



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Actividad antiviral de alcaloides naturales y sintéticos frente a los virus dengue y Zika**

Tesis presentada para optar por el título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el  
área de Química Biológica

**Lic. Verónica Mara Quintana**

Directora de tesis: Prof. Dra. Viviana Castilla

Consejera de estudios: Prof. Dra. Elsa B. Damonte

Lugar de trabajo: Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad  
de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, marzo de 2018

## RESUMEN

### Actividad antiviral de alcaloides naturales y sintéticos frente a los virus dengue y Zika

Los virus dengue (DENV) y Zika (ZIKV), pertenecientes al género *Flavivirus* dentro de la familia *Flaviviridae*, son importantes patógenos para el hombre para los cuales no se dispone aún de un tratamiento antiviral específico. Ambos se transmiten al hombre a través de la picadura de mosquitos del género *Aedes*, pero en el caso de ZIKV también se ha comprobado la transmisión congénita, perinatal y sexual. La infección por cualquiera de los cuatro serotipos de DENV puede resultar en una enfermedad febril benigna o en patologías severas conocidas como dengue grave. Si bien la infección por ZIKV suele ser asintomática o presentarse como una enfermedad febril, la infección durante el embarazo aumenta el riesgo de microcefalia, daño cerebral y anomalías congénitas. Por otra parte, estudios retrospectivos sugieren que la infección por ZIKV estaría asociada al desarrollo del síndrome neurológico de Guillain- Barré.

El presente trabajo tuvo como objetivos la evaluación y caracterización de la actividad antiviral *in vitro* de  $\beta$ -carbolicinas naturales y sintéticas frente a DENV y el estudio del efecto inhibitorio de la anisomicina frente a DENV y otros flavivirus en cultivos celulares, así como la evaluación de su eficacia en un modelo animal de infección por ZIKV.

Se evaluó la actividad antiviral de un grupo de  $\beta$ -carbolicinas naturales y sus derivados sintéticos frente a DENV-2 en cultivos celulares. Se determinó que el harmol, de origen vegetal, y un derivado sintético de la harmina, la 9N-metilharmina, exhiben efecto inhibitorio sobre la producción de DENV-2, siendo menos activos frente al resto de los serotipos de DENV. La caracterización del modo de acción antiviral de la 9N-metilharmina frente a DENV-2 demostró que el compuesto no afecta ni las etapas iniciales de la infección ni la síntesis de ARN viral. La 9N-metilharmina inhibiría la maduración y liberación de las partículas virales al medio extracelular impidiendo la propagación de la infección. Se determinó además que el efecto inhibitorio del compuesto no estaría relacionado con su capacidad de modular la vía de señalización celular p38 dependiente de proteínas quinasas activadas por mitógenos (p38 MAPK).

Por su parte la anisomicina, un activador de la vía p38 MAPK, exhibió actividad antiviral frente a los cuatro serotipos de DENV y frente a aislamientos clínicos de DENV-2. Su efecto inhibitorio se demostró tanto en cultivos de células Vero como en líneas celulares humanas. Las cinéticas de entrada y de desnudamiento viral no fueron afectadas por el compuesto. Por

el contrario, el tratamiento con anisomicina provocó una fuerte inhibición de la expresión de proteínas virales y de la síntesis de ARN viral indicando que el compuesto inhibe la síntesis de macromoléculas virales. La realización de ensayos enzimáticos permitió establecer que este compuesto no afecta de manera directa la funcionalidad de la proteína viral NS5. Por otra parte, el tratamiento con el compuesto alteró la cinética de activación de la vía p38 MAPK inducida por la infección viral. Dado que la anisomicina exhibió también efecto inhibitorio frente a otros flavivirus, se decidió evaluar su eficacia antiviral en un modelo animal de infección por ZIKV. El tratamiento con anisomicina de ratones AG129 infectados con ZIKV mostró un efecto reverso del compuesto, mientras la dosis más alta de compuesto ensayada produjo un efecto exacerbado de la infección viral, la dosis más baja empleada provocó el retraso de la muerte de los animales y una disminución significativa de la carga viral respecto a los animales tratados con placebo.

En conclusión, en este trabajo se logró identificar dos tipos de alcaloides con actividad antiviral frente a los flavivirus, siendo la anisomicina el compuesto que mostró mayor eficacia y selectividad *in vitro*. Los resultados obtenidos en el ensayo *in vivo* sugieren que se requiere la realización de nuevos esquemas de tratamiento a fin de determinar el potencial terapéutico de la anisomicina para hacer frente a la infección por ZIKV.

## ABSTRACT

### Antiviral activity of natural and synthetic alkaloids against dengue and Zika viruses

Dengue virus (DENV) and Zika virus (ZIKV) belong to the *Flavivirus* genus of *Flaviviridae* family and are important human pathogens. No specific antiviral treatment is available for these viral infections. DENV is transmitted to humans by mosquitoes of the genus *Aedes* and although this is also the main form of transmission of ZIKV, congenital, perinatal and sexual transmission have also been demonstrated. Infection with any of the four serotypes of DENV (DENV-1 to DENV-4) causes a feverish acute benign disease or more severe forms of the disease. ZIKV infection is often asymptomatic or causes only mild symptoms, but infection during pregnancy increases the risk of microcephaly, brain damage, and congenital abnormalities. Furthermore, retrospective studies indicate that ZIKV can trigger Guillain-Barré syndrome.

The aims of the present thesis were the evaluation and characterization of the *in vitro* antiviral activity of natural and synthetic  $\beta$ -carbolines against DENV and the study of the inhibitory effect of anisomycin against DENV and other flaviviruses in cell cultures, as well as the evaluation of its antiviral efficacy in an animal model for ZIKV infection.

The antiviral activity of a group of natural  $\beta$ -carbolines and their synthetic derivatives against DENV-2 in Vero cell cultures was evaluated. Harmol, a natural  $\beta$ -carboline, and a synthetic analog of harmine, 9N-methylharmine, exhibited inhibitory effect on the production of DENV-2 but were less active against the other DENV serotypes. The analysis of 9N-methylharmine mode of action showed that the compound does not affect neither early stages of viral multiplication nor viral RNA synthesis. 9N-methylharmine would inhibit the maturation and release of viral particles to the extracellular medium impairing the spread of the infection. In addition, it was also determined that the antiviral activity of 9N-methylharmine is not related to the ability of this compound to regulate the activation of p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) cell signaling pathway.

On the other hand, anisomycin, an alkaloid that stimulates p38 MAPK pathway activation, exhibited inhibitory effect against the four DENV serotypes and also against DENV-2 clinical isolates in Vero cells. The compound also displayed antiviral action against DENV-2 in human cell cultures. The kinetics of DENV-2 entry and uncoating were not affected by anisomycin. In contrast, treatment with the compound resulted in a strong inhibition of viral protein expression and viral RNA synthesis indicating that anisomycin inhibits viral

macromolecular synthesis. Enzymatic assays proved that this compound does not affect the activities of NS5 viral protein. On the other hand, anisomycin altered the kinetics of p38 MAPK activation induced by viral infection. Since the compound also presented *in vitro* antiviral activity against other flaviviruses, we decided to evaluate its antiviral efficacy in an animal model for ZIKV infection. Anisomycin treatment of AG129 mice infected with ZIKV showed a reverse effect: the highest dose of compound employed promoted viral replication whereas the lowest dose assayed produced a delay in the time of mice death and a significant reduction in viral load with respect to placebo treated mice.

In conclusion, in the present study we identified two types of alkaloids with antiviral activity against flaviviruses, being anisomycin the most effective and selective compound in cell culture assays. The results obtained in the *in vivo* experiment suggest that the evaluation of other treatment protocols are needed to further determine the therapeutic potential of anisomycin to deal with ZIKV infection.

## AGRADECIMIENTOS

A Vivi, la mejor directora que me podía tocar. Gracias por su paciencia e incondicional apoyo. Por todo el aprendizaje que me transmitió, las puertas que me abrió, el crecimiento que me forjó. Por estar siempre presente en cualquier momento y en cualquier lugar. Por poder congeniar nuestros métodos y sacar lo mejor de mí. Por presionarme cada día a ser una mejor profesional y también mejor persona. No alcanzan las palabras para decir lo afortunada que me siento de que me haya guiado en todo este camino.

A Elsa, por permitirme formar parte de este hermoso grupo y darme la oportunidad de realizar mi doctorado en el laboratorio. Por siempre resolver cualquier duda o inconveniente que surgiera. Por apoyar mis proyectos y darme la oportunidad de crecer como profesional. Por compartir su opinión y brindarme sus valiosos consejos que siempre enriquecen el trabajo.

A Moni, que fue la que me introdujo a la Virología y me enseñó todo este nuevo mundo. Su energía y generosidad me motivó a continuar este camino después de mi graduación. A ella le agradezco haberme dado un lugar donde me sintiera cómoda y los primeros hilos para empezar a formarme en esta área.

A todo el ViroTeam! Un grupo sin palabras. Siempre dando un mano en lo que sea cuando lo necesitas. Siempre haciéndose un tiempo para explicarte nuevos o no tan nuevos procedimientos y toda la predisposición para poder ayudarte de la mejor manera. Siempre compartiendo inquietudes, dificultades o aciertos para mejorar el trabajo de todos cada día. A pesar de las diferencias es un increíble grupo que busca tirar con todos para adelante. Les agradezco toda la ayuda que me dieron para poder hoy escribir esta tesis.

A Niny, Lau y Ceci, las amigas que me dio el laboratorio. Con las que compartimos muchas inquietudes académicas, así como personales en esta etapa de nuestra carrera. Nuestras innumerables charlas fueron un gran apoyo durante el doctorado.

A Ema, compañero de directora. Quién me introdujo a muchos de los detalles y consideraciones de las técnicas que empleamos frecuentemente. Siempre dando un mano en lo que sea. Compartimos muchas inquietudes durante el doctorado y nos ayudamos mutuamente a crecer profesionalmente.

A Luis, que siempre estuvo presente para cualquier duda o guía frente a distintas situaciones que se cruzaron en esta etapa.

A Cybele que me incentivó a arriesgarme y salir a buscar lo que quiero.

A todas las personas que se cruzaron en mi camino estos años y que directa o indirectamente contribuyeron a este trabajo.

A mis amigos quienes me apoyaron incondicionalmente para que hoy este acá dando lo mejor de mí y haciendo lo que más me gusta. A mis amigos de la facu: Mica, Pauli, Alan, Lau, Ver, Lean Di, Pablito, Ale, Nacho, Lu, May, Lean T, Nico, Sergio, Javi. A mis amigas de japonés: Sabri y Sil.

A mi familia que me apoyó constantemente para que pudiera realizarme como profesional y que me motivó a que persiguiera mis sueños y llevarlos a cabo. A mis papás, a Ale, a Nati, a mi primo Ernest y a mi hermosa ahijada Azul.

