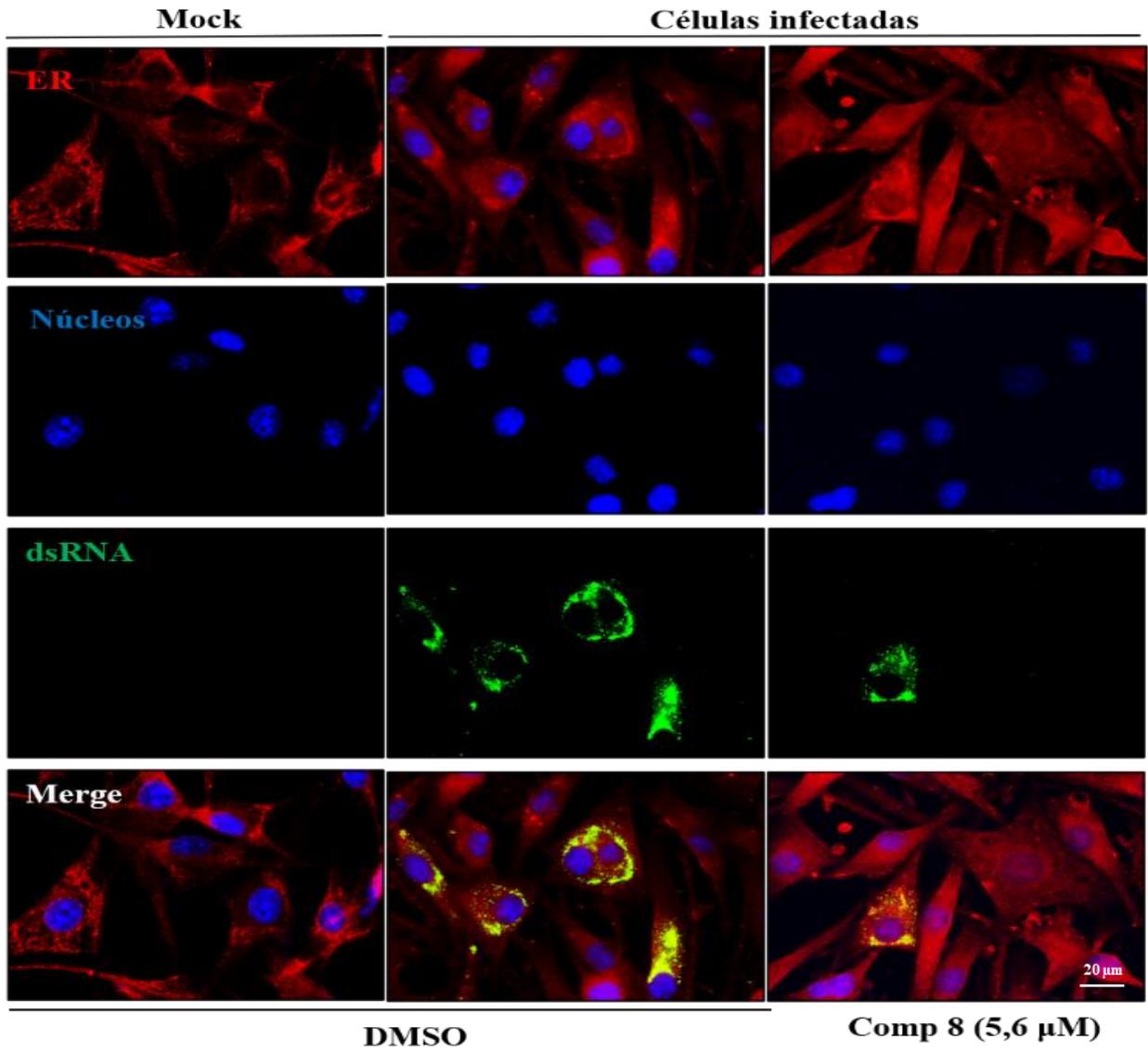
Células BHK-21 (A) y Huh-7 (D) se infectaron con DENV-2 y luego se trataron con el compuesto **8** a las 6, 12 y 24 h.p.i, por un periodo de 24 horas. Pasado este tiempo, las células se fijaron y se tiñeron con los anticuerpos anti-dsRNA (verde) y anti-NS3 (verde o rojo) para evaluar el efecto de la molécula sobre componentes de los complejos replicativos; los núcleos (azul) también se tiñeron. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes realizados por duplicado y fueron capturadas con el objetivo de 60X. La cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (B-C y E-F) se hizo empleando el software Image J. Las barras representan la media \pm s.e.m de tres experimentos independientes realizados por duplicado. (*): valor de $p < 0,05$; (**): $< 0,01$. DMSO: dimetilsulfóxido; MPA: ácido micofenólico; Riba: ribavirina.

6.3.6 El tratamiento con el compuesto **8** no tiene efectos notables sobre el retículo endoplasmático

Debido a la importancia que tiene el retículo endoplasmático para la formación de los complejos replicativos, y, por ende, durante la síntesis de proteínas y nuevas cadenas de RNA viral en la infección por DENV, el efecto del compuesto **8** sobre dicha organela fue testeado. En comparación con los controles no infectados/infectados y no tratados, el compuesto **8** no genera cambios morfológicos importantes en este componente celular en ninguna de las líneas celulares empleadas, BHK-21 (**figura 17A**) o Huh-7 (**Figura 17B**), independientemente del momento de la infección en el cual se adicionó.

A.

BHK-21



B.

Huh-7

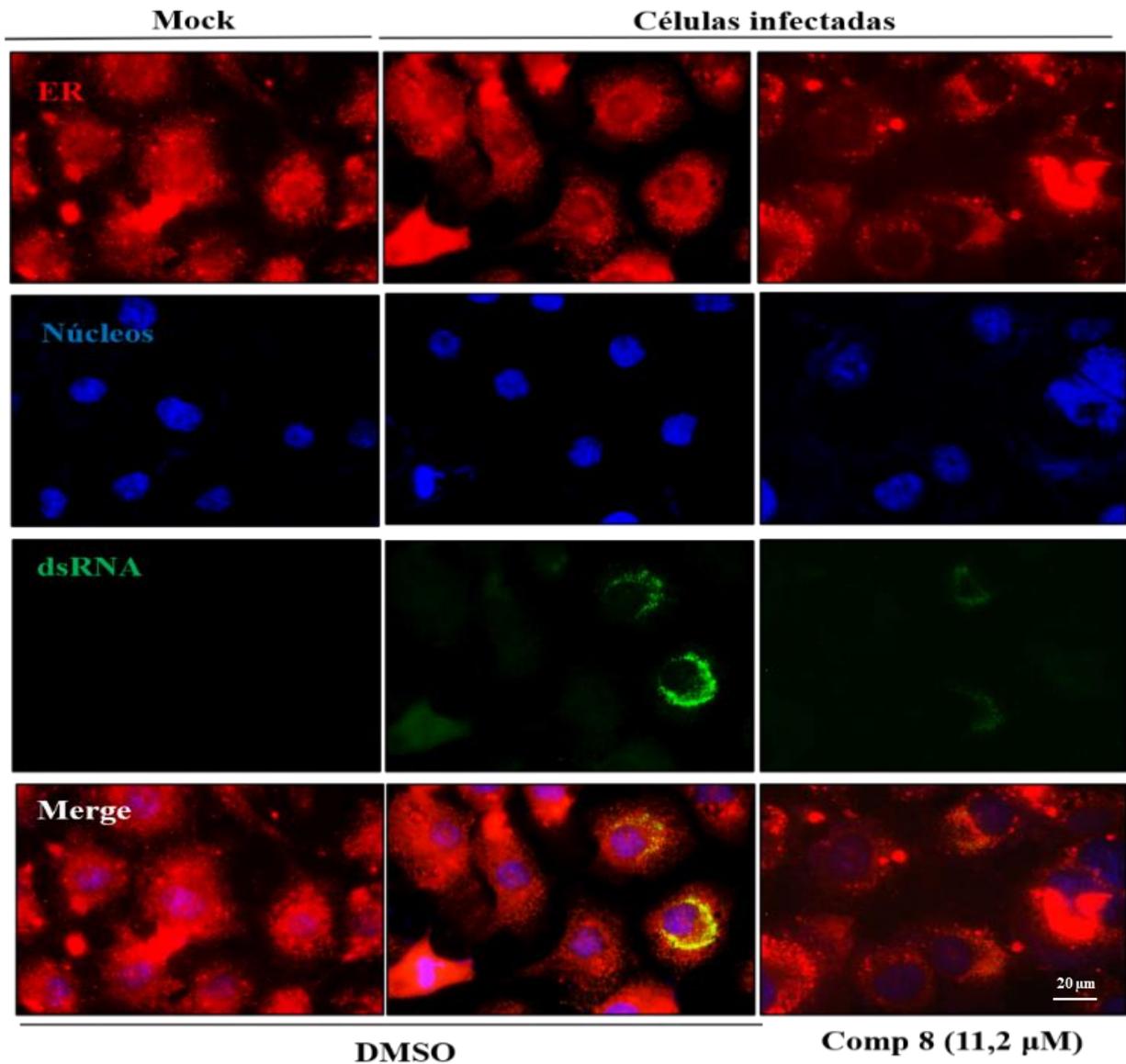


Figura 17. El tratamiento con el compuesto 8 no tiene efecto sobre el retículo endoplasmático.

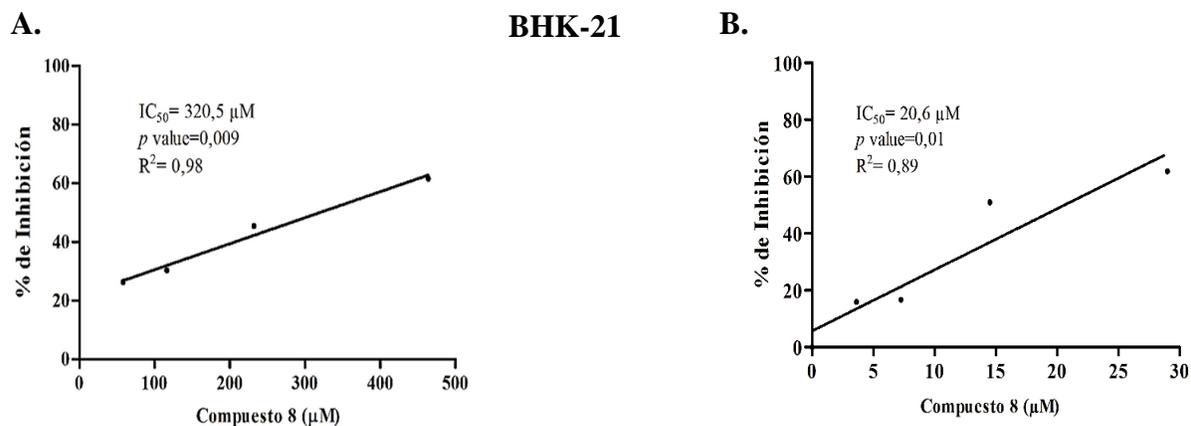
Células BHK-21 (A) y Huh-7 (B) se infectaron con DENV-2 y luego se trataron con el compuesto 8 a las 6, 12 y 24 h.p.i, por un periodo de 24 horas. Pasado este tiempo, las células se fijaron y se tiñeron con los anticuerpos anti-KDEL (rojo) y anti-dsRNA (verde) para evidenciar el efecto de la molécula sobre el ER; los núcleos (azul) también se tiñeron. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes realizados por duplicado y fueron capturadas con el objetivo de 60X. DMSO: dimetilsulfóxido.

6.4 Caracterización de la integridad celular

6.4.1 La molécula 18-(ftalimida-2-il) ferruginol no afecta el funcionamiento celular durante tiempo cortos de exposición

En vista de que el compuesto **8** tiene efectos sobre la morfología celular, específicamente sobre la remodelación de actina, se hizo necesario evaluar el si esta molécula afectaba la función celular durante diferentes tiempos de exposición. Inicialmente, se realizó un ensayo de MTT, que permite medir la actividad metabólica, principalmente de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial. Las **figuras 18A** y **18B** muestran la concentración que inhibe el 50% (IC_{50}) de la actividad enzimática después de 24 horas y 6 días de tratamiento, que corresponden a 320,5 μ M y 20,6 μ M, respectivamente.

Así mismo, se detectó la cantidad de células que expresan fosfatidilserina en la superficie celular (una característica observada en la apoptosis y otras formas de muerte celular), en células infectadas y no infectadas tratadas con la molécula **8**. Luego de 24 horas (**figura 18C**) y 6 días (**figuras 18D**) de exposición al compuesto se evidencia que el tratamiento por 6 días altera el funcionamiento de la célula desencadenando eventos tempranos de muerte celular. Por el contrario, un tratamiento durante 24h no ocasiona un desequilibrio en la célula que conlleven a un fenómeno de muerte y, asimismo, puede controlar la infección de dengue.



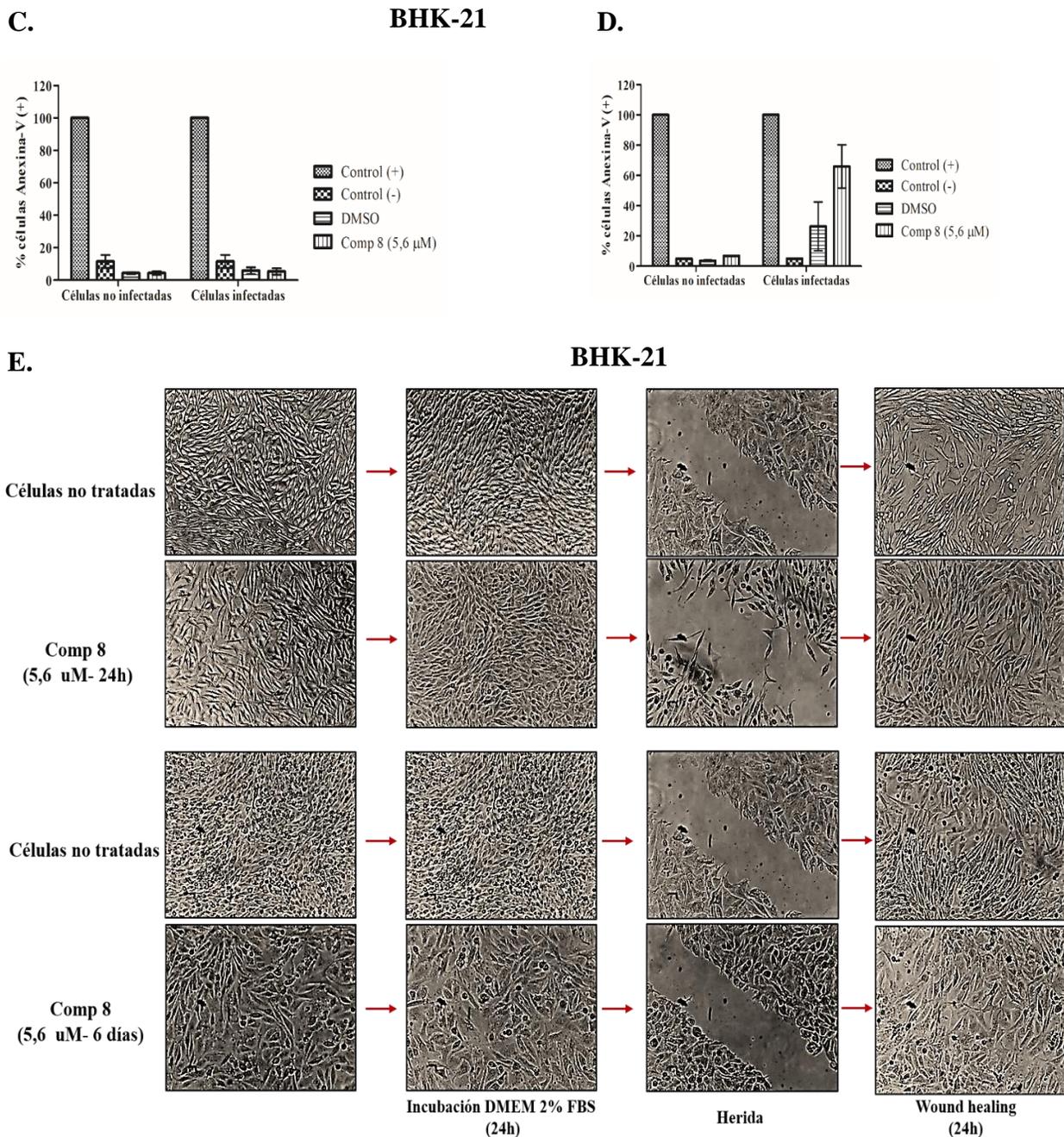


Figura 18. El tratamiento con el compuesto 8 no genera disrupción de la integridad metabólica o celular. Células BHK-21 se expusieron por 24 horas (A) y 6 días (B) a diferentes concentraciones de la molécula y se realizó el ensayo de MTT. Así mismo, se calculó el número de células positivas para anexina V, como indicativo de exposición de la fostatidilserina e inducción de muerte celular, tanto en células infectadas y no infectadas (C y D). La capacidad de migración de las células luego de remover el compuesto se determinó a través del ensayo de wound healing (E).

6.4.2 Los cambios morfológicos y moleculares inducidos por la molécula 8 son potencialmente reversibles

Para evidenciar si la alteración en la remodelación de actina causada por el análogo **8** es un efecto permanente, se efectuó un ensayo de wound healing, que tiene como objetivo evaluar la capacidad migratoria de las células, la cual es altamente dependiente de la dinámica de citoesqueleto de actina. En la **figura 18E**, se puede observar que una vez se retira el compuesto **8** (después de 24 horas y 6 días de tratamiento) y se adiciona medio fresco a las células, estas recuperan su morfología, siendo similar a la observada en células no tratadas. Además, cuando se hace una incisión sobre el monocapa celular, las células tienen la capacidad de migrar y sellar la herida (wound healing), lo que indica que cualquier efecto morfológico y molecular inducido por la molécula en la dinámica de la actina, no es permanente y por lo tanto, se revierte una vez se elimina el tratamiento.

7. DISCUSIÓN

En los últimos 5 años, las enfermedades emergentes, incluidas las causadas por ciertos arbovirus (Dengue, Zika, Chikungunya, Mayaro, etc) se han convertido nuevamente en un foco de atención para la comunidad médica, epidemiológica y científica, debido a su rápida expansión global y la diversidad de síntomas y complicaciones con que pueden cursar. Los brotes causados por el virus dengue, son especialmente importantes en zonas tropicales y subtropicales, sobre todo en las áreas urbanas y semiurbanas (91); por lo cual, la principal estrategia para evitar la transmisión es el control del mosquito vector, empleando insecticidas, evitando los depósitos de agua en los hogares y recientemente, con la introducción de poblaciones de mosquitos portadores de la bacteria *Wolbachia* (2).

Por otra parte, en 2019 la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) aprobó la primera vacuna tetravalente (DENVAXIA) para la prevención del dengue en regiones endémicas (4); no obstante, estas medidas siguen sin ser suficientes para contrarrestar los altos costos a los servicios de salud y a los sistemas económicos de los países afectados, lo que hace imperativo profundizar en la investigación y potencial implementación de fármacos antivirales que controlen la infección por este virus.

Dentro de los principales retos al momento de desarrollar un nuevo fármaco antiviral se encuentran: 1) la posibilidad de selección de mutantes de escape resistentes al medicamento, 2) el tiempo y costo de la investigación (básica, fases preclínica y clínica) y 3) la translación del compuesto a humanos debido principalmente a problemas de toxicidad.

Como táctica para superar el problema de la resistencia antiviral, recientemente se ha explorado el enfoque de antivirales dirigidos al hospedero (HTA, por sus siglas en inglés), el cual proporciona una buena estrategia contra los virus RNA, ya que los factores del hospedero tienen una alta barrera genética a la resistencia, actividad antiviral de amplio espectro, y mecanismos de acción diferentes y complementarios a los antivirales de acción directa (DAA). El cribado de alto rendimiento de compuestos clínicamente probados permite identificar funciones antivirales no descubiertas para terapias bien caracterizadas y el reposicionamiento de estos medicamentos puede evitar parte del costo inicial y el tiempo necesario para la validación y autorización (102). Por ejemplo, algunos compuestos catalogados como HTA son medicamentos aprobados por la FDA para el tratamiento de

enfermedades cardiovasculares, inflamatorias y el cáncer, lo que asegura que estos tengan mínimos o nulos efectos adversos (73).

Así mismo, se ha reportado una amplia lista de productos naturales derivados de plantas, los cuales exhiben actividad antiviral y debido a su origen, se espera que tengan buena tolerabilidad y mínimos efectos secundarios. Muchos de estos principios activos han sido estudiados como potenciales HTA, debido a su amplio espectro de acción, que incluye, entre otros, virus transmitidos por vectores artrópodos (25,103).

Teniendo en cuenta estas ventajas, previamente determinamos la actividad antiviral de los dos análogos del ferruginol, los compuestos 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol (compuesto **8**) y 18-oxoferruginol (compuesto **9**). Los resultados mostraron que el compuesto **8** tiene efecto antiviral contra dos cepas Herpesvirus Humanos (HHV-1 y HHV-2) y DENV-2, cuando el tratamiento se llevó a cabo después de la infección y empleando la línea celular Vero (27). Además, esta molécula inhibe la infección por ZIKV(28) (células PC3, HeLa y Vero) y de CHIKV (células Vero), (datos no publicados), lo cual sugiere un amplio espectro de acción antiviral.

En la presente investigación nos enfocamos en dilucidar el potencial mecanismo de acción antiviral del compuesto 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol durante la infección *in vitro* por el virus dengue serotipo 2, con el fin de comprobar si esta molécula actúa como un DAA o HTA. La efectividad antiviral de esta molécula se confirmó en varios puntos de la infección incluyendo la adherencia y entrada, además se realizaron ensayos pre y post infección mediante la metodología de Unidades Formadoras de Placa (PFU/mL). Así mismo, curvas de crecimiento viral y experimentos de tiempo-adición se llevaron a cabo a fin de conocer la dinámica de crecimiento viral y tener una aproximación de las ventanas temporales donde el análogo podría ejercer un mayor efecto.