A mi hermano Ariel, mi estrellita de luz, que donde sea que este, estuvo más presente que nunca tanto en los peores como los mejores momentos de esta etapa.

*A mi estrellita de luz,  
que me ilumina todos los días*

*“La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡Qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo”*

*Marie Curie*

*1867-1934*

Los resultados presentados en el Capítulo 1 de esta tesis han sido publicados en el siguiente artículo:

**Quintana VM**, Piccini LE, Panozzo Zénere JD, Damonte EB, Ponce MA, Castilla V. Antiviral activity of natural and synthetic  $\beta$ -carboline against dengue virus. *Antiviral Res.* 2016 Oct;134:26-33.

Los resultados presentados en los Capítulos 2 de esta tesis están siendo preparados para su próxima publicación.

---

<b>Abreviaturas</b>	<b>1</b>
<b>Introducción</b>	
<b><i>El virus dengue</i></b>	<b>6</b>
Clasificación	6
La enfermedad del dengue	6
El dengue en Argentina	9
Composición de las partículas virales	10
Genoma viral	11
Proteínas estructurales	12
Proteínas no estructurales	13
Ciclo de multiplicación viral	15
Etapas iniciales de la infección	15
Síntesis de macromoléculas virales	17
Ensamblaje, maduración y liberación de las partículas virales	19
Modulación de la vía dependiente de proteínas quinasas activadas por mitógenos p38 MAPK durante la infección con DENV	20
Vacunas	21
<b><i>El virus Zika</i></b>	<b>22</b>
La enfermedad por ZIKV	22
La enfermedad por ZIKV en Argentina	24
Características generales de la partícula viral	25
Modelos para el estudio de la infección por ZIKV	26
Vacunas	27
<b><i>Desarrollo de antivirales para DENV y ZIKV</i></b>	<b>28</b>
DENV	29
ZIKV	31
<b><i>Alcaloides con actividad antiviral</i></b>	<b>32</b>
$\beta$ -carbolicinas	33
Anisomicina	34
<b>Objetivos</b>	
Objetivos generales y específicos	37
<b>Materiales y Métodos</b>	
Células	39

---

Animales	40
Virus	
Compuestos	41
Obtención de stocks virales	41
Ensayo de formación de placas	42
Determinación de la viabilidad celular por el método de MTS	42
Ensayo de inhibición del rendimiento viral	43
Evaluación del espectro antiviral de la anisomicina	43
Actividad virucida	44
Efecto del tiempo de adición de los compuestos sobre el rendimiento viral	44
Ensayo de inmunofluorescencia	45
Ensayo de Western Blot	45
Extracción ARN	46
A partir de cultivos celulares	46
A partir de suero de ratones AG129	47
Ensayo RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR)	47
A partir de cultivos celulares	47
A partir de suero de ratones AG129	48
Ensayo de internalización viral	48
Cinética de desnudamiento viral	49
Actividad de ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp) de NS5	49
Actividad de metiltransferasa (MTasa) de NS5	50
Evaluación de la toxicidad de la anisomicina en ratones AG129	51
Evaluación de la actividad antiviral de anisomicina frente a ZIKV en ratones AG129	51
Análisis estadístico	52
<b>Capítulo I: Evaluación y caracterización de la actividad antiviral in vitro de <math>\beta</math>-carbolinas naturales y sintéticas frente a DENV</b>	
<b><i>Resultados</i></b>	<b>54</b>
Efecto de $\beta$ -carbolinas naturales y sintéticas sobre la viabilidad celular y la multiplicación de DENV-2	54
Actividad antiviral de la 9N-metilharmina y el harmol frente a los diferentes serotipos de DENV	57

Evaluación del efecto inactivante de las $\beta$ -carbolinas activas	57
Efecto de la 9N-metilharmina y del harmol sobre las actividades de RdRp y 2'O-MTasa de la proteína NS5 de DENV	58
Efecto de las $\beta$ -carbolinas activas en las etapas iniciales de la infección	60
Efecto del tiempo de agregado de 9N-metilharmina sobre la multiplicación viral	61
Efecto de la 9N-metilharmina sobre la síntesis de ARN viral	62
Efecto de la 9N-metilharmina sobre la propagación de la infección	63
Efecto de la 9N-metilharmina sobre la liberación de las partículas viral	64
Efecto de la 9N-metilharmina sobre la activación de la vía de señalización p38 MAPK	66
<b>Discusión</b>	<b>68</b>
<b>Capítulo 2: Actividad antiviral de la anisomicina frente a DENV y ZIKV</b>	
<b>Resultados</b>	<b>78</b>
<u>Evaluación y caracterización de la actividad antiviral <i>in vitro</i> de la anisomicina frente a DENV</u>	<u>78</u>
Actividad antiviral de la anisomicina frente a los diferentes serotipos de DENV	78
Evaluación del efecto inactivante de la anisomicina frente a DENV-2	80
Actividad antiviral de anisomicina frente a DENV-2 en líneas celulares humanas	81
Efecto de la anisomicina sobre aislamientos clínicos de DENV-2	82
Influencia de la multiplicidad de infección en la actividad antiviral de la anisomicina	84
Efecto del pre-tratamiento con anisomicina sobre la multiplicación viral	84
Efecto del tiempo de agregado de anisomicina sobre la producción viral	85
Efecto del tratamiento con anisomicina durante diferentes intervalos de tiempo sobre la producción de virus infeccioso.	86
Efecto de la anisomicina sobre las primeras etapas de la multiplicación viral	87
Efecto de la anisomicina sobre la expresión de la glicoproteína viral E	89
Efecto de la anisomicina sobre la síntesis de ARN viral	91
Efecto de la anisomicina sobre las actividades de RdRp y 2'O-MTasa de la proteína NS5 de DENV	92
Efecto de la anisomicina sobre la vía p38 MAPK en células infectadas con DENV-2	93
<u>Evaluación del espectro antiviral de la anisomicina</u>	<u>96</u>

Actividad antiviral de la anisomicina frente a otros flavivirus	96
Actividad antiviral de la anisomicina frente a otros virus	98
<u>Evaluación de la actividad antiviral de la anisomicina frente a ZIKV en un modelo animal</u>	<u>100</u>
<b><i>Discusión</i></b>	<b>106</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>116</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>119</b>

## ABREVIATURAS

**ADE:** *antibody-dependent enhancement*

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ARN:** ácido ribonucleico

**Arf:** factor de ribosilación de ADP

**BoHV-1:** herpesvirus bovino 1

**BSA:** seroalbúmina bovina

**CC<sub>50</sub>:** concentración citotóxica 50

**CE<sub>50</sub>:** concentración efectiva 50

**CHIKV:** virus Chikungunya

**DABCO:** 1,4-diazabicyclo octano

**DABCYL:** ácido 4-(dimetilaminoazo) benzeno-4-carboxílico

**DEAE:** dietilaminoetil

**DENV:** virus dengue

**DICC<sub>50</sub>:** dosis infectiva cultivo de células 50

**DMSO:** dimetil sulfóxido

**dNTP:** desoxirribonucleótidos trifosfato

**d:** día

**d.p.i.:** días post-infección

**DTT:** ditioneitol

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**ERK 1/2:** quinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares

**FcγR:** receptor para Fc de las gamaglobulinas

**FITC:** isotiocianato de fluoresceína

**GMP:** guanosín monofosfato

**GTasa:** guanilil-transferasa

**GTP:** guanosín trifosfato

**h:** hora

**HCV:** virus de la hepatitis C

**HPIV3:** virus parainfluenza humano 3

**HSV:** virus herpes simplex

**HIV:** virus de la inmunodeficiencia humana

**IAV:** virus influenza A

**IFN:** interferón

**INEVH:** Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas

**i.v.:** intravenosa

**IS:** índice de selectividad

**i.p.:** intraperitoneal

**JEV:** virus de la encefalitis japonesa

**JNK:** quinasa c-Jun N-terminal

**JUNV:** virus Junín

**LACV:** virus La Crosse

**MAPK:** proteína quinasa activada por mitógenos

**MAPV:** virus Maporal

**MEM:** medio esencial mínimo

**m.i.:** multiplicidad de infección

**min:** minuto

**MLV:** virus de la leucemia murina

**MM:** medio de mantenimiento

**MTasa:** metil-transferasa

**MTS:** 3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboxi- metoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio

**NBCS:** suero de ternero recién nacido

**NGC:** Nueva Guinea C

**NTPasa:** nucleósido-trifosfatasa

**PBS:** buffer fosfato salino

**p.i.:** post-infección

**PICV:** virus Pichindé

**PMS:** metasulfato de fenazina

**PNH:** primates no humanos

**POWV:** virus Powassan

**PTV:** virus Punta Toro

**PV:** poliovirus

**PVDF:** fluoruro de polivinilideno

**qRT-PCR:** ensayo cuantitativo de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa

**RdRp:** ARN polimerasa ARN dependiente

**RE:** retículo endoplasmático

**RNAsin:** inhibidor de ribonucleasas

**RSV:** virus respiratorio sincicial

**RTPasa:** ARN trifosfatasa

**RV:** virus de la rata de Kilham

**RVFV:** virus de la fiebre del valle de Rift

**SAH:** S-adenosilcisteína

**SAM:** S-adenosilmetionina

**SARS:** síndrome respiratorio agudo y grave

**s.c.:** subcutánea

**SFB:** suero fetal bovino

**SGB:** síndrome neurológico de Guillain-Barré

**TBS:** buffer Tris salino

**TGN:** trans-Golgi

**UBP:** sistema ubiquitina-proteosoma

**UFP:** unidad formadora de placa

**USU:** *Utah State University*

**UTR:** región no codificante

**WEE:** virus de la encefalitis equina occidental

**WNV:** virus del Nilo occidental

**YFV:** virus de la fiebre amarilla

**ZIKV:** virus Zika

# ***INTRODUCCIÓN***

## EL VIRUS DENGUE

### Clasificación

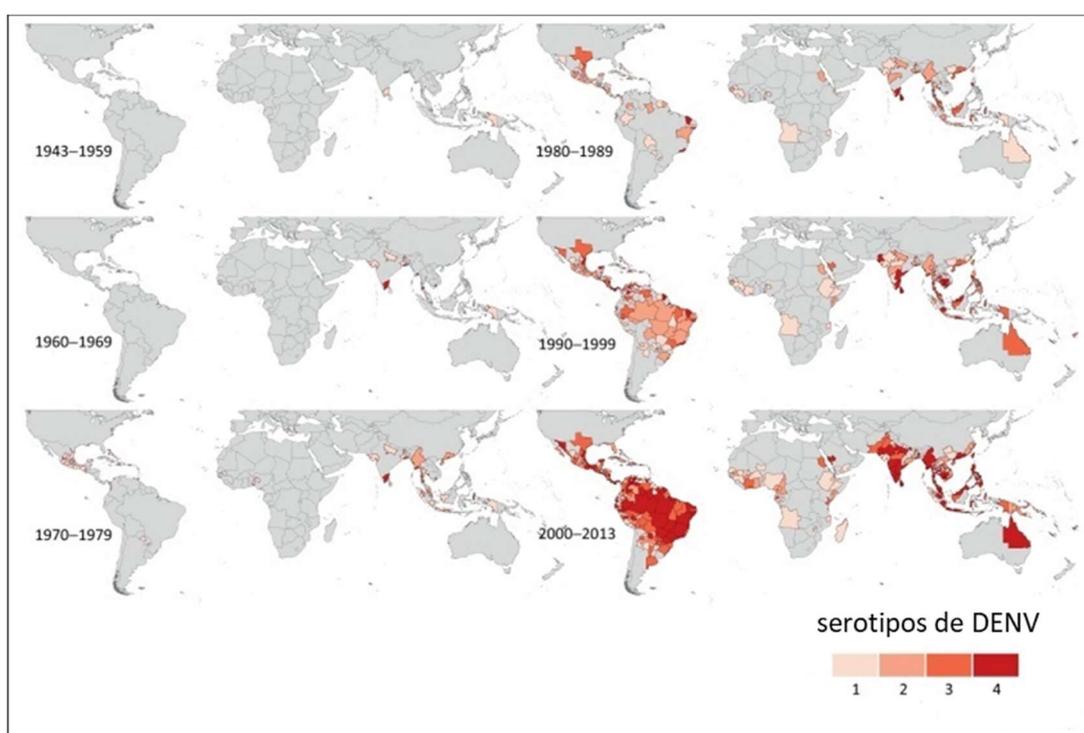
El virus dengue (DENV) pertenece a la familia *Flaviviridae*, que está conformada por cuatro géneros: *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pestivirus* y *Pegivirus*. Son virus pequeños, de aproximadamente 50 nm de diámetro cuyo genoma está compuesto por una molécula de ARN simple cadena de polaridad positiva. El genoma completo contiene entre 9500 y 12500 nucleótidos y codifica para una poliproteína precursora que es procesada dando origen a las proteínas estructurales y a las proteínas no estructurales (Guzman y col., 2016).

DENV es miembro del género *Flavivirus* el cual incluye 53 virus transmitidos por artrópodos muchos de los cuales, al igual que DENV, son importantes patógenos para el hombre, como el virus de la fiebre amarilla (YFV), el virus de la encefalitis japonesa (JEV), el virus del Nilo occidental (WNV), el virus Zika (ZIKV), el virus de la encefalitis de San Luis y el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas entre otros.

### La enfermedad del dengue

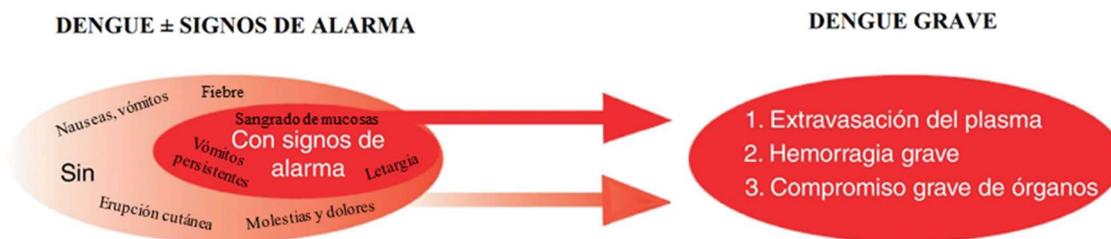
DENV es el agente etiológico del dengue y dado que más de un centenar de países son endémicos para esta enfermedad, la mitad de la población mundial se encuentra expuesta al riesgo de contraerla. Se calcula que en el mundo ocurren cada año aproximadamente 400 millones de casos de infección por DENV de los cuales 96 millones se manifiestan clínicamente provocando anualmente 12.500 muertes (Bhatt y col., 2013; Feinberg y col., 2017). Existen 4 serotipos de DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) y la infección con cualquiera de estos serotipos virales puede presentar un amplio espectro de manifestaciones clínicas siendo en muchos casos asintomática. La mayoría de los pacientes se recuperan después de un desarrollo limitado de la enfermedad mientras que una pequeña proporción de individuos puede evolucionar hacia una enfermedad severa que puede resultar fatal, con extravasación de plasma y posibles hemorragias (Guzman y col., 2016). La transmisión de DENV depende del mosquito vector *Aedes aegypti*, y en menor grado de *Aedes albopictus*. En el ciclo de transmisión de DENV entre el mosquito y el humano, el mosquito hembra se infecta al alimentarse de una persona infectada durante el período de viremia, el

cual transcurre entre los 4 y 12 días post-infección (p.i.). En el mosquito, el virus replica en las células epiteliales del intestino medio y de allí puede diseminarse a otros órganos. La infección de las glándulas salivales, que tiene lugar aproximadamente a los 10 días p.i., hace posible que el mosquito sea capaz de transmitir el virus por el resto de su vida. La distribución geográfica del vector se concentra principalmente en áreas con climas tropicales y subtropicales, tanto en zonas urbanas como semiurbanas. Como consecuencia de la falta de control del vector se ha producido la expansión geográfica del virus, siendo el dengue la enfermedad viral transmitida por artrópodos más frecuente en el hombre (Figura 1) (Bhatt y col., 2013).



**Figura 1:** Mapa de la distribución de los distintos serotipos de DENV en las diferentes décadas 1943-2013. Modificado de Messina y col. (2014).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica los cuadros de dengue en dos categorías: dengue y dengue grave. Los cuadros no graves se subdividen a su vez en dos grupos de acuerdo a la presencia o no de signos de alarma (Figura 2). Es importante tener en cuenta que los pacientes que no presentan signos de alarma pueden progresar a dengue grave.



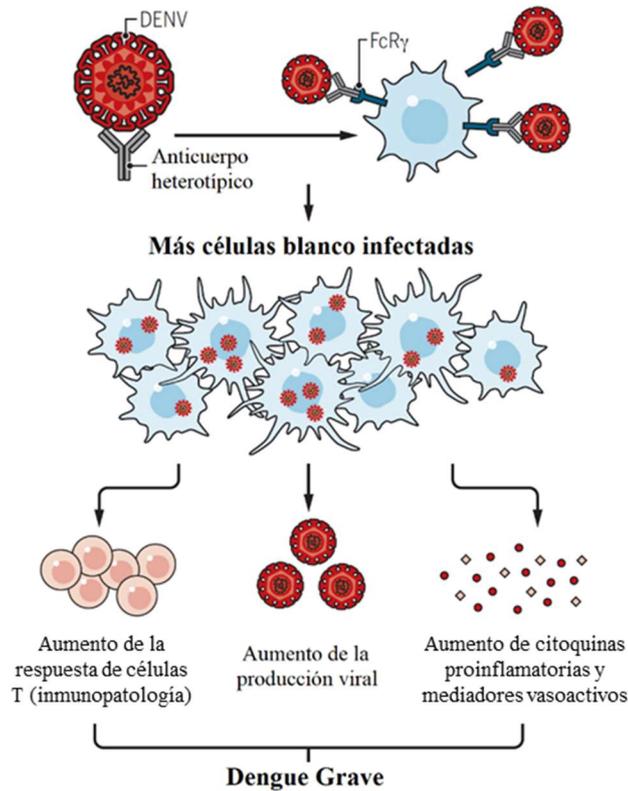
**Figura 2:** Clasificación de los casos de dengue y criterios para el diagnóstico clínico. Dengue: Guía para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control, OMS, 2009 ([http://www.who.int/denguecontrol/resources/dengue\\_guidelines\\_2009/es/](http://www.who.int/denguecontrol/resources/dengue_guidelines_2009/es/)).

El riesgo de una enfermedad severa tras la infección con DENV está determinado por múltiples factores dependientes tanto del virus como del hospedador. Los análisis filogenéticos y epidemiológicos indican la existencia de diferentes genotipos dentro de cada serotipo viral y estas variaciones genéticas constituyen importantes determinantes del potencial epidémico de DENV debido, por ejemplo, a la ventaja replicativa que presentan algunas cepas frente a otras (Guzman y col., 2015). La variación genética se asocia también a distintas manifestaciones clínicas debido a diferencias en la interacción del virus con el sistema inmune del hospedador (OhAinle y col., 2011; Vu y col., 2010). La infección primaria con DENV proporciona inmunidad a largo plazo para infecciones homotípicas, es decir una infección secundaria con el mismo serotipo. Sin embargo, una infección secundaria heterotípica es un factor de riesgo para desarrollar formas graves de dengue. Se ha propuesto que esto último se debería a un mecanismo de infección viral dependiente de anticuerpos denominado ADE (del inglés antibody-dependent enhancement), en el cual los anticuerpos preexistentes en concentraciones sub-neutralizantes reaccionan de forma cruzada con el virus heterólogo facilitando la infección viral de células dendríticas, macrófagos y monocitos, tipos celulares que expresan receptores para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G (FcγR) (Figura 3) (Guzman y col., 2007; Acosta y col., 2016).

A su vez, los epítopes para células T están muy conservados entre los distintos serotipos y, por lo tanto, en una infección secundaria se activan células T específicas de la infección, pero también se activan células T de memoria de la infección primaria. Estas últimas son poco eficientes para eliminar la infección secundaria, pero producen gran cantidad de citoquinas proinflamatorias (Figura 3) pudiendo provocar manifestaciones clínicas tales como la

extravasación plasmática en el endotelio vascular (Rothman, 2011). Por otra parte, factores del hospedador como la edad y la etnia también tendrían influencia en el desarrollo de la enfermedad (OhAinle y col., 2011).