Se comprobó que la molécula **8** no afecta la adherencia y/o entrada del virus y que es activa cuando se adiciona antes de la infección o post-infección en células BHK-21 y Huh-7. Dicha actividad se vio acompañada de cambios notables en la morfología celular (**figura 8**). Entre las diversas funciones del citoesqueleto, el mantenimiento o inducción de cambios en la forma celular es la más destacable. Esta función está mediada por la dinámica de polimerización y despolimerización de los filamentos de actina y los microtúbulos, que generan cambios en la forma celular y regulan la integridad de los compartimentos

intracelulares (104). Además, una extensa lista de estudios indican que el género *Flavivirus*, incluido el DENV, requiere de la dinámica del citoesqueleto para completar un ciclo de infección exitoso (11). Teniendo en cuenta los datos obtenidos, el compuesto **8** podría interrumpir la dinámica del citoesqueleto, afectando la forma celular y, por lo tanto, disminuyendo la infección por DENV-2.

La dinámica de replicación, durante uno o varios ciclos se estudió en la línea celular BHK-21, empleando curvas de crecimiento viral. Acorde con lo reportado en la literatura, las curvas muestran un comportamiento clásico esperado para un virus con envoltura como DENV, teniendo en cuenta la multiplicidad de infección empleada en cada caso (40). Los ensayos de tiempo-adición usando la curva de un solo paso, permiten establecer que la molécula **8** interrumpe eventos del ciclo viral que ocurren durante la etapa de eclipse (traducción de proteínas, replicación del genoma y ensamblaje) ya que reduce de manera significativa los títulos virales cuando se adiciona después de 6 y 12 h.p.i (**figura 9C**). Usando la curva no sincronizada (evaluación del efecto en múltiples ciclos de infección y sobre la dispersión intercelular), fue posible confirmar la capacidad del compuesto de alterar la diseminación viral, especialmente cuando se adiciona a las 72 h.p.i (**figura 9D**), momento en el cual, se está iniciando la segunda ronda de replicación.

Actualmente, la medicina *in silico* ha adquirido un gran valor para el pronóstico y validación de técnicas y estrategias que permiten predecir los efectos de un compuesto sobre la salud humana, siendo deseable tener acceso a los diferentes modelos tóxicos relacionados mecánicamente, metabólicamente y predicciones ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción) (105). De igual forma, técnicas computacionales como el docking molecular ganan importancia al momento de predecir la fuerza de asociación o afinidad de enlace entre dos moléculas (ligando-proteína). Considerando los datos hasta el momento, se decidió realizar docking molecular del análogo **8** con elementos del citoesqueleto, proteínas implicadas en la señalización de la polimerización de actina y proteínas virales importantes para la formación de los complejos replicativos.

Con base en el puntaje de afinidad (*scoring function* entre 0 y -16) del programa Autodock Vina (96), se puede inferir que hay una interacción alta a moderada del compuesto **8** con las proteínas celulares: RhoA (-9.8 kcal/mol), β -tubulina (-9.7 kcal/mol), G-actina (-9.3 kcal/mol) y de DENV-2: NS5 RdRp (-9.6 kcal/mol) NS5 Metiltransferasa (-9.5 kcal/mol) y

NS3 Helicasa (-9.4 kcal/mol). Teniendo en cuenta que este programa no contempla interacciones de tipo covalente, los enlaces más estables que se reportan corresponden a puentes de hidrógeno. En su mayoría, las interacciones encontradas entre el ligando y las proteínas previamente mencionadas son contactos de van de Waals y uno, máximo dos, puentes de hidrógeno en cada caso (**figura 10**), sugiriendo que la posible asociación de esta molécula con dichas proteínas es potencialmente reversible y menos estable que la reportada para sus inhibidores.

La presencia de una interacción de apilamiento (*pi-pi stacking*) entre el aminoácido Trp58 de la proteína RhoA y el anillo C del análogo **8** es relevante teniendo en cuenta que este tipo de unión es un poco más fuerte que otras no covalentes. Además, este mismo tipo de interacción se ha reportado con Rhosin, un inhibidor específico de esta GTPasa, el cual se une al área de superficie del Trp58 de RhoA, conllevando a la inhibición eficaz de la activación de esta proteína (106), sugiriendo que la molécula **8** podría actuar mediante un mecanismo similar. La “regla de cinco” de Lipinski establece que para que un compuesto pueda ser suministrado de forma oral, debe cumplir con al menos tres de las siguientes condiciones: poseer un peso molecular por debajo de 500, no tener más de 5 átomos donadores de enlaces de hidrógeno, poseer un coeficiente de partición octanol-agua debajo de 5 y no tener más de 10 átomos aceptores de enlaces de hidrógeno. Si dos o más de estos parámetros se encuentran fuera de rango, entonces es muy probable que el compuesto presente, o bien escasa solubilidad o bien una baja absorción y permeabilidad (64). De acuerdo con el resultado arrojado por el programa Molsoft, la molécula 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol solo incumple uno de estos parámetros (Log P > 5), relacionado con una escasa solubilidad. Además, el modelo de *drug-likeness* indica que este compuesto tiene un puntaje de 0,63 y por tanto es similar al de ciertos fármacos ya aprobados (**figura 11**). Los parámetros farmacocinéticos analizados con la herramienta SwissADME, permiten apreciar que el compuesto estudiado tiene elevada absorción gastrointestinal, y capacidad de traspasar la barrera hematoencefálica, sin inhibir las isoformas CYP1A2, CYP2D6 del citocromo P450. Esto podría estar directamente relacionado con la habilidad de esta molécula para actuar como sustrato de la glicoproteína de permeabilidad (P-gP) ya que se ha sugerido que CYP y P-gp pueden procesar pequeñas moléculas de forma sinérgica para mejorar la protección de tejidos y organismos (97). Todo

lo anterior, permite deducir que, de manera predictiva, la molécula **8** tiene las características requeridas para postularse como un potencial fármaco antiviral.

Para validar biológicamente los resultados obtenidos empleando acoplamiento molecular y tener un acercamiento sobre cuál es el mecanismo de acción antiviral de la molécula **8**, se realizaron técnicas basadas en microscopía (microscopía cuantitativa de fluorescencia) y en biología celular/molecular (actividad de la enzima luciferasa y GTPasa RhoA, WB y RT-qPCR).

El efecto del compuesto **8** sobre los tres tipos de filamentos que componen el citoesqueleto: microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos, se evidenció mediante el marcaje con anticuerpos específicos para cada elemento. En la **figura 14** se aprecia que el análogo 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol induce cambios evidentes en la remodelación de actina, ya que hay una reducción drástica de los filamentos en las células infectadas y tratadas. De igual forma, se puede notar una aparente acumulación de la actina en la membrana celular. Un efecto similar sobre los filamentos intermedios y microtúbulos fue descartado, ya que no se evidenciaron cambios notorios en su distribución en presencia de esta molécula.

La reorganización de actina se encuentra regulada por medio de la señalización de las Rho GTPAsas, que actúan como interruptores moleculares para que se formen protrusiones en la membrana celular como filopodios y lamelipodios (Cdc42 y Rac1, respectivamente) y fibras de tensión (RhoA) (12). Durante la infección por DENV y otros flavivirus, la remodelación de actina ha sido ampliamente reportada en las etapas iniciales (entrada) y tardías (liberación) del ciclo de replicación, así como la señalización mediada por Rac-1 y Cdc42 (11,14). Sin embargo, poco se conoce sobre la participación del citoesqueleto de actina durante los eventos que ocurren en la fase de eclipse, incluidos la síntesis de proteínas y la replicación del genoma viral.

Para intentar esclarecer este interrogante, la activación de la GTPasa RhoA durante la infección por DENV-2 fue evaluada en células Huh-7, considerando: 1) la energía libre de unión del compuesto **8** con esta proteína (-9.8 kcal/mol), así como su similitud en cuanto a interacciones con el inhibidor específico de RhoA (Rhosin) y 2) la importancia de la activación de RhoA para la formación de los filamentos de actina. El ensayo realizado permite detectar que hay diferencias estadísticamente significativas en la activación de esta GTPasa en células infectadas con DENV-2 luego de 6 h.p.i, al compararse con el control de

células no infectadas. Cuando se adicionó en este punto de la infección, el compuesto **8** redujo de manera relevante dicha activación. Por otra parte, luego de 12h de infección, no se observó un cambio representativo en la activación de esta proteína (**figura 15**).

Durante la infección viral, en la denominada fase de eclipse (llamada así porque no se detectan partículas virales en el medio extracelular), se llevan a cabo los procesos de traducción de proteínas, síntesis de RNA y ensamblaje de nuevos viriones (40). Los flavivirus, entre ellos el DENV, se caracterizan por realizar estos procesos de manera estrechamente coordinada tanto en el tiempo como en el espacio, ya que no pueden ocurrir de manera simultánea y, por lo tanto, son mutuamente excluyentes (107). Tales eventos, ocurren en estructuras derivadas de las membranas de ER, denominadas fabricas virales (54) que, a su vez, están constituidas por varias subestructuras: membranas convuladas (CM), paquetes vesiculares (VP), y bolsas de virus (VB), en donde se ha reportado ocurren la traducción proteica, la síntesis de nuevos genomas, y el ensamblaje viral, respectivamente (108–110).

La síntesis de proteínas virales ocurre en la superficie del ER y da como resultado la producción de una poliproteína anclada a la membrana del ER. Una primera ronda de traducción debe tener lugar para producir todas las proteínas virales (incluyendo la polimerasa viral-NS5), la cual está ausente en la partícula infecciosa. Por lo tanto, la traducción es un paso crítico para la iniciación de la síntesis del RNA viral y su posterior amplificación (107). Algunos investigadores han reportado que ciertos flavivirus, incluyendo todos los serotipos de DENV, generan una interrupción (*shut-off*) de la traducción de proteínas de la célula hospedera en la línea celular Huh-7, específicamente de aquellas asociadas al ER (111).

La replicación del RNA viral es el paso central que conduce a la amplificación del virus y consta de la síntesis *de novo* del RNA. Durante la replicación de DENV, dicho proceso está mediada por la dinámica y ensamblaje de múltiples proteínas unidas a la membrana del ER conformando el complejo de replicación (RC) (112). Las nuevas moléculas de RNA se utilizarán posteriormente para la formación de más RC, la producción de proteínas virales mediada por la traducción y para el ensamblaje de nuevos viriones (107). El RC está compuesto por proteínas virales y de la célula hospedera que se ensamblan dentro de vesículas derivadas del ER (cerca del núcleo) y de los intermediarios de replicación (dsRNA).

Las principales proteínas virales que conforman en el RC son: NS4B, una proteína integral de membrana que juega un papel en la virulencia y en la respuesta inmune innata, que se une a la proteasa-helicasa NS2B-NS3 y que a su vez interactúa con la polimerasa metil-transferasa NS5 (112).

Los ensayos empleando el virus recombinante RLUC DENV-2, permitieron esclarecer que el evento más afectado por el tratamiento con el compuesto **8** cuando se adicionó después de la infección por un periodo de 3 horas es la traducción proteica, lo que se hace evidente en la cuantificación de proteínas virales empleando WB, sin que se induzca una reducción significativa de las copias de RNA viral (**figura 13**). Además, este dato se confirmó cuando se midió la intensidad media de fluorescencia (IMF) de las proteínas de envoltura y NS3, en células BHK-21 y Huh-7 infectadas y tratadas con el compuesto por un periodo de 24 horas (**figuras 14 y 16**).

En la **figura 16** se puede evidenciar que durante el tratamiento con el compuesto **8** hay una disminución significativa de la cantidad de dsRNA y NS3 en las dos líneas celulares empleadas para este ensayo. Así mismo, se observa un cambio claro en el patrón de distribución de estos componentes virales cuando las células infectadas se exponen al compuesto, considerando que de acuerdo a lo reportado en la literatura, el dsRNA y la proteínas NS3 se localizan principalmente en la región perinuclear (112); lo opuesto a lo generado por nuestra molécula, en donde la localización de estos elementos del RC se perfilan más hacia la periferia celular. Estos hallazgos indican que la molécula **8** tiene un efecto importante sobre la formación y distribución de los RC, lo cual probablemente esté mediado por la reducción en la síntesis de proteínas virales que induce el compuesto en etapas tempranas de la infección (4 h.p.i).

Teniendo en cuenta que el ER es la plataforma empleada por los flavivirus a partir de la cual se generan los compartimentos membranosos requeridos para que el virus realice la traducción, síntesis de RNA y ensamblaje, el efecto de la molécula **8** sobre este importante orgánulo fue determinado. En la **figura 17** se denota que no hay cambios morfológicos relevantes sobre ER en presencia del tratamiento con el compuesto. Esto podría explicarse, entre otras cosas, porque la interdependencia del ER y el citoesqueleto está mediada principalmente por los microtúbulos (113,114), y como se mencionó previamente, la molécula **8** no tiene efectos relevantes sobre este componente celular.

Aunque no existen reportes relacionados con la participación de los filamentos de actina en la formación de complejos de replicación, síntesis de proteínas y/o transcripción del genoma de DENV, se ha informado que otros virus de RNA aprovechan la actina para llevar a cabo algunos de estos procesos. Utilizando microscopía de fluorescencia, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) y ensayos de microscopía electrónica, Lai y colaboradores informaron que el complejo de replicación de HCV se forma través de la interacción de las proteínas NS3 y NS5 con los filamentos de actina (115).

Para la síntesis del RNA del virus del sarampión (MV) se ha encontrado que la cofilina, una proteína de unión a actina, soporta la formación del complejo de ribonucleoproteína (RNP) en la región perinuclear y mejora la replicación del genoma (116). Además, la inhibición del complejo ARP2/3, implicado en la polimerización de G actina, reduce drásticamente la replicación del HIV-1, considerando que este complejo proteico es necesario para el tráfico de partículas virales hacia al núcleo (117). Por otra parte, se ha demostrado que Rac1 es importante durante la replicación del genoma del virus de la influenza (IV), ya que el tratamiento de células infectadas con el inhibidor NSC23766, afecta el complejo de la polimerasa viral y reduce la expresión de proteínas virales (118).

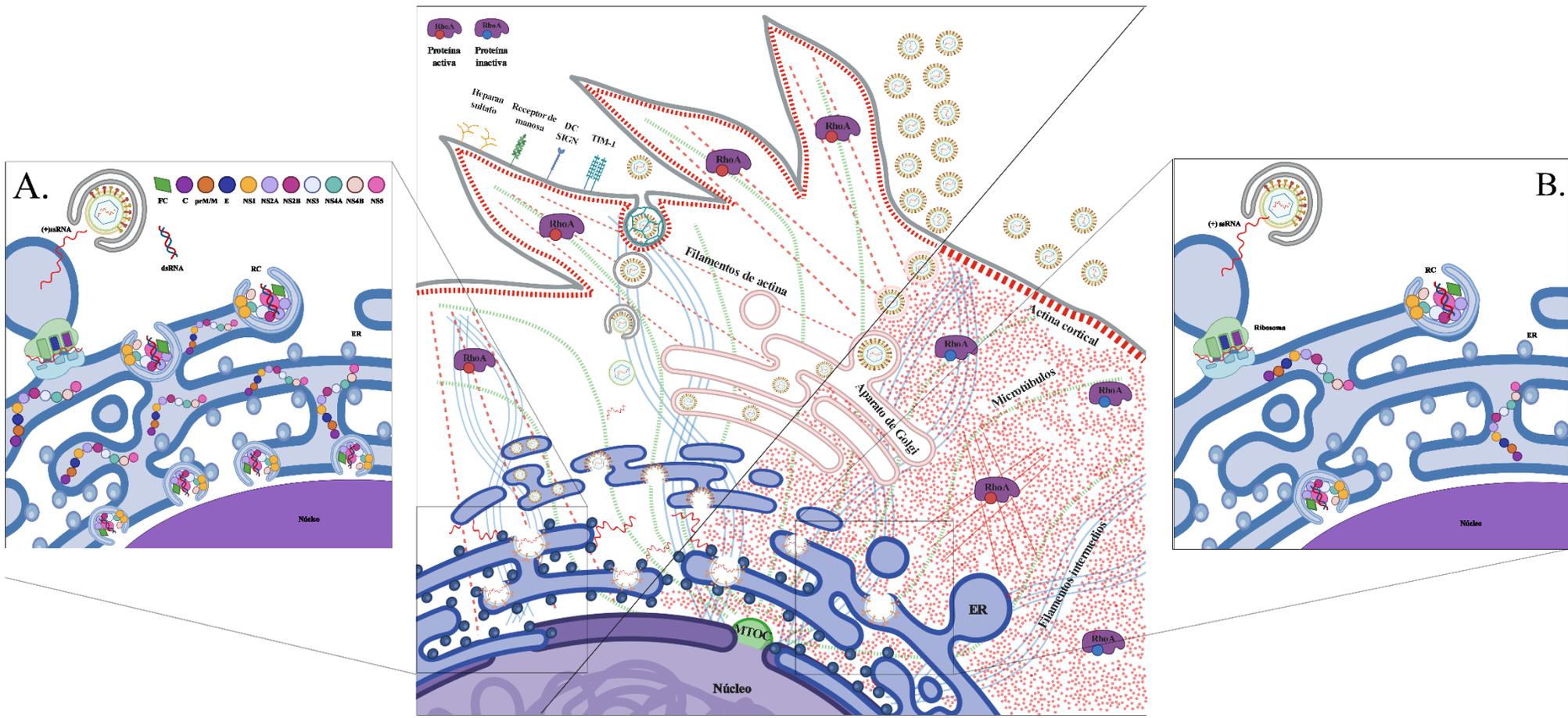
El papel de la actina en el ciclo replicativo del virus sincitial respiratorio (RSV) está bien documentado. Se ha reportado que la forma monomérica y así cómo los filamentos de actina activan la transcripción viral, mientras que sólo la forma de microfilamento puede participar en la morfogénesis y/o liberación (119). Durante la infección con este virus, se ha encontrado además que la activación de RhoA está asociada con la morfología del virus (virus filamentosos) y la formación de sincitios, pero que es prescindible para la infección y producción eficiente de virus infecciosos *in vitro* (120).

Por último, teniendo en cuenta los efectos morfológicos encontrados en la célula, se hizo imperativo caracterizar el impacto del compuesto 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol sobre la integridad metabólica y celular en presencia o ausencia de la infección viral. Esto es particularmente importante, ya que en células tumorales el ferruginol, molécula a partir de la cual se diseñó nuestro compuesto, potencia la expresión de la proteína proapoptótica BAX e inhibe dos vías de señalización implicadas en la supervivencia y proliferación celular (Ras/PI3K y Jak/STAT) (87).

Los resultados de los ensayos de MTT y detección de células positivas para anexina V, indican que la molécula no presenta efectos relacionados con alteraciones metabólicas o inducción de muerte celular (**figura 18**), cuando el tratamiento se deja en las células por un periodo corto de tiempo (24 horas). De igual manera, la capacidad de la célula para recuperar su morfología normal y de migrar luego de remover el compuesto **8** (**figura 18E**), es un indicativo de que las interacciones *in vivo* que realiza con los componentes celulares son poco estables y que los efectos ocasionados por el mismo son reversibles. La información arrojada por estos experimentos representa un valioso indicio de que este compuesto no genera efectos tóxicos sobre las células en las concentraciones y tiempos en los que se encontró actividad antiviral, y, por lo tanto, podría escalar a una siguiente etapa de investigación pre-clínica. El resumen de los principales hallazgos obtenidos en este trabajo que hacen referencia al potencial mecanismo de acción antiviral del compuesto **8**, se encuentran representados en la **figura 19**.

Figura 19. Potencial mecanismo de acción antiviral del compuesto 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol.

En el panel A, se representa el ciclo replicativo de DENV-2, así como la organización y distribución normal de los elementos del citoesqueleto (filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos) y la activación de la GTPasa RhoA. En el zoom, se pueden apreciar los procesos de traducción de la poliproteína viral, así como la formación de los complejos replicativos derivados de las membranas del ER. Como se ilustra en el panel B, el tratamiento post-infección con el compuesto **8** afecta la remodelación de actina (reducción de los filamentos de actina y acumulación de actina cortical) y reduce el estado de activación de RhoA; no obstante, esta molécula no altera la reorganización de los microtúbulos ni de los filamentos intermedios. El acercamiento del efecto sobre los procesos que ocurren en la fase de eclipse de la infección, indica que el análogo 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol reduce significativamente la síntesis de nuevas proteínas virales y por ende, la formación de los complejos replicativos podría estar siendo afectada. FC:factores celulares;C:Capside; PrM/M:precursor de la proteína de membrana/membrana;E:Envoltura;NS:proteínas no estructurales;RC: complejos replicativos; (+) ssRNA: RNA monocatenario de sentido positivo; dsRNA: RNA de doble cadena (intermediarios replicativos); ER: retículo endoplasmático. MTOC: centro organizador de microtúbulos.



8. CONCLUSIONES

- Se reporta por primera vez el potencial mecanismo de acción por el cual el análogo de ferruginol, 18-(ftalimida-2-il)-ferruginol, induce actividad antiviral durante la infección *in vitro* por DENV-2, demostrándose que este compuesto afecta principalmente la traducción de proteínas virales y la remodelación de actina.
- Si bien no es posible aseverar que hay una relación directa entre el efecto del compuesto **8** sobre la remodelación de actina, la reducción de la síntesis de proteína viral y los cambios observados en los complejos replicativos, este estudio representa un punto de partida para ahondar en una investigación que permita confirmar o refutar si la dinámica de actina, específicamente aquella mediada por la GTPasa RhoA, juega un rol crucial en la traducción proteica o en otro etapa de la infección por DENV-2.
- Los datos obtenidos empleando herramientas *in silico* promueven la realización de un análisis sobre los estudios de relación estructural, de índole cuantitativo llamados “estudios de estructura-actividad” (QSAR, por sus siglas en inglés). Estos análisis podrían permitir que se lleve a cabo la síntesis de análogos de ferruginol más lipofílicos y con mejores propiedades farmacológicas.
- La evidencia de los pocos efectos tóxicos y potencialmente reversibles sobre la célula inducidos por el compuesto **8**, motivan la realización de ensayos biofarmacéuticos y preclínicos con esta molécula, con el fin de postular un antiviral promisorio para el tratamiento de las infecciones por DENV.