### FcR $\gamma$ media la infección del complejo anticuerpo-DENV



**Figura 3: Mecanismo de infección por DENV dependiente de anticuerpo (ADE).** Individuos que poseen una inmunidad parcial preexistente frente a DENV presentarían mayor probabilidad de desarrollar dengue grave, lo cual podría deberse al mecanismo de infección por ADE en conjunto con una respuesta de células T y citoquinas proinflamatorias. FcR $\gamma$ : receptor para Fc de las gamaglobulinas. Adaptado de Feinberg y col., 2017

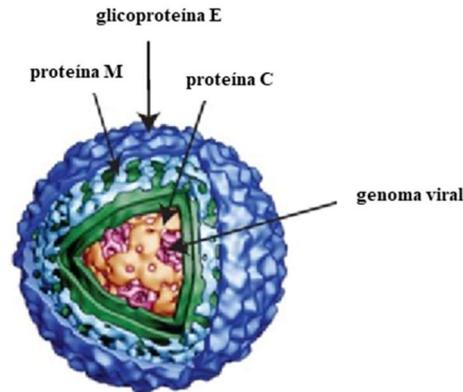
## El dengue en Argentina

En Argentina, los primeros casos de dengue autóctono se registraron en los años 1902 y 1911 mientras que en el año 1916 se produjo el primer brote epidémico de 15000 casos que afectó a las provincias de Corrientes y Entre Ríos. En la década del 60, las políticas del control del vector permitieron la erradicación del mosquito transmisor en el país, pero en los años 80 se registró nuevamente la presencia del vector (Avilés y col., 1999). A fines de la década del 90,

se produjeron nuevos brotes epidémicos en la región chaco-salteña provocados por DENV-2 mientras que en el año 2000 se produjo un brote en la región noreste del país causado por DENV-1. Dos años después en la provincia de Salta se registró la co-circulación de DENV-1, -2 y -3 y en el año 2009 hubo una gran epidemia provocada por la circulación de DENV-1 que abarcó varias provincias y por primera vez se notificaron casos fatales (Tittarelli y col., 2014). En el año 2010 el Ministerio de Salud confirmó la circulación de los virus DENV-1, -2, y -4, indicando la introducción de DENV-4 al país. A principios del año 2016 tuvo lugar el mayor brote epidémico ocurrido en América en las últimas décadas, confirmándose en nuestro país 42.155 casos, de los cuales 10 resultaron fatales (Informe de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), Febrero 2017). En esta ocasión, en la ciudad de Buenos Aires se confirmaron 2,306 casos de infección por DENV-1 de los cuales el 76.7% resultaron ser casos autóctonos (Tittarelli y col., 2017). Actualmente en nuestro país hay circulación de DENV-1 y se registraron casos aislados de DENV-4 (Ministerio de Salud Argentina 2018, [http://www.msal.gov.ar/images/stories/boletines/BIV\\_393\\_SE01](http://www.msal.gov.ar/images/stories/boletines/BIV_393_SE01)).

### **Composición de las partículas virales**

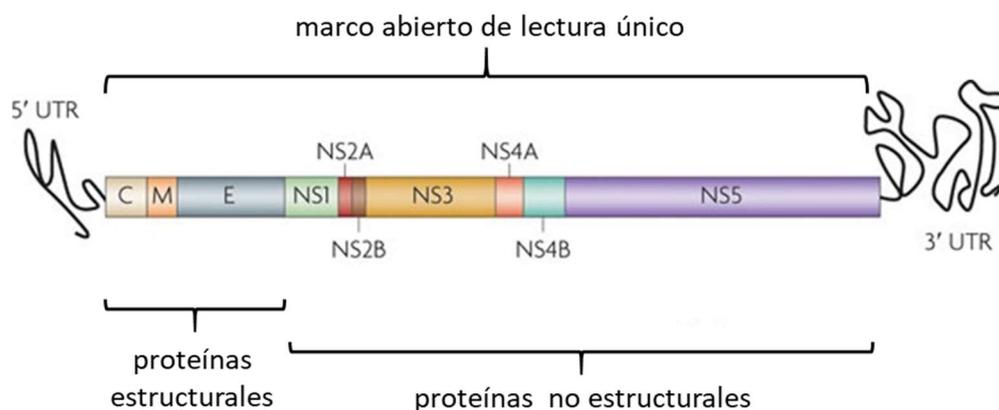
La partícula viral está compuesta por una molécula de ARN de cadena simple asociada a aproximadamente 180 copias de la proteína de cápside (C) conformando la nucleocápside viral. La misma se encuentra rodeada por la envoltura viral, la cual consiste de una bicapa lipídica en la que se anclan la proteína de membrana M y la glicoproteína E (Figura 4). La glicoproteína E forma homodímeros con una configuración cabeza-cola paralela a la superficie de la partícula viral que presenta una superficie lisa (Kuhn y col., 2002; Zhang y col., 2013).



**Figura 4: Estructura del virión maduro de DENV.** El virión de DENV está compuesto por 3 proteínas estructurales: glicoproteína E (azul) y proteína de membrana M (celeste), que se encuentran ancladas a la bicapa lipídica (verde), y la proteína de cápside C (naranja) que cubre al genoma viral (rosa).

### Genoma viral

El genoma de DENV está constituido por una molécula de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 10,7 kb con un cap de tipo I en el extremo 5' y sin cola de poliA en el extremo 3'. Este genoma posee un único marco abierto de lectura que codifica para una poliproteína que por clivaje da origen a tres proteínas estructurales, la proteína C, el precursor de la proteína de membrana (prM) y la glicoproteína E, y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). La región codificante se encuentra flanqueada por dos regiones no codificantes (UTR) denominadas 5'UTR y 3'UTR esenciales para los procesos de traducción y de replicación del genoma viral (Figura 5).



**Figura 5: Esquema del genoma viral.** UTR: región no codificante. Modificado de Guzman y col., 2010.

### *Proteínas estructurales*

La proteína C (12 kDa) es una proteína básica que se une al ARN con alta afinidad y baja especificidad y es la menos conservada entre los flavivirus. Luego de su unión al ácido nucleico conforma oligómeros y funcionaría como una chaperona facilitando el plegamiento del ARN viral (Ma y col., 2004, Byk y col., 2016a).

La proteína M (8 kDa) se origina por clivaje proteolítico de su forma precursora prM (21 kDa) y este clivaje es esencial para la generación de partículas infecciosas de DENV (Acosta y col., 2014). A su vez, el precursor está glicosilado en la posición N69 y forma heterodímeros con la glicoproteína E, interacción que sería importante para el correcto plegado de E durante la maduración de las partículas virales (Yap y col., 2017).

La glicoproteína E (56 kDa) posee un ectodominio amino-terminal que a su vez se caracteriza por la presencia de 3 dominios (Acosta y col., 2014). El primero de ellos presenta una estructura flexible que la permite sufrir rearrreglos estructurales en el proceso de fusión de membranas durante la entrada viral y en la maduración de las partículas virales. El segundo dominio contiene el péptido de fusión que es esencial para la entrada del virus a la célula mientras que el tercer dominio está involucrado en la unión al receptor. La proteína E es glicosilada en el retículo endoplasmático (RE) en 2 residuos asparaginas, en las posiciones N67 y N153 (Yap y col., 2017). Se observó que la glicosilación en N67, no presente en otros flavivirus, es importante para la entrada de DENV en células donde los receptores para el virus son lectinas de tipo C. Por su parte, N153 (N154 en otros flavivirus) es un sitio de glicosilación conservado en la familia *Flaviviridae* y se ha propuesto que cumple un rol en la estabilización de los homodímeros de la proteína E, evitando la exposición del péptido de fusión en esa conformación. A su vez, el análisis de cepas vacunales permitió establecer que diferentes serotipos virales presentarían distintos patrones de glicosilación. Mientras que DENV-2 exhibe un alto contenido de carbohidratos de tipo complejo o híbrido, el resto de los serotipos se caracteriza por la preponderancia de cadenas oligosacáridicas del tipo alta manosa y estas diferencias podrían influir en el tropismo, la capacidad replicativa y la respuesta del hospedador frente a la infección (Dubayle y col., 2015).

*Proteínas no estructurales*

La glicoproteína no estructural NS1 posee un peso molecular de 46-55 kDa según su grado de glicosilación. Esta modificación post-traducciona permite que NS1 forme dímeros estables, asociados a membranas que co-localizan con el complejo de replicación viral aunque se desconoce su rol en dicho proceso, y luego forma hexámeros solubles que son secretados al medio extracelular. Asimismo, NS1 promueve la activación de las células mononucleares y la producción de “una tormenta” de citoquinas proinflamatorias con consecuente filtración vascular que se asocia a la patogénesis severa de DENV (Yap y col., 2017; Zeidler y col., 2017).

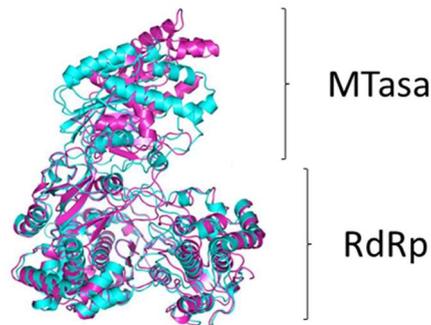
La proteína NS2A presenta un ácido aspártico en la posición 125 que es importante para el correcto clivaje entre las proteínas NS1-NS2A, el cual sería esencial para la replicación del genoma viral. A su vez, esta proteína tendría un rol importante en la producción de las partículas virales (Xie y col., 2015).

La proteína NS3 presenta distintas actividades enzimáticas: serin-proteasa, ARN-helicasa, nucleósido-trifosfatasa (NTPasa) y ARN trifosfatasa (RTPasa) (Brand y col., 2017). La actividad de proteasa depende de la presencia de la proteína NS2B que actúa como cofactor y este complejo NS2B-NS3, altamente conservado entre los flavivirus, participa en el clivaje de la poliproteína viral (Shannon y col., 2016, Brecher y col., 2017). La actividad RTPasa remueve el fosfato  $\gamma$  del ARN 5'-trifosfato naciente durante la replicación del genoma posibilitando la generación del cap en el extremo 5' del mismo. La actividad de helicasa se encarga de desenrollar el intermediario de replicación de doble cadena para la síntesis del genoma viral y requiere energía que utiliza de la hidrólisis de nucleótidos realizada por la actividad NTPasa.

NS4A (16kDa) forma parte del complejo de replicación y constituye oligómeros induciendo rearrreglos en la membrana del RE que serían importantes para la replicación del genoma de DENV (Lee y col., 2015). Por su parte, NS4B interacciona con la proteína NS3 asistiéndola en su rol de helicasa y también tendría un papel importante en la evasión de la respuesta inmune innata mediada por el interferón (Zeidler y col., 2017).

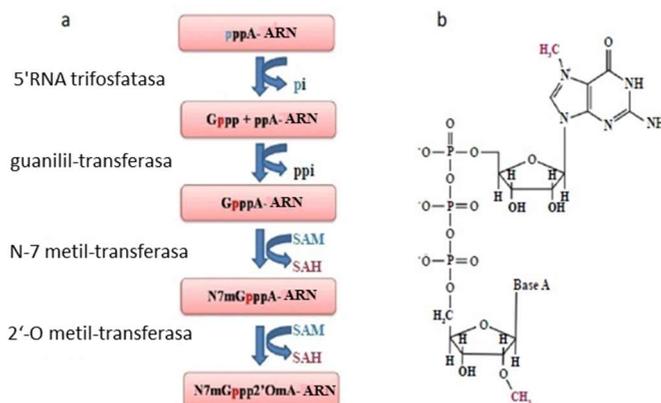
La proteína NS5 es la proteína no estructural más grande (104 kDa) y la más conservada en los distintos serotipos de DENV y en el género *Flavivirus*. NS5 lleva a cabo varias actividades enzimáticas: el extremo N-terminal conforma el dominio metil-transferasa (MTasa) que posee

actividad de MTasa y de guanilil-transferasa (GTasa), mientras que el dominio C-terminal posee actividad de ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp) (Figura 6) (Brand y col., 2017).