9. PERSPECTIVAS

- Estudiar dinámicamente, usando imagenología de células vivas (Live Cell Imaging), la fase de eclipse durante el ciclo replicativo de DENV para evidenciar la posible relación entre la dinámica de actina, la traducción de proteínas, replicación del genoma y ensamblaje del virus.
- Evaluar funcionalmente y en periodos de tiempo más cortos, la participación de RhoA durante la infección por DENV, específicamente durante los eventos que ocurren en la fase de eclipse tales como: traducción, replicación y ensamblaje del genoma viral.
- Comprobar biológicamente, empelando modelos *in vivo*, las predicciones farmacocinéticas de la molécula **8** con el fin de comprobar si este compuesto tiene características de “*druglikeness*”.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cucunawangsih null, Lugito NPH. Trends of Dengue Disease Epidemiology. *Virol Res Treat.* 2017;8:1178122X17695836.
2. Rather IA, Parray HA, Lone JB, Paek WK, Lim J, Bajpai VK, et al. Prevention and Control Strategies to Counter Dengue Virus Infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:336.
3. Pang T, Mak TK, Gubler DJ. Prevention and control of dengue-the light at the end of the tunnel. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(3):e79–87.
4. Hadinegoro SR, Arredondo-García JL, Capeding MR, Deseda C, Chotpitayasunondh T, Dietze R, et al. Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. *N Engl J Med.* 2015;373(13):1195–206.
5. Mackenzie J. Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic Cph Den.* 2005;6(11):967–77.
6. den Boon JA, Ahlquist P. Organelle-like membrane compartmentalization of positive-strand RNA virus replication factories. *Annu Rev Microbiol.* 2010;64:241–56.
7. Neufeldt CJ, Cortese M, Acosta EG, Bartenschlager R. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nat Rev Microbiol.* 12 de 2018;16(3):125–42.
8. Foo KY, Chee H-Y. Interaction between Flavivirus and Cytoskeleton during Virus Replication. *BioMed Res Int.* 2015;2015:427814.
9. Van den Broeke C, Jacob T, Favoreel HW. Rho'ing in and out of cells: viral interactions with Rho GTPase signaling. *Small GTPases.* 2014;5:e28318.
10. Naghavi MH, Walsh D. Microtubule Regulation and Function during Virus Infection. *J Virol.* 15 de 2017;91(16).
11. Zhang Y, Gao W, Li J, Wu W, Jiu Y. The Role of Host Cytoskeleton in Flavivirus Infection. *Virol Sin.* febrero de 2019;34(1):30–41.
12. Hall A. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans.* 2005;33(Pt 5):891–5.
13. Wang J-L, Zhang J-L, Chen W, Xu X-F, Gao N, Fan D-Y, et al. Roles of small GTPase Rac1 in the regulation of actin cytoskeleton during dengue virus infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(8).

14. Cuartas-López AM, Hernández-Cuellar CE, Gallego-Gómez JC. Disentangling the role of PI3K/Akt, Rho GTPase and the actin cytoskeleton on dengue virus infection. *Virus Res.* 2018;256:153–65.
15. Orozco-García E, Trujillo-Correa A, Carlos Gallego-Gómez J. Cell Biology of Virus Infection. The Role of Cytoskeletal Dynamics Integrity in the Effectiveness of Dengue Virus Infection. *Cell Biol - New Insights.*2016.
16. Zhang J, Wu N, Gao N, Yan W, Sheng Z, Fan D, et al. Small G Rac1 is involved in replication cycle of dengue serotype 2 virus in EAhy926 cells via the regulation of actin cytoskeleton. *Sci China Life Sci.* 2016;59(5):487–94.
17. Hodge RG, Ridley AJ. Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(8):496–510.
18. Zamudio-Meza H, Castillo-Alvarez A, González-Bonilla C, Meza I. Cross-talk between Rac1 and Cdc42 GTPases regulates formation of filopodia required for dengue virus type-2 entry into HMEC-1 cells. *J Gen Virol.* 2009;90(12):2902–11.
19. Singh S, Anupriya MG, Modak A, Sreekumar E. Dengue virus or NS1 protein induces trans-endothelial cell permeability associated with VE-Cadherin and RhoA phosphorylation in HMEC-1 cells preventable by Angiopoietin-1. *J Gen Virol.* 2018;99(12):1658–70.
20. Teo CSH, Chu JJH. Cellular vimentin regulates construction of dengue virus replication complexes through interaction with NS4A protein. *J Virol.* 2014;88(4):1897–913.
21. Lei S, Tian Y-P, Xiao W-D, Li S, Rao X-C, Zhang J-L, et al. ROCK is involved in vimentin phosphorylation and rearrangement induced by dengue virus. *Cell Biochem Biophys.* 2013;67(3):1333–42.
22. Plummer E, Buck MD, Sanchez M, Greenbaum JA, Turner J, Grewal R, et al. Dengue Virus Evolution under a Host-Targeted Antiviral. *J Virol.* 2015;89(10):5592–601.
23. Boldescu V, Behnam MAM, Vasilakis N, Klein CD. Broad-spectrum agents for flaviviral infections: dengue, Zika and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(8):565–86.
24. Makhluף H, Kim K, Shresta S. Novel strategies for discovering inhibitors of Dengue and Zika fever. *Expert Opin Drug Discov.* 2016;11(10):921–3.
25. Martinez JP, Sasse F, Brönstrup M, Diez J, Meyerhans A. Antiviral drug discovery: broad-spectrum drugs from nature. *Nat Prod Rep.* 2015;32(1):29–48.
26. Low JGH, Ooi EE, Vasudevan SG. Current Status of Dengue Therapeutics Research and Development. *J Infect Dis.* 2017;215(suppl_2):S96–102.

27. Roa-Linares VC, Brand YM, Agudelo-Gomez LS, Tangarife-Castaño V, Betancur-Galvis LA, Gallego-Gomez JC, et al. Anti-herpetic and anti-dengue activity of abietane ferruginol analogues synthesized from (+)-dehydroabietylamine. *Eur J Med Chem.* 2016;108:79–88.
28. Sousa FTG, Nunes C, Romano CM, Sabino EC, González-Cardenete MA. Anti-Zika virus activity of several abietane-type ferruginol analogues. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2020;62:e97.
29. Young PR, Ng LFP, Hall RA, Smith DW, Johansen CA. Arbovirus infections. En: 23rd edn. Amsterdam: Manson's tropical diseases, Elsevier; 2014. p. 129–161.
30. Young PR. Arboviruses: A Family on the Move. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1062:1–10.
31. Mayer SV, Tesh RB, Vasilakis N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Trop.* 2017;166:155–63.
32. Laureti M, Narayanan D, Rodriguez-Andres J, Fazakerley JK, Kedzierski L. Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. *Front Immunol.* 2018;9:2180.
33. Aktepe TE, Mackenzie JM. Shaping the flavivirus replication complex: It is curvaceous! *Cell Microbiol.* 2018;20(8):e12884.
34. Murray CL, Jones CT, Rice CM. Architects of Assembly: roles of Flaviviridae nonstructural proteins in virion morphogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(9):699–708.
35. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(3):480–96.
36. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, World Health Organization, editores. *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control.* New ed. Geneva: TDR : World Health Organization; 2009. 147 p.
37. Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet Lond Engl.* 2015;385(9966):453–65.
38. PAHO/WHO Data - PLISA [Internet]. [citado 14 de diciembre de 2020]. Disponible en: <https://www.paho.org/data/index.php/en/>
39. Boletín Epidemiológico [Internet]. [citado 14 de diciembre de 2020]. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Paginas/Vista-Boletin-Epidemilologico.aspx>

40. Flint JS, Enquist LW, Skalka AM. Foundations. En: Flint JS, Enquist LW, Skalka AM. Principles of Virology 4th Edition. Washington, D.C: American Society for Microbiology; 2015. p. 2-23.
41. Arakawa M, Morita E. Flavivirus Replication Organelle Biogenesis in the Endoplasmic Reticulum: Comparison with Other Single-Stranded Positive-Sense RNA Viruses. *Int J Mol Sci.* 2019;20(9).
42. Taylor MP, Koyuncu OO, Enquist LW. Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(6):427–39.
43. Walsh D, Mohr I. Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(12):860–75.
44. Jackson WT. Viruses and the autophagy pathway. *Virology.* 2015;479–480:450–6.
45. Orozco-García E, Gallego-Gómez JC. Autophagy and Lipid Metabolism-A Cellular Platform where Molecular and Metabolic Pathways Converge to Explain Dengue Viral Infection. *Cell Biol - New Insights.* 2016.
46. Fan Y, Sanyal S, Bruzzone R. Breaking Bad: How Viruses Subvert the Cell Cycle. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:396.
47. Nelemans T, Kikkert M. Viral Innate Immune Evasion and the Pathogenesis of Emerging RNA Virus Infections. *Viruses.* 2019;11(10).
48. Hincapie V, Gallego-Gómez JC. TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA INDUCIDA POR VIRUS. *Acta Biológica Colomb.* 2021.26(1).
49. Martín-Acebes MA, Jiménez de Oya N, Saiz J-C. Lipid Metabolism as a Source of Druggable Targets for Antiviral Discovery against Zika and Other Flaviviruses. *Pharm Basel Switz.* 2019;12(2).
50. Glingston RS, Deb R, Kumar S, Nagotu S. Organelle dynamics and viral infections: at cross roads. *Microbes Infect.* 2019;21(1):20–32.
51. Artpradit C, Robinson LN, Gavrillov BK, Rurak TT, Ruchirawat M, Sasisekharan R. Recognition of heparan sulfate by clinical strains of dengue virus serotype 1 using recombinant subviral particles. *Virus Res.* 2013;176(0):69–77.
52. Cruz-Oliveira C, Freire JM, Conceição TM, Higa LM, Castanho MARB, Da Poian AT. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiol Rev.* 2015;39(2):155–70.
53. den Boon JA, Ahlquist P. Organelle-like membrane compartmentalization of positive-strand RNA virus replication factories. *Annu Rev Microbiol.* 2010;64:241–56.

54. Fernández de Castro I, Tenorio R, Risco C. Virus Factories. Ref Module Life Sci. 2020.
55. Chang J, Block TM, Guo J-T. Antiviral therapies targeting host ER alpha-glucosidases: Current status and future directions. *Antiviral Res.* 2013;99(3):251–60.
56. Li L, Lok S-M, Yu I-M, Zhang Y, Kuhn RJ, Chen J, et al. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science.* 2008;319(5871):1830–4.
57. Matthews JD, Morgan R, Sleighter C, Frey TK. Do viruses require the cytoskeleton? *Virology.* 2013;10:121.
58. Ayala-Nunez NV, Hoornweg TE, van de Pol DPI, Sjollem KA, Flipse J, van der Schaar HM, et al. How antibodies alter the cell entry pathway of dengue virus particles in macrophages. *Sci Rep.* 2016;6:28768.
59. Yang J, Zou L, Hu Z, Chen W, Zhang J, Zhu J, et al. Identification and characterization of a 43 kDa actin protein involved in the DENV-2 binding and infection of ECV304 cells. *Microbes Infect.* 2013;15(4):310–8.
60. Shrivastava N, Sripada S, Kaur J, Shah PS, Cecilia D. Insights into the internalization and retrograde trafficking of Dengue 2 virus in BHK-21 cells. *PloS One.* 2011;6(10):e25229.
61. Chen W, Gao N, Wang J, Tian Y, Chen Z, An J. Vimentin is required for dengue virus serotype 2 infection but microtubules are not necessary for this process. *Arch Virol.* 2008;153(9):1777–81.
62. Kanlaya R, Pattanakitsakul S, Sinchaikul S, Chen S-T, Thongboonkerd V. Vimentin interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and dengue nonstructural protein 1 and is important for viral replication and release. *Mol Biosyst.* 2010;6(5):795–806.
63. Connelly CM, Moon MH, Schneekloth JS. The Emerging Role of RNA as a Therapeutic Target for Small Molecules. *Cell Chem Biol.* 2016;23(9):1077–90.
64. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;46(1–3):3–26.
65. Veber DF, Johnson SR, Cheng H-Y, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem.* 2002;45(12):2615–23.
66. Arkin MR, Wells JA. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(4):301–17.