**Figura 6:** Estructura terciaria de NS5 de DENV. En el extremo amino-terminal se encuentra el dominio con actividad de metil-transferasa (MTasa) mientras que en el extremo carboxi-terminal se halla el dominio con actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp).

La síntesis de la estructura del cap ocurre en 3 pasos (Figura 7). Primero, la actividad GTasa transfiere GMP del sustrato GTP al difosfato en el extremo 5' del ARN viral naciente. Luego, la actividad MTasa cataliza dos reacciones de metilación consecutivas: primero la metilación de la guanina en su posición N7 para producir  $7^{\text{Me}}\text{Gppp-ARN}$  y luego la metilación del primer nucleótido transcripto (adenosina conservada) en su posición 2'-O para producir  $7^{\text{Me}}\text{GpppA}_{2'\text{OMe}}\text{-ARN}$ , utilizando en ambos casos como dador de metilos a la S-adenosilmetionina (SAM) (Brand y col., 2017). Mientras que la actividad de DENV N7-MTasa es esencial para la replicación, los virus defectuosos en 2'O-MTasa pueden replicarse moderadamente en células infectadas (Dong y col., 2010).



**Figura 7: Síntesis del cap tipo 1.** a) En primer lugar la proteína NS3 cataliza la hidrólisis del 5'-trifosfato a 5'-difosfato en el RNA naciente. Luego la actividad de guanilil-transferasa de NS5 transfiere una molécula de GMP al extremo 5'-difosfato del RNA. Posteriormente NS5 cataliza la metilación de la guanosina en la posición N7, seguido de la metilación en la posición 2'-OH del primer nucleótido transcripto. SAM: S-adenosilmetionina; SAH: S-adenosilcisteína b) La estructura de cap tipo 1. Adaptado a partir de Wangikar y col., 2016.

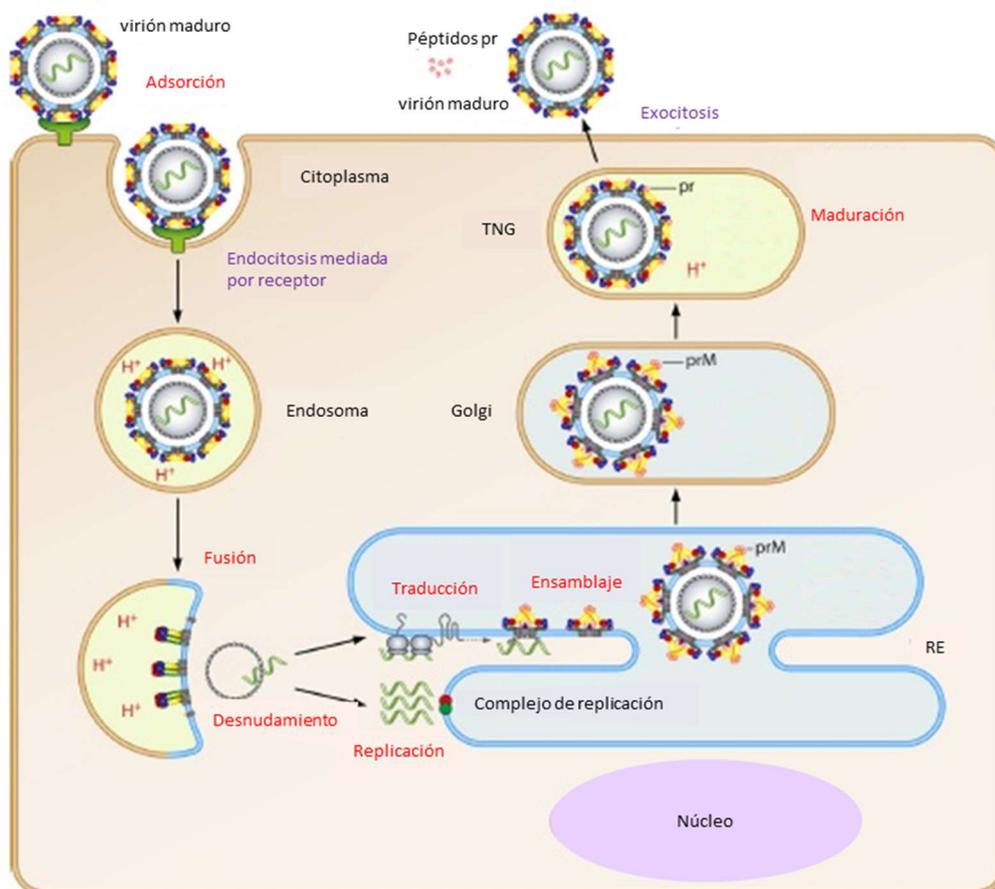
La actividad de RdRp es responsable y esencial para la replicación / transcripción del genoma viral. Las interacciones de la proteína NS5 con NS3 cumplen un rol importante para la replicación viral, dependen del grado de fosforilación de NS5 y son seroespecíficas (Kapoor y col., 1995; Teramoto y col., 2017).

## Ciclo de multiplicación viral

### *Etapas iniciales de la infección*

El ciclo de multiplicación de DENV comienza con la adsorción de la partícula viral a la célula a través de la unión de la glicoproteína viral E a un receptor celular. En el hombre, las primeras células en ser infectadas son principalmente células dendríticas y macrófagos residentes de la piel que migran a los nódulos linfáticos provocando la infección de nuevos macrófagos y monocitos. Así la infección se disemina a través del sistema linfático y vascular. Estudios realizados a partir de muestras de sangre periférica de pacientes infectados, explantos de piel o de autopsias de enfermos fallecidos, han sugerido que *in vivo* el virus podría replicar además en células de bazo, hígado, células endoteliales de pulmón, y plaquetas (Whitehorna y col.,

2011). Por otra parte, se ha demostrado que DENV posee la capacidad de infectar *in vitro* una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo células derivadas de larva de mosquito, células de neuroblastoma de ratón, células de riñón de mono, y líneas celulares humanas diversas como monocitos, macrófagos, células endoteliales, células de carcinoma de cérvix, células de carcinoma de pulmón, hepatocitos y células neuronales (Noisakran y col., 2010). Este amplio tropismo sugiere que el virus utilizaría un receptor ubicuo o receptores diversos según el tipo celular a infectar. Diferentes proteínas de membrana, lectinas, carbohidratos e incluso lípidos celulares han sido descritos como receptores celulares para DENV. Se ha reportado además que en el caso de algunas líneas celulares el receptor utilizado depende del serotipo viral (Castilla y col., 2015).



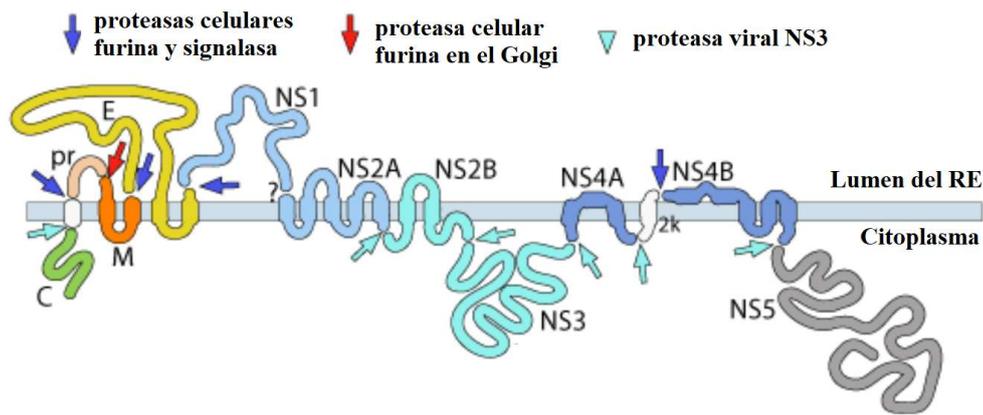
**Figura 8:** *Ciclo de replicación de DENV. TGN: trans-Golgi, RE: retículo endoplasmático*

La unión de la proteína viral con su correspondiente receptor celular desencadena cambios conformacionales en la superficie celular que permiten que la partícula viral ingrese a la célula

por endocitosis pH dependiente (Cruz-Oliveira y col., 2015) (Figura 8). El mecanismo general reportado de entrada para DENV es endocitosis mediada por clatrina (Acosta y col., 2008; 2009; 2011), pero se pueden encontrar reportes que corroboran el empleo de otras vías endocíticas (Acosta y col., 2009; Piccini y col., 2015; Suksanpaisan y col., 2009). A su vez, se ha demostrado que en una misma línea celular la vía endocítica utilizada depende del serotipo viral (Acosta y col., 2009). El virus internalizado es transportado por la red endosomal cuyo pH va disminuyendo a medida que avanza el proceso. La dependencia del pH en la entrada de DENV está relacionada con las interacciones entre las proteínas E y M y sus residuos de histidina. La acidificación en el interior de la vesícula endosomal genera la protonación de los residuos de histidinas que conlleva a un cambio conformacional de la glicoproteína E a su forma trimérica fusogénica posibilitando la interacción del péptido de fusión con la membrana endosomal. La fusión de las membranas viral y endosomal permite entonces la liberación de la nucleocápside al citoplasma (Zhang y col., 2013; Castilla y col., 2015). Asimismo, recientemente se comprobó que el desnudamiento del genoma de DENV es dependiente de la ubiquitinación dado que la inhibición de este proceso impide la traducción de la poliproteína viral (Byk y col., 2016b).

#### *Síntesis de macromoléculas virales*

El genoma de DENV liberado al citoplasma es traducido para generar una poliproteína precursora que es clivada co- y post-traduccionalmente para dar origen a las proteínas virales estructurales y no estructurales. Este proceso ocurre asociado a la membrana del RE (Figura 9). Las proteasas celulares son las responsables del clivaje en la cara del lumen del RE mientras que la proteasa viral se encarga del clivaje del lado citoplasmático del RE (Shannon y col., 2016). A su vez, en el RE las proteínas NS1, E y prM son glicosiladas (Yap y col., 2017).



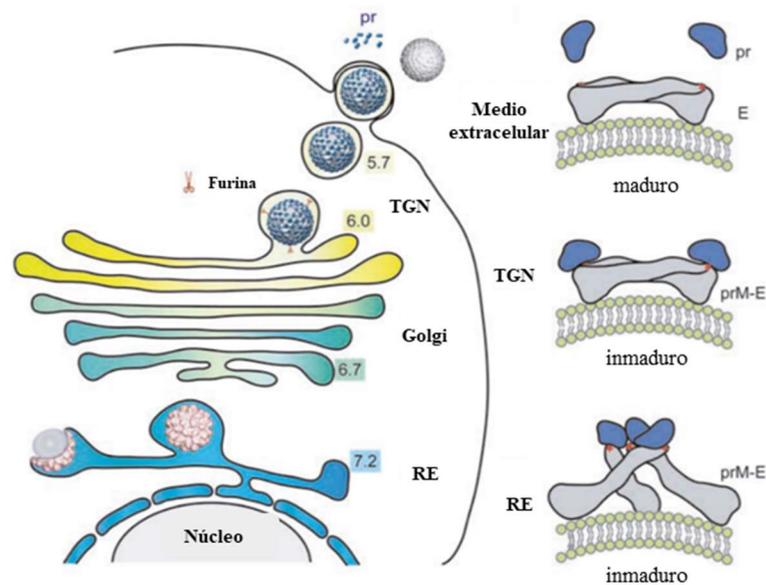
**Figura 9:** Esquema de la poliproteína de DENV sintetizada que muestra la organización de las proteínas estructurales (C, M y E) y de las no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) y la topología propuesta en el retículo endoplasmático (RE). Los sitios reconocidos y cortados por las proteasas celulares se marcan con azul y los sitios de clivaje de la proteasa viral NS3 se muestran con flechas celestes. El sitio de corte de la proteasa celular furina ocurre en el Golgi durante la etapa de maduración de las partículas virales y se señala con una flecha roja.

Las proteínas virales no estructurales proveen las actividades enzimáticas y el ambiente apropiado para la replicación del genoma de DENV. La misma ocurre en complejos de replicación situados en vesículas membranosas formadas por invaginaciones de la membrana del RE generadas por la infección (Welsch y col., 2009). Las vesículas presentan pequeños poros que conectan el lumen de la vesícula con el citoplasma permitiendo el intercambio de nucleótidos y ARN viral y protegiendo a este último del reconocimiento por parte del hospedador. Las proteínas de transmembrana NS2B, NS4A y NS4B anclan a la proteína NS3 a la membrana y esta a su vez interacciona con NS5 para formar el complejo de replicación asociado a la membrana (Brand y col., 2017). En la replicación del genoma viral primero se sintetiza una cadena de ARN de polaridad negativa que va a servir de templado para generar más genomas de DENV. Para eso el ARN se circulariza por interacciones de largo alcance entre secuencias complementarias presentes en los extremos 5' y 3'UTR. La polimerasa NS5 reconoce el ARN viral por interacción directa con una estructura secundaria presente en el 5'UTR y la circularización del genoma permite el acceso al extremo 3' de la polimerasa unida al extremo 5' para iniciar la síntesis de ARN (Filomatori y col., 2006; Bujalowski y col., 2017). Por su parte, la proteína NS3 separa las hebras del intermediario de ARN doble cadena de tal manera que la cadena positiva es guiada al dominio MTasa de NS5 y la cadena negativa al

dominio RdRp de NS5 para servir como templado de la síntesis de ARN de cadena positiva (Brand y col., 2017).

### *Ensamblaje, maduración y liberación de las partículas virales*

El ARN recién sintetizado saldría por los poros de las vesículas formadas a partir del RE para trasladarse a los sitios cercanos de ensamblado donde el genoma viral interacciona con varias unidades de la proteína C para formar la nucleocápside. El ensamblado de la partícula viral requiere de la función de varias proteínas virales no estructurales presentes en el complejo de replicación, pero su mecanismo todavía es desconocido. La nucleocápside brota hacia el lumen del RE donde adquiere la envoltura derivada de la membrana del RE enriquecida en las proteínas E y prM (Byk y col., 2016a) (Figura 8). Las partículas virales inmaduras poseen espículas conformadas por 3 heterodímeros de las proteínas E y prM en una conformación tal que evita la exposición prematura del péptido de fusión en el camino secretorio (Figura 10) (Yu y col., 2008). Estas partículas se acumulan en la periferia del RE y migran en forma individual en vesículas hacia el aparato de Golgi (Burlaud-Gaillard y col., 2014). En el trans-Golgi (TGN), el pH más ácido del entorno genera cambios conformacionales que llevan a la disociación de los heterodímeros y a la formación de homodímeros de la glicoproteína E, dejando accesible a la proteasa celular furina el sitio de clivaje de la proteína prM para dar lugar a la proteína de membrana M y el péptido soluble pr (Figuras 8, 9 y 10). A diferencia de lo que se ha comprobado para otros flavivirus, en DENV el clivaje de prM es incompleto y una gran proporción de partículas virales conteniendo prM-E son liberadas al medio extracelular. Esto se debe a la presencia de un residuo ácido cercano al sitio de clivaje, ausente en otros flavivirus, que debilita la interacción entre la enzima y el sustrato. Esto genera partículas virales inmaduras no infecciosas así como partículas virales parcialmente maduras, que pueden ser o no infecciosas según el grado de clivaje de prM (Rodenhuis-Zybert y col., 2011). Luego del clivaje, el péptido pr permanece asociado a la glicoproteína E para evitar la exposición del péptido de fusión durante la secreción a un pH ácido (Perera y col., 2008). La partícula viral es transportada a través de una vesícula exocítica hacia la periferia de la célula, donde dicha vesícula se fusiona con la membrana plasmática y permite la salida de la partícula viral al medio extracelular. Una vez que la partícula viral sale al medio extracelular la exposición a pH neutro provoca la liberación del péptido pr (Figura 10) (Yu y col., 2008).



**Figura 10: Maduración y egreso de las partículas de DENV.** Las nucleocápsides adquieren la envoltura en la membrana del RE enriquecida en las proteínas E y prM y se forman partículas virales inmaduras que poseen espículas conformadas por 3 heterodímeros de las proteínas E y prM. Estas partículas migran en vesículas hacia el aparato de Golgi y en el TGN el pH ácido induce la disociación de los heterodímeros y la formación de homodímeros de glicoproteína E, dejando accesible a la proteasa celular furina el sitio de clivaje de la proteína prM para dar a lugar a la proteína M y al péptido soluble pr que permanece asociado a la glicoproteína E. Finalmente la partícula viral es transportada, a través de la vía exocítica, al medio extracelular donde la exposición a pH neutro provoca la liberación del péptido pr.

### **Modulación de la vía dependiente de proteínas quinasas activadas por mitógenos p38 MAPK durante la infección con DENV.**

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) son una familia de serin/treonin quinasas que regulan una amplia variedad de actividades celulares incluyendo la transcripción, la síntesis de proteínas, el ciclo celular, la apoptosis y la diferenciación. Las vías de señalización celular dependientes de MAPKs mejor estudiadas son la vía ERK 1/2 (quinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares), JNK (quinasa c-Jun N-terminal) y p38. La vía ERK MAPK está generalmente asociada al crecimiento y la proliferación mientras que JNK MAPK y p38 MAPK se relacionan con la respuesta a estrés y la producción de citoquinas (Keshet y col., 2010). Algunas evidencias experimentales indican que DENV provoca la activación de estas cascadas de señalización, por lo cual se ha propuesto que compuestos que modulen la activación de estas vías podrían tener un efecto antiviral. En el caso de p38 MAPK se ha demostrado que DENV-2 induce la activación de esta vía en diferentes tipos celulares

como macrófagos humanos y líneas celulares hepáticas humanas (Ceballos-Olvera y col., 2010; Huerta-Zepeda y col., 2008). Sin embargo, compuestos que inhiben de forma específica la activación de esta vía parecerían tener un efecto antiviral parcial y dependiente del tipo celular frente a DENV-2 (Ceballos-Olvera y col., 2010; Roth y col., 2017). Por otra parte, estudios realizados tanto en cultivos de células endoteliales como en un modelo animal indican que la activación de p38 estaría involucrada en la producción de citoquinas durante la infección por DENV (Huerta-Zepeda y col., 2008; Sreekanth y col., 2016).

## **Vacunas**

El desafío que debe enfrentar el desarrollo de una vacuna efectiva para la prevención del dengue es lograr una respuesta balanceada y perdurable, tanto humoral como celular, que proteja de la infección por cualquiera de los 4 serotipos virales (Feinberg y col., 2017). Si bien son varias las vacunas en desarrollo que están siendo actualmente evaluadas en ensayos clínicos, hasta el momento la vacuna recombinante tetravalente atenuada Dengvaxia<sup>NR</sup>, fabricada por Sanofi Pasteur, es la única que ha sido aprobada en algunos países como México, Filipinas, Brasil, El Salvador y Paraguay. Dengvaxia<sup>NR</sup> se basa en el reemplazo de los genes de las proteínas prM y E de la cepa vacunal del virus de la fiebre amarilla 17D por los correspondientes genes de los cuatro serotipos de DENV (Robinson y col., 2017). Esta vacuna presenta una eficacia del 60% en la prevención de infecciones sintomáticas, del 73% en la prevención de hospitalizaciones debido a infección por DENV y del 79% en la prevención del dengue grave (Hadinegoro y col., 2015). La eficacia de la vacuna varía según el serotipo siendo menor frente a infecciones por DENV-2 (Feinberg y col., 2017). A su vez, la característica más importante de esta vacuna es que su eficacia es significativamente menor (38%) en individuos seronegativos con respecto a individuos con infección previa (78%) y en el caso de niños menores a 9 años la eficacia no es significativa y la vacunación en este grupo etario conlleva además un mayor riesgo de presentación clínica severa de la enfermedad (Hadinegoro y col., 2015, Halstead y col., 2016). Debido a este tipo de evidencias la OMS recomienda la utilización de esta vacuna en países con una seroprevalencia mayor al 70% (World Health Organization, 2016). Por el contrario, en el caso de países con baja seroprevalencia la introducción de la vacuna podría llegar a incrementar los casos de dengue grave y a su vez se considera que la posibilidad de introducir un testeo previo a la vacunación para determinar la seroprevalencia de cada individuo resultaría poco práctico y de costo

elevado (Ferguson y col., 2016). En marzo de 2017, la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) (Disposición 3135-17) aprobó el uso de Dengvaxia<sup>NR</sup> en nuestro país para niños mayores de 9 años y adultos hasta la edad de 45 años inmunocompetentes. Sin embargo, dado que Argentina no es considerada un país endémico para el dengue la vacuna no se ha incluido en el calendario de vacunación obligatoria.

## **EL VIRUS ZIKA**

### **La enfermedad por ZIKV**

ZIKV fue aislado por primera vez a partir de un macaco rhesus (*Macaca mulatta*) en el bosque Zika situado en Uganda en 1947, durante un estudio de vigilancia de fiebre amarilla selvática. El virus aislado, cepa MR 766 disponible en ATCC (ATCC® VR84<sup>TM</sup>), se aisló también a partir de un mosquito *Aedes africanus* en el mismo bosque sugiriendo la transmisión entre primates y mosquitos (Dick y col., 1952). En 1964, también en Uganda, se reportó el primer caso confirmado de enfermedad por ZIKV en humanos (Simpson, 1964) mientras que en 1969 se aisló ZIKV por primera vez en el sudeste asiático, en Malasia, virus actualmente almacenado en ATCC (ATCC® VR-1845<sup>TM</sup>) como cepa P6-740. Hasta el año 2007 sólo se habían notificado en el mundo 20 casos humanos confirmados esporádicos de infección por ZIKV en África y Asia y el análisis genómico de los distintos aislamientos durante este período permitió establecer la existencia de dos linajes, el linaje asiático y el linaje africano (Armstrong y col., 2017).