67. Samanen J. Similarities and differences in the discovery and use of biopharmaceuticals and small-molecule chemotherapeutics. En: Ganellin R, Roberts S, Jefferis R, editores. *Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development*. Oxford: Elsevier; 2013. p. 161–203.
68. Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol*. 1997;51:151–78.
69. Domingo E, Baranowski E, Nuñez JI, Ruiz-Jarabo CM, Sierra S, Molina N, et al. Cuasiespecies y evolución molecular de virus. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*. 2000;19(1):55–63.
70. Coen, D.M., Richman, D.D. Antiviral Agents. En: Knipe, D.M., Howley, P.M., editor. *Fields Virology*. Six edition. Philadelphia, PA 19103 USA; 2013.
71. Delang L, Vliegen I, Froeyen M, Neyts J. Comparative Study of the Genetic Barriers and Pathways towards Resistance of Selective Inhibitors of Hepatitis C Virus Replication⁷. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(9):4103–13.
72. Richman DD, Nathanson N. Antiviral Therapy. *Viral Pathog*. 2016;271–87.
74. Chaudhuri S, Symons JA, Deval J. Innovation and trends in the development and approval of antiviral medicines: 1987–2017 and beyond. *Antiviral Res*. 2018;155:76–88.
75. Celgosivir or Modipafant as Treatment for Adult Participants With Uncomplicated Dengue Fever in Singapore - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [citado 30 de septiembre de 2020]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02569827>
76. Souza DG, Fagundes CT, Sousa LP, Amaral FA, Souza RS, Souza AL, et al. Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(33):14138–43.
77. Rathore APS, Paradkar PN, Watanabe S, Tan KH, Sung C, Connolly JE, et al. Celgosivir treatment misfolds dengue virus NS1 protein, induces cellular pro-survival genes and protects against lethal challenge mouse model. *Antiviral Res*. 2011;92(3):453–60.
78. Traditional Herbal Medicine - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. [citado 1 de octubre de 2020]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/traditional-herbal-medicine>
79. Lin L-T, Chen T-Y, Lin S-C, Chung C-Y, Lin T-C, Wang G-H, et al. Broad-spectrum antiviral activity of chebulagic acid and punicalagin against viruses that use glycosaminoglycans for entry. *BMC Microbiol*. 2013;13:187.

80. Padilla-S L, Rodríguez A, Gonzales MM, Gallego-G JC, Castaño-O JC. Inhibitory effects of curcumin on dengue virus type 2-infected cells in vitro. *Arch Virol.* 2014;159(3):573–9.
81. Moghaddam E, Teoh B-T, Sam S-S, Lani R, Hassandarvish P, Chik Z, et al. Baicalin, a metabolite of baicalein with antiviral activity against dengue virus. *Sci Rep.* 2014;4(1):5452–5452.
82. González Cardenete Miguel Ángel, Betancur Galvis Liliana Amparo. Ferruginol analogues as antiviral agents. WO2016142568A1, 2016.
83. Kushwaha N, Kaushik D. Recent Advances and Future Prospects of Phthalimide Derivatives -. *J Appl Pharm Sci.* 2016;6(3):159–71.
84. Júnior JG da S, Holanda VN, Rodrigues Gambôa DS, Monte TVS do, Júnior JG da S, Júnior JAA do N, et al. Therapeutic Potential of Phthalimide Derivatives: A Review. *American Journal of Biomedical Science & Research.* 2019.
85. Wen C-C, Kuo Y-H, Jan J-T, Liang P-H, Wang S-Y, Liu H-G, et al. Specific plant terpenoids and lignoids possess potent antiviral activities against severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Med Chem.* 2007;50(17):4087–95.
86. Antonio A da S, Wiedemann LSM, Veiga-Junior VF. Natural products' role against COVID-19. *RSC Adv.* 2020;10(39):23379–93.
87. Bispo de Jesus M, Zambuzzi WF, Ruela de Sousa RR, Areche C, Santos de Souza AC, Aoyama H, et al. Ferruginol suppresses survival signaling pathways in androgen-independent human prostate cancer cells. *Biochimie.* 2008;90(6):843–54.
88. Areche C, Theoduloz C, Yáñez T, Souza-Brito ARM, Barbastefano V, de Paula D, et al. Gastroprotective activity of ferruginol in mice and rats: effects on gastric secretion, endogenous prostaglandins and non-protein sulfhydryls. *J Pharm Pharmacol.* 2008;60(2):245–51.
89. Espinoza M, Santos LS, Theoduloz C, Schmeda-Hirschmann G, Rodríguez JA. New gastroprotective ferruginol derivatives with selective cytotoxicity against gastric cancer cells. *Planta Med.* 2008;74(8):802–8.
90. Saijo H, Kofujita H, Takahashi K, Ashitani T. Antioxidant activity and mechanism of the abietane-type diterpene ferruginol. *Nat Prod Res.* 2015;29(18):1739–43.
91. Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB. Dengue infection. *Nat Rev Dis Primer.* 2016;2(1):1–25.
92. González MA, Pérez-Guaita D. Short syntheses of (+)-ferruginol from (+)-dehydroabietylamine. *Tetrahedron.* 2012;68(47):9612–5.

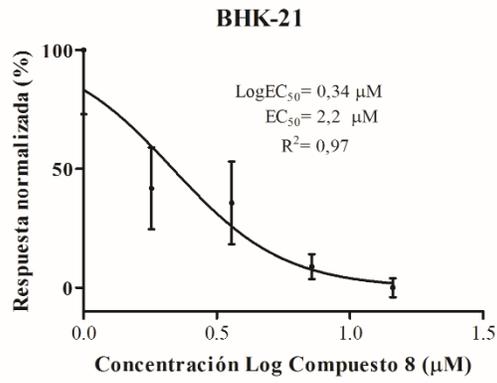
93. Flint, S.J.; Enquist, W.; Racaniello, V.R.; Skalka, A.M. The Infectious Cycle. En: Flint JS, Enquist LW, Skalka AM. Principles of Virology 4th Edition. Washington, D.C: American Society for Microbiology; 2015. p. 25-52.
94. Roa-Linares VC, Miranda-Brand Y, Tangarife-Castaño V, Ochoa R, García PA, Castro MÁ, et al. Anti-Herpetic, Anti-Dengue and Antineoplastic Activities of Simple and Heterocycle-Fused Derivatives of Terpenyl-1,4-Naphthoquinone and 1,4-Anthraquinone. *Mol Basel Switz.* 2019;24(7).
95. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* 2009;30(16):2785–91.
96. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J Comput Chem.* 2010;31(2):455–61.
97. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep.* 2017;7:42717.
98. Molsoft L.L.C.: Drug-Likeness and molecular property prediction. [Internet]. [citado 15 de diciembre de 2020]. Disponible en: <https://molsoft.com/mprop/>
99. Castellanos JE, Neissa JI, Camacho SJ. Dengue virus induces apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Biomédica.* agosto de 2016;36:156–68.
100. Grada A, Otero-Vinas M, Prieto-Castrillo F, Obagi Z, Falanga V. Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *J Invest Dermatol.* 2017;137(2):e11–6.
101. Takhampunya R, Ubol S, Houng H-S, Cameron CE, Padmanabhan R. Inhibition of dengue virus replication by mycophenolic acid and ribavirin. *J Gen Virol.* 2006;87(Pt 7):1947–52.
102. García-Serradilla M, Risco C, Pacheco B. Drug repurposing for new, efficient, broad spectrum antivirals. *Virus Res.* 15 de 2019;264:22–31.
103. Goh VSL, Mok C-K, Chu JJH. Antiviral Natural Products for Arbovirus Infections. *Molecules.* 2020;25(12).
104. Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature.* 2010;463(7280):485–92.
105. Bruno A, Costantino G, Sartori L, Radi M. The In Silico Drug Discovery Toolbox: Applications in Lead Discovery and Optimization. *Curr Med Chem.* 2019;26(21):3838–73.

106. Shang X, Marchioni F, Sipes N, Evelyn CR, Jerabek-Willemsen M, Duhr S, et al. Rational design of small molecule inhibitors targeting RhoA subfamily Rho GTPases. *Chem Biol.* 2012;19(6):699–710.
107. Mazeaud C, Freppel W, Chatel-Chaix L. The Multiples Fates of the Flavivirus RNA Genome During Pathogenesis. *Front Genet.* 2018;9:595.
108. Aktepe TE, Mackenzie JM. Shaping the flavivirus replication complex: It is curvaceous! *Cell Microbiol.* 2018;20(8):e12884.
109. Cortese M, Goellner S, Acosta EG, Neufeldt CJ, Oleksiuk O, Lampe M, et al. Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Rep.* 2017;18(9):2113–23.
110. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CKE, Walther P, et al. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe.* 2009;5(4):365–75.
111. Reid DW, Campos RK, Child JR, Zheng T, Chan KWK, Bradrick SS, et al. Dengue Virus Selectively Annexes Endoplasmic Reticulum-Associated Translation Machinery as a Strategy for Co-opting Host Cell Protein Synthesis. *J Virol.* 2018;92(7).
112. Lescar J, Soh S, Lee LT, Vasudevan SG, Kang C, Lim SP. The Dengue Virus Replication Complex: From RNA Replication to Protein-Protein Interactions to Evasion of Innate Immunity. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1062:115–29.
113. Terasaki M, Chen LB, Fujiwara K. Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *J Cell Biol.* 1986;103(4):1557–68.
114. Gurel PS, Hatch AL, Higgs HN. Connecting the cytoskeleton to the endoplasmic reticulum and Golgi. 2014;24(14):R660–72.
115. Lai C-K, Jeng K-S, Machida K, Lai MMC. Association of hepatitis C virus replication complexes with microtubules and actin filaments is dependent on the interaction of NS3 and NS5A. *J Virol.* 2008;82(17):8838–48.
116. Koga R, Sugita Y, Noda T, Yanagi Y, Ohno S. Actin-Modulating Protein Cofilin Is Involved in the Formation of Measles Virus Ribonucleoprotein Complex at the Perinuclear Region. *J Virol.* 2015;89(20):10524–31.
117. Nolen BJ, Tomasevic N, Russell A, Pierce DW, Jia Z, McCormick CD, et al. Characterization of two classes of small molecule inhibitors of Arp2/3 complex. *Nature.* 2009;460(7258):1031–4.
118. Dierkes R, Warnking K, Liedmann S, Seyer R, Ludwig S, Ehrhardt C. The Rac1 inhibitor NSC23766 exerts anti-influenza virus properties by affecting the viral polymerase complex activity. *PloS One.* 2014;9(2):e88520.