El primer brote de enfermedad por ZIKV se reportó en el 2007 en la isla de Yap en Micronesia, con 49 casos confirmados y una estimación del 73 % de la población infectada, confirmando la propagación de ZIKV fuera de Asia y África (Duffy y col., 2009). Entre septiembre de 2013 y marzo de 2014 se registró una epidemia en otra isla del Pacífico, la Polinesia Francesa, donde se confirmaron 294 casos estimándose 19.000 casos totales, extendiéndose luego a otras islas del Pacífico (Cao-Lormeau y col., 2014). Por otra parte, durante esta epidemia se reportó el primer caso de síndrome neurológico de Guillain-Barré (SGB) después de una infección con ZIKV y el primer caso de transmisión vertical de una mujer embarazada a su bebé. A su vez, se logró detectar la presencia de virus infeccioso en el semen de un paciente, siendo ésta

la primera evidencia que sugería que ZIKV podía transmitirse por vía sexual (Waddell y col., 2016).

En el año 2015 se produjo en Brasil un brote de enfermedad por ZIKV que puso en evidencia la llegada del virus al continente americano y a partir de este brote se comenzaron a registrar casos autóctonos de ZIKV en casi 50 países de América. Las infecciones con ZIKV en Brasil estuvieron relacionadas con alteraciones oculares y neurológicas severas incluyendo la microcefalia en neonatos nacidos de madres infectadas durante el embarazo (Priyamvada y col., 2017).

Tanto las epidemias registradas desde 2007 en las Islas del Pacífico como la epidemia que se inició en América Latina fueron causadas por virus del linaje asiático (Baud y col., 2017).

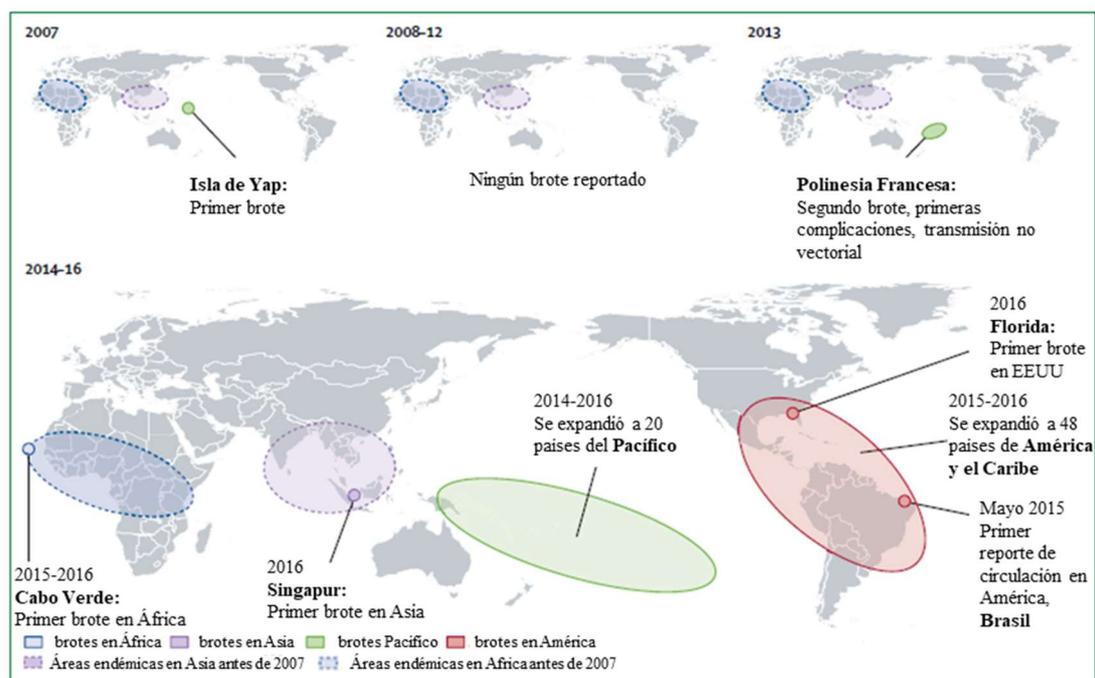


Figura 11: Brote de ZIKV entre los años 2007 y 2016. Modificado de Baud y col., 2017.

Actualmente, la infección por ZIKV es considerada una emergencia en salud pública y una creciente preocupación global. La principal forma de transmisión de este virus es a través de mosquitos del género *Aedes* y, en coincidencia con DENV, los principales vectores son *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Epelboin y col., 2017). El 80 % de las infecciones con ZIKV son asintomáticas, mientras que los pacientes con sintomatología presentan signos de enfermedad

parecidos a los que se observan en una infección leve con DENV: fiebre, sarpullido maculopapular, dolor de cabeza y muscular, fatiga, artritis, artralgia y, en aproximadamente el 50 % de los casos, conjuntivitis en el período temprano de la infección (Mittal y col., 2017). Los casos de enfermedad con riesgo de muerte por infección con ZIKV son muy raros y se limitan a pacientes con comorbilidades. A partir de los numerosos casos reportados en los distintos brotes epidémicos ocurridos, se estableció que ZIKV puede transmitirse verticalmente durante el embarazo y dicha transmisión, principalmente entre las semanas 7 y 13 del embarazo, está asociada al desarrollo de microcefalia y otras complicaciones neurológicas severas en el feto y a la inducción de abortos (Waddell y col., 2016). Por otra parte, ZIKV también puede transmitirse por vía sexual tanto a partir de enfermos sintomáticos como asintomáticos y se ha podido aislar virus infeccioso en semen hasta más de 60 días después de registrada la sintomatología (Baud y col., 2017). La transmisión de ZIKV por transfusiones sanguíneas también ha sido descripta y se ha comprobado también que existe una correlación entre la infección con este virus y el incremento en la incidencia del SGB, una enfermedad aguda que puede llevar a discapacidad o muerte. Sin embargo, hasta el momento no hay información suficiente para establecer si ZIKV es el agente etiológico del SGB (Waddell y col., 2016).

### **La enfermedad por ZIKV en Argentina**

El primer caso autóctono de enfermedad por ZIKV en nuestro país se registró en febrero de 2016 en la provincia de Córdoba, en donde una mujer se contagió por vía sexual de un viajero proveniente de Colombia con sintomatología compatible con la enfermedad. En mayo del mismo año, se registró el primer brote por transmisión vectorial en la provincia de Tucumán con 26 casos confirmados en donde 2 bebés de madres infectadas presentaron malformaciones diversas indicando un síndrome congénito asociado a la infección con ZIKV. En el año 2017 se registraron 3 brotes de ZIKV en las provincias de Chaco, Formosa y Salta, con 252 casos confirmados, 2 casos confirmados de síndrome congénito asociado al brote de Salta y un caso probable correspondiente al brote de Formosa (Ministerio de Salud Argentina 2018, [http://www.msal.gob.ar/images/stories/boletines/BIV\\_393\\_SE01](http://www.msal.gob.ar/images/stories/boletines/BIV_393_SE01)).

## Características generales de la partícula viral

ZIKV pertenece, al igual que DENV, al género *Flavivirus* dentro de la familia *Flaviviridae*. Su genoma, cuyo tamaño es de 10,8 kb, está constituido por ARN de cadena simple y polaridad positiva y posee un único marco abierto de lectura flanqueado por una región 5'UTR de 106 nucleótidos y una región 3'UTR de 428 nucleótidos. Ambas regiones no codificantes contienen secuencias y estructuras secundarias necesarias para la síntesis de ARN y de proteínas que son semejantes a las que presenta el genoma de DENV (Ye y col., 2016). Las características generales del ciclo de multiplicación y de la organización estructural de la partícula viral de ZIKV son también similares a las de DENV (Suwanmanee y col., 2017; Sirohi y col., 2016, Priyamvada y col., 2017). DENV y ZIKV presentan entre 44 y 56 % de homología en la secuencia de aminoácidos para las proteínas estructurales y hasta un 68 % de identidad de secuencia para las proteínas no estructurales más conservadas NS3 y NS5 (Rivino y col., 2017). Algunos de los epítopes reconocidos por las células T CD8+ que están presentes en las proteínas no estructurales de DENV están conservados en ZIKV, siendo NS5 el principal blanco de la respuesta celular (Rivino y col., 2017). Por su parte, la reactividad cruzada entre los anticuerpos de ambos virus es objeto de numerosos estudios y la proteína E es el principal blanco de los anticuerpos neutralizantes y constituye la base en la que se sustentan la mayoría de las estrategias para la obtención de vacunas actualmente en desarrollo. La comparación de la secuencia de aminoácidos de los dominios I, II y III de la glicoproteína E de ZIKV y DENV reveló una homología del 35 %, 51 % y 29 % para cada dominio respectivamente (Stettler y col., 2016).

Estudios *in vitro* han demostrado el efecto ADE provocado tanto por anticuerpos anti-DENV en la infección con ZIKV como por anticuerpos anti-ZIKV en la infección con DENV (Paul y col., 2016; Stettler y col., 2016), lo cual es de suma importancia dada la co-circulación de ambos virus en las mismas regiones siendo altamente probables las infecciones secuenciales heterotípicas (Heinz y col., 2017). Los ensayos realizados en modelos de ADE *in vivo* han mostrado resultados menos concluyentes ya que la administración previa de anticuerpos anti-ZIKV en ratones AG129 provocó un incremento de la severidad y letalidad de la infección con DENV (Stettler y col., 2016) pero no se ha observado un incremento de la severidad de la infección por ZIKV en primates del género *Cercopithecus* previamente inmunizados con DENV (Pantoja y col., 2017).

Las principales diferencias entre los linajes de ZIKV se encuentran en la glicoproteína estructural E, observándose una divergencia en la secuencia de aminoácidos del 6 % entre ambos linajes, mientras que dentro del mismo linaje la divergencia es del 2 %. El alto grado de identidad de secuencia entre los linajes y los estudios de neutralización indican que, a diferencia de DENV, ZIKV presenta un solo serotipo (Dowd y col., 2016).

### **Modelos para el estudio de la infección por ZIKV**

Diferentes modelos son utilizados para el estudio de la infección por ZIKV, su tropismo, patogénesis y sus vías de transmisión, así como en la evaluación de vacunas y agentes antivirales.

*In vitro* el virus replica en diferentes tipos celulares de origen humano como fibroblastos de la piel, queratinocitos epidérmicos, células dendríticas inmaduras derivadas de la piel y macrófagos placentarios, estos últimos empleados en el análisis de la infección intrauterina. Por otra parte, las células progenitoras neurales humanas son utilizadas para el estudio de los mecanismos moleculares que conducen a las patologías neurológicas. El empleo de estos diferentes sistemas celulares ha mostrado que los efectos de la infección sobre la funcionalidad de la célula hospedadora son específicos para cada tipo celular. Por otra parte, en los ensayos de evaluación de agentes antivirales las líneas celulares más empleadas son las células Vero (riñón de mono) y las células HuH-7 (hepatoma humano) (Kublin y col., 2017).

En cuanto a los estudios *in vivo* se desarrollaron distintos modelos murinos. El primer modelo de infección en ratones inmunocompetentes fue descrito al poco tiempo del primer aislamiento viral, la cepa africana MR 766. En este reporte se mostró que los animales inoculados por vía intracraneal presentaban signos de afección neurológica, mientras que si la ruta de infección era periférica, los animales no presentaban signos de enfermedad y se detectaba escasa replicación del virus. Resultados similares se obtuvieron más recientemente utilizando cepas virales contemporáneas, lo cual llevó a pensar que la respuesta a interferón (IFN) por parte del hospedador estaba limitando la infección ya que, a diferencia de lo que ocurre en el humano, ZIKV no es capaz de contrarrestar la respuesta a IFN tipo I en el ratón. En los ratones A129, deficientes en los receptores para IFN tipo I, infectados por vía subcutánea (s.c.), intraperitoneal (i.p.) o intravenosa (i.v.), la infección produjo enfermedad y resultó letal, detectándose picos de viremia y la presencia del virus en distintos tejidos como

cerebro, hígado, bazo, pulmón, corazón, ovarios y testículos. Por otra parte, los ratones AG129, deficientes en los receptores para IFN tipo I y tipo II, infectados con ZIKV por vía intradérmica (i.d), s.c. o i.p. resultaron aún más susceptibles a la infección, observándose signos más severos de enfermedad, provocando también la muerte de los animales. En estos dos últimos modelos los principales signos de enfermedad observados fueron: pérdida de peso, conjuntivitis, debilidad de las patas traseras y parálisis asociada a la patología de ZIKV sobre el sistema nervioso central (Kublin y col., 2017). Otro modelo empleado lo constituyen los ratones inmunocomprometidos por administración de anticuerpos que bloquean los receptores para IFN tipo I. Utilizando esta estrategia en ratones C57BL/6 se logró una infección sistémica con niveles de neuroinflamación y mortalidad significativos (Krause y col., 2017).

Los primates no humanos (PNH) son hospedadores naturales de ZIKV y tanto la respuesta inmunológica como la dinámica viral son parecidas a las de los humanos. Además, resultan ideales para el estudio de la infección congénita por ZIKV debido a la similitud con respecto al hombre de los procesos la gestación y desarrollo fetal (Krause y col., 2017). Los PNH más caracterizados son los macacos rhesus, cynomolgus y cola de cerdo, sin embargo, estos modelos presentan algunas desventajas ya que requieren de instalaciones apropiadas, poseen un período de gestación más largo que el de los animales pequeños y los costos de mantenimiento son elevados (Kublin y col., 2017; Morrison y col., 2017).

Debido a que la cepa ZIKV MR 766, la primera en ser aislada, ha sido sometida a numerosos pasajes en cultivos celulares y al hecho de que esta cepa presenta diferencias con los aislamientos clínicos contemporáneos, en los estudios *in vivo* llevados a cabo en estos últimos tres años se emplean preferentemente aislamientos de ZIKV del linaje asiático (Kublin y col., 2017).

## **Vacunas**

Si bien hasta el momento no hay ninguna vacuna aprobada, son varias las estrategias que se están llevando a cabo para el desarrollo de una vacuna eficaz para prevenir la enfermedad por ZIKV. La glicoproteína es el principal blanco para la generación de anticuerpos neutralizantes y por eso la mayoría de las vacunas se enfocan en la expresión de E junto con prM para la generación de subpartículas virales (Morabito y col., 2017).

Entre las vacunas que se encuentran actualmente siendo evaluadas en ensayos clínicos se encuentran por ejemplo vacunas de ADN que permiten la expresión de prM y E de cepas africanas y asiáticas (GLS-5700, de Inovio Pharmaceuticals) o de aislamientos clínicos de la Polinesia Francesa y de Brasil (Instituto Nacional de Alergia e Infecciones Infecciosas (NIAID), el Instituto Nacional de Salud (NIH) y el Centro de Investigación en Vacunas (VRC) de los Estados Unidos). Se han desarrollado además dos vacunas inactivadas con formol utilizando la cepa africana MR 76 (Bharat Biotechnologies) o una cepa aislada en Puerto Rico denominada PRVABC59 (Instituto de Investigación de la Armada Walter Reed de los Estados Unidos) (Shankar y col., 2017). Entre otros desarrollos de importancia se puede mencionar una vacuna a subunidades que utiliza al virus de sarampión como vector para la expresión de prM-E de ZIKV (Themis Biosciences) (Morabito y col., 2017).

## **DESARROLLO DE ANTIVIRALES PARA DENV Y ZIKV**

A pesar de la emergencia de ZIKV y la re-emergencia de DENV, hasta el momento no se dispone de antivirales específicos para el tratamiento de las enfermedades causadas por estos virus.

La mayoría de los agentes antivirales disponibles hoy en el mercado son compuestos que tienen un efecto directo sobre algún componente viral, pero también se pueden desarrollar estrategias antivirales dirigidas a factores o procesos celulares involucrados en la multiplicación de un virus. Los agentes antivirales dirigidos a factores virales, garantizan mayor especificidad y selectividad en su acción y su uso en infecciones agudas de corta duración disminuye el riesgo de selección de variantes virales resistentes. La evaluación de procesos celulares que juegan un papel importante en la multiplicación y patogénesis viral ha ganado preponderancia en los últimos años como una alternativa interesante para el desarrollo de nuevas terapias antivirales. Si bien este abordaje posee el riesgo de un mayor grado de toxicidad, tiene ventajas tales como el hallazgo de compuestos con un mayor espectro de acción sobre distintos virus, así como una menor posibilidad de aparición de resistencia antiviral. Su aplicación resulta más factible en infecciones virales agudas donde es posible pensar en tratamientos no prolongados de manera de minimizar los efectos adversos indeseados (García y col., 2017).

## DENV

Tanto el diseño racional de nuevos compuestos antivirales como el reposicionamiento de fármacos, es decir, la evaluación de la actividad antiviral de compuestos que ya fueron evaluados en ensayos clínicos para otros fines, han sido abordajes empleados en el desarrollo de antivirales para DENV.

Los ensayos *in vitro* más empleados en la búsqueda de nuevos agentes antivirales para hacer frente a la infección por DENV se pueden dividir en dos categorías (Lai y col., 2017):

1. Ensayos basados en la estructura o actividad enzimática del blanco de acción antiviral. Este tipo de abordaje ha permitido la identificación de compuestos que afectan la estructura de la glicoproteína E y de algunas proteínas no estructurales como NS5, así como de drogas que afectan diferentes actividades enzimáticas de las proteínas virales no estructurales. Esta metodología tiene la desventaja de que no tiene en cuenta factores celulares y virales que pueden interferir en la interacción del compuesto con la proteína viral (Lai y col., 2017).

2. Ensayos en cultivos celulares. Estos ensayos permiten no solamente evaluar la citotoxicidad y la actividad inhibitoria de un compuesto en el contexto de las interacciones entre el virus y la célula infectada, sino también estudiar su efecto sobre las diferentes etapas del ciclo de multiplicación viral, su eficacia en diferentes tipos celulares y sus posibles interacciones con factores virales y/o celulares. Una gran variedad de compuestos ha exhibido eficacia frente a la infección con DENV en cultivos celulares (Lai y col., 2017)

Para poder estimar el potencial clínico de un compuesto que ha mostrado actividad *in vitro* es necesario verificar su seguridad y eficacia *in vivo*. A pesar de que muchos compuestos han presentado actividad tanto *in vitro* como *in vivo*, solo unos pocos han llegado a ser evaluados en ensayos clínicos para el tratamiento del dengue (Kaptein y col., 2016).

En la Figura 12 se presenta un esquema del ciclo de multiplicación de DENV en el cual se señalan las etapas del ciclo afectadas por algunos de los compuestos antivirales que han sido evaluados en ensayos clínicos frente a este virus.

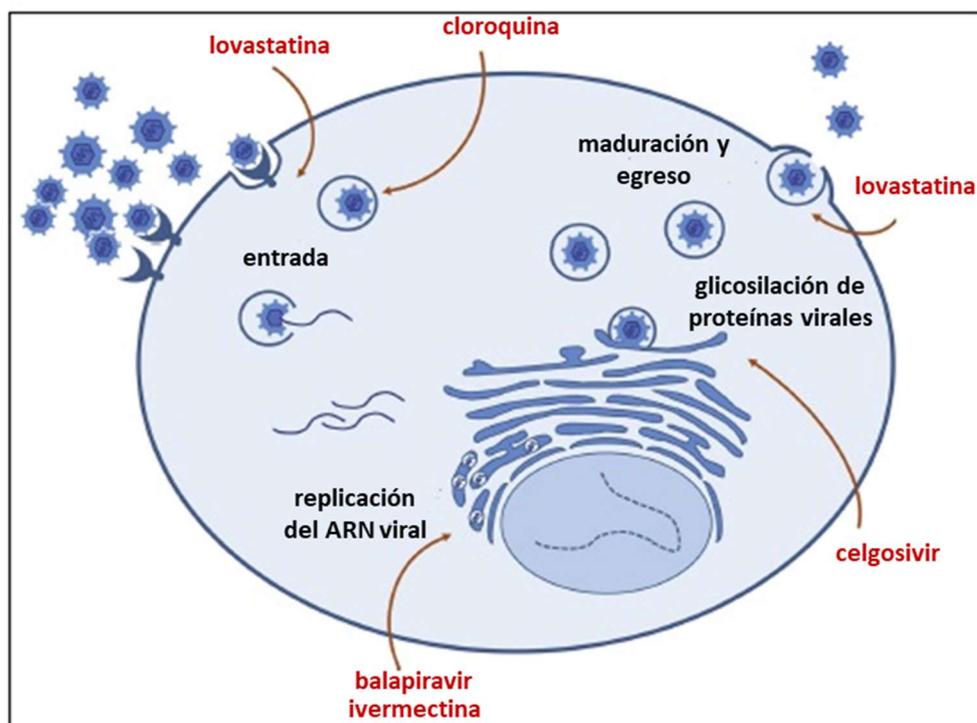


Figura 12: Etapas del ciclo de replicación de DENV afectadas por los principales compuestos antivirales evaluados en ensayos clínicos. Modificado de Kapstein y col., 2016.

El compuesto balapiravir se desarrolló como posible tratamiento frente a otro miembro de la familia *Flaviviridae*, HCV. Este compuesto es la prodroga del análogo de nucleósido 4'-azidocitidina