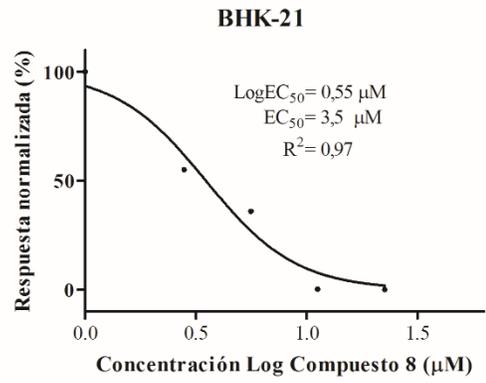
119. Burke E, Dupuy L, Wall C, Barik S. Role of cellular actin in the gene expression and morphogenesis of human respiratory syncytial virus. *Virology*. 1998;252(1):137–48.
120. Gower TL, Pastey MK, Peeples ME, Collins PL, McCurdy LH, Hart TK, et al. RhoA signaling is required for respiratory syncytial virus-induced syncytium formation and filamentous virion morphology. *J Virol*. 2005;79(9):5326–36.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

A.



B.



C.

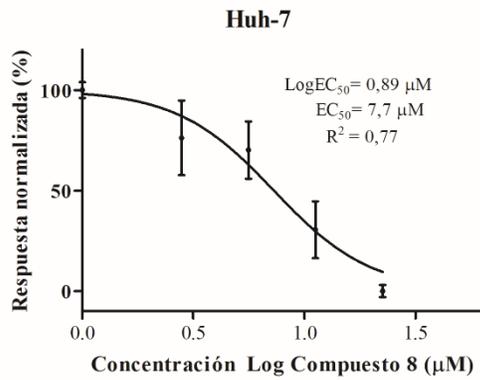


Figura S1. Concentración efectiva 50% en células BHK-21 y Huh-7.

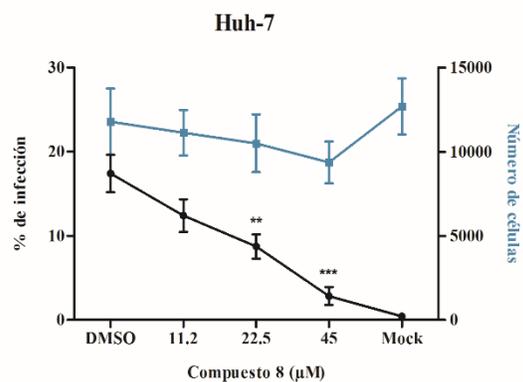
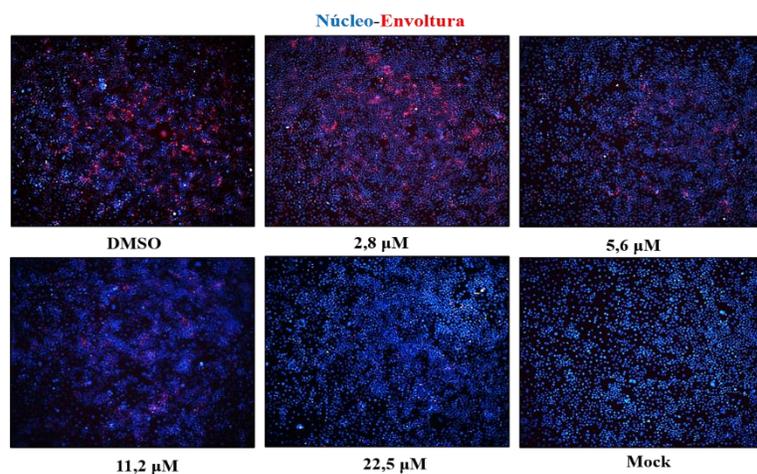
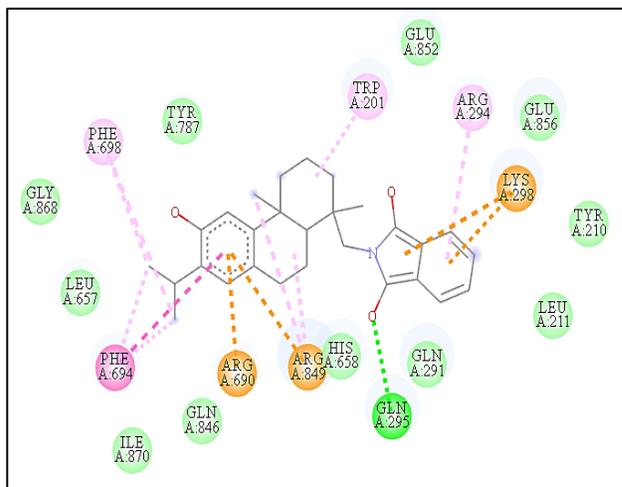
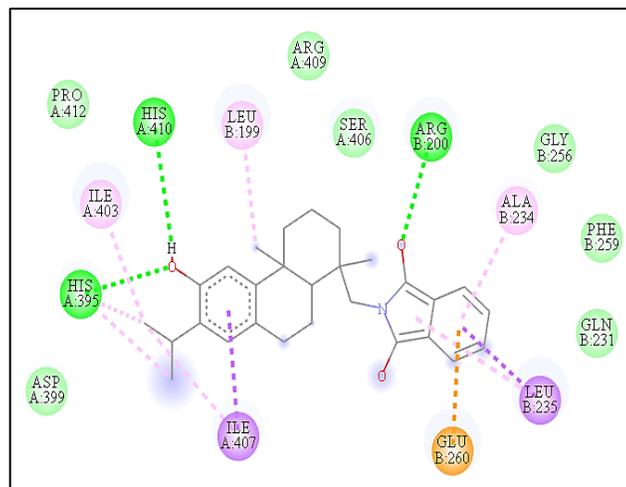
A.**B.**

Figura S2. Porcentaje de infección y número de células durante el tratamiento con el compuesto 8 en células Huh-7.

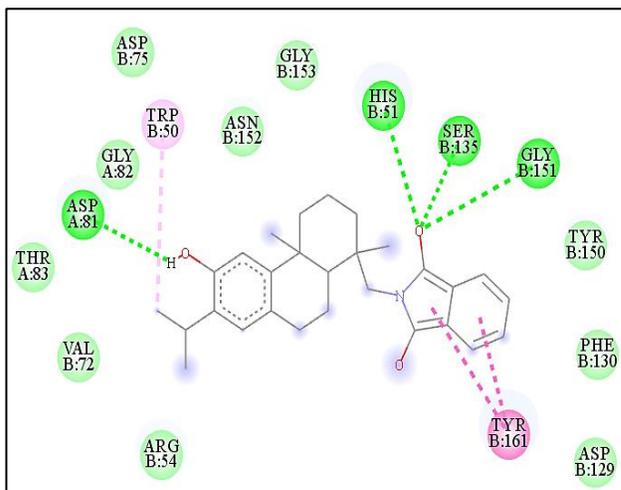
A.

PI3K γ (-8,8 kcal/mol)

B.

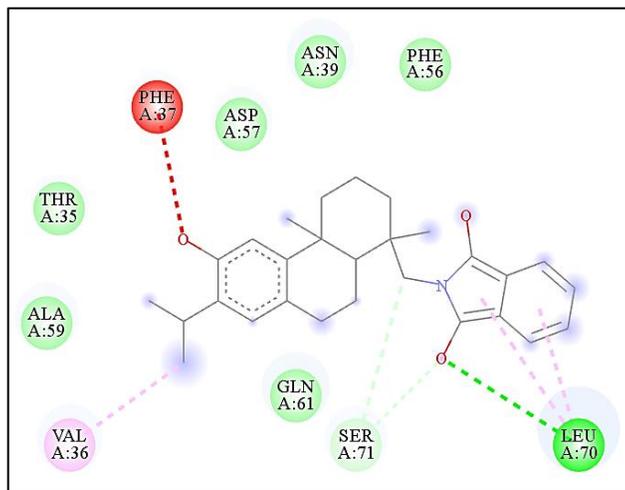
Complejo Arp2/3 (-8,6 kcal/mol)

C.



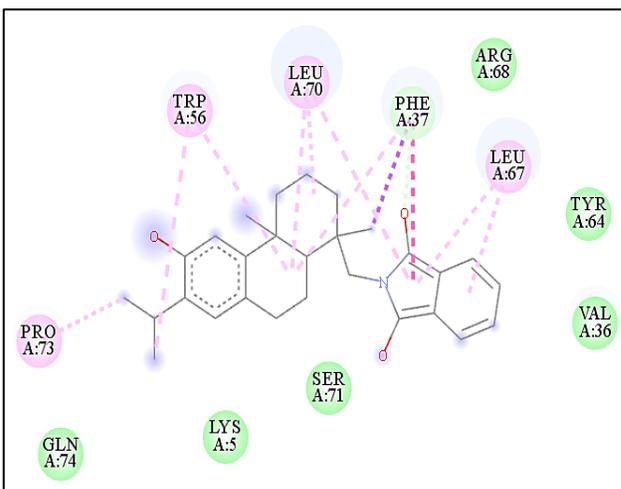
NS3 proteasa de serina (-8,8 kcal/mol)

D.



Cdc42 (-6,8 kcal/mol)

E.



Rac1 (-6,3 kcal/mol)

Tipo de

interacción:

- | | |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| ■ van der Waals | ■ Amide-Pi Stacked |
| ■ Conventional Hydrogen Bond | ■ Alkyl |
| ■ Pi-Anion | ■ Pi-Alkyl |
| ■ Pi-Pi Stacked | |

Figura S3. Interacciones entre el compuesto 8 y algunas proteínas involucradas en la señalización de la remodelación de actina.

Huh-7

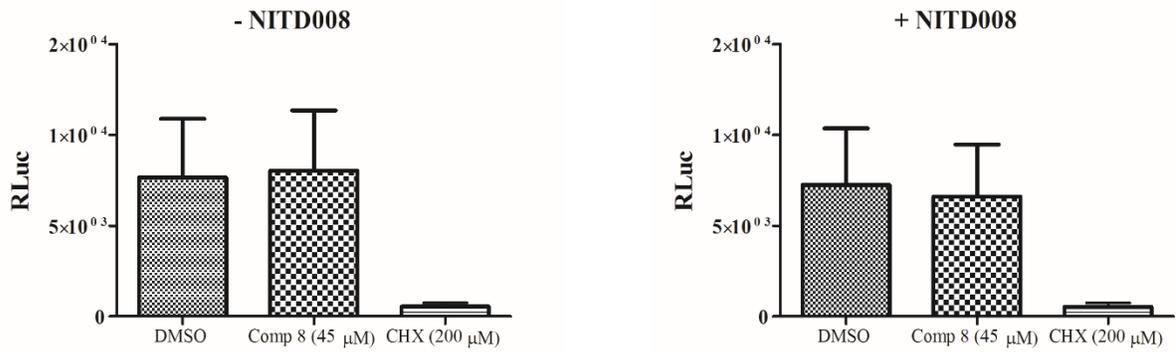
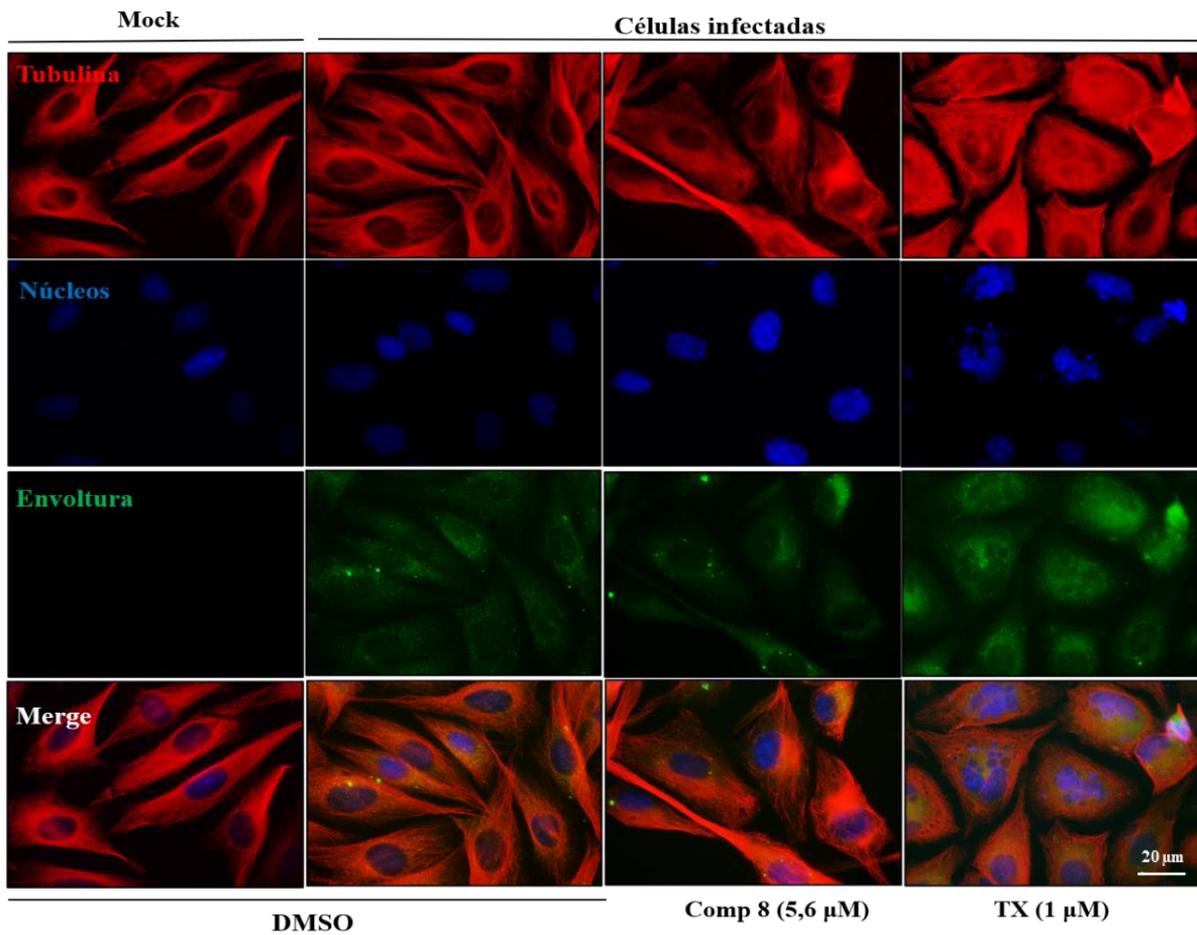


Figura S4. El tratamiento previo a la infección con el compuesto 8 no afecta la entrada viral ni la síntesis inicial de proteínas.

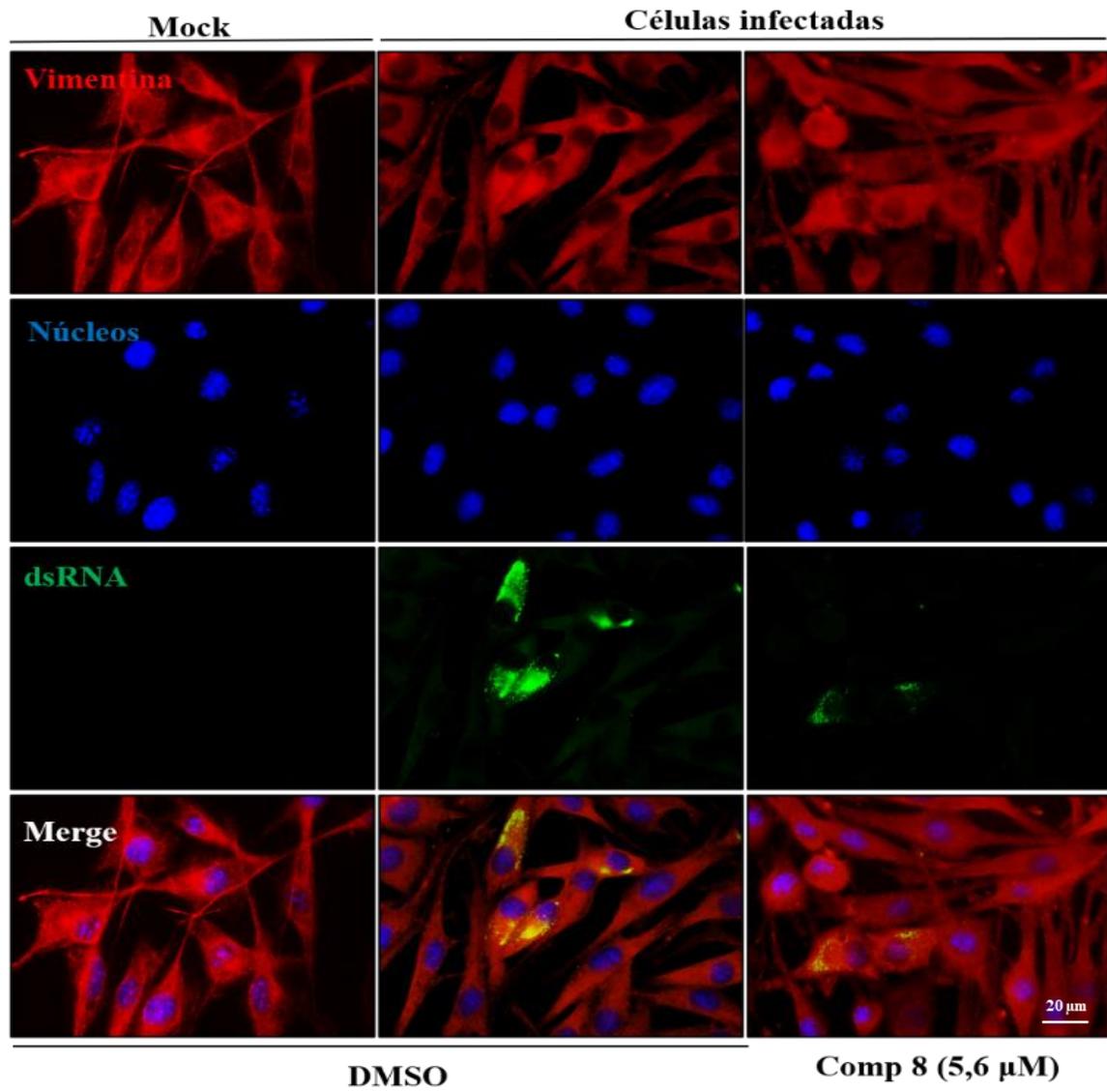
A.

BHK-21



B.

BHK-21



C.

Huh-7

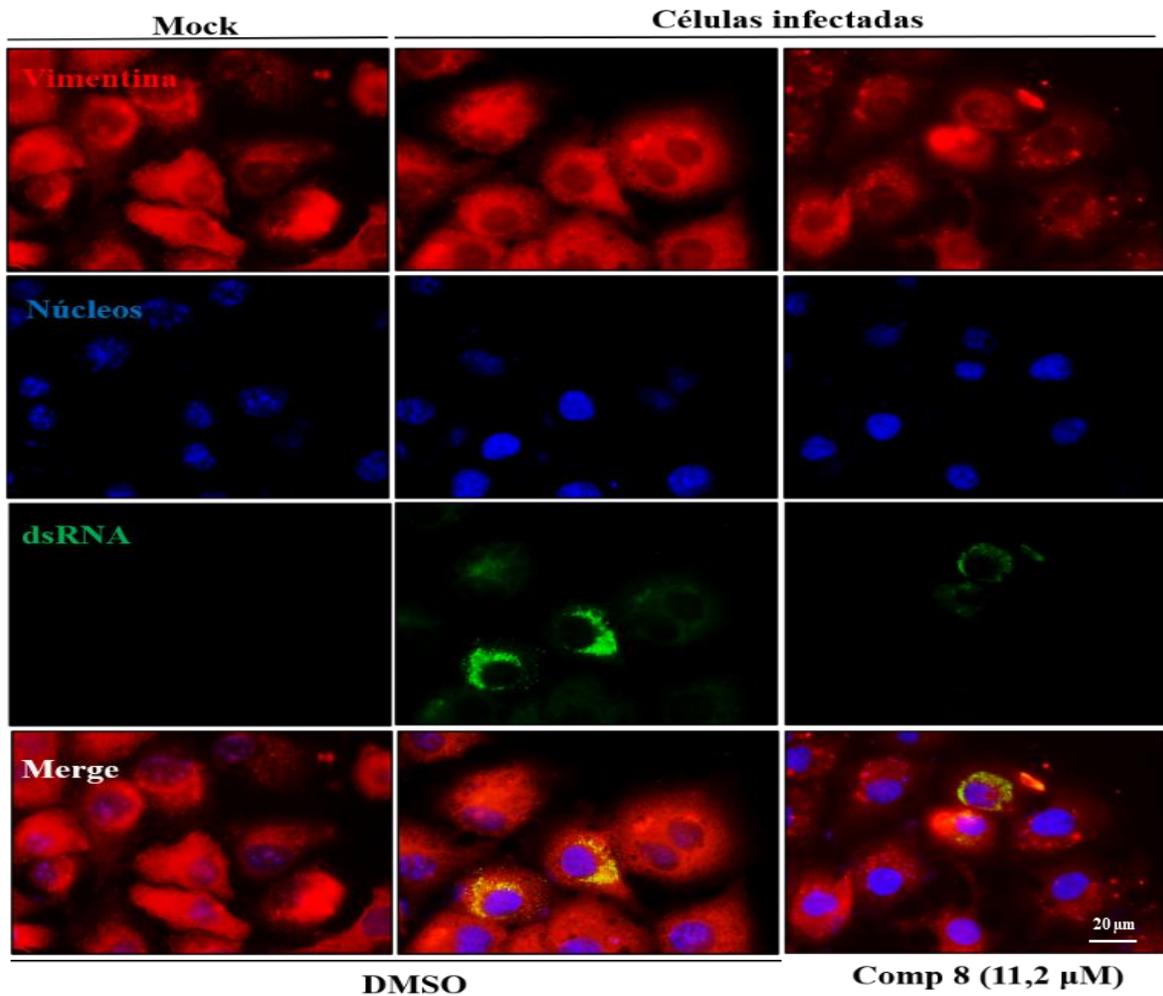


Figura S5. El análogo 8 no induce cambios relevantes en la distribución de tubulina y vimentina.

Células BHK-21 (A) y Huh-7 (D) se infectaron con DENV-2 y luego se trataron con el compuesto **8** a las 6, 12 y 24 h.p.i, por un periodo de 24 horas. Pasado este tiempo, las células se fijaron y se tiñeron con los anticuerpos anti-tubulina (rojo), anti-vimentina (rojo) y anti-dsRNA (verde) para evidenciar el efecto de la molécula sobre estos componentes del citoesqueleto; los núcleos (azul) también se tiñeron. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes realizados por duplicado y fueron capturadas con el objetivo de 60X. DMSO: dimetilsulfóxido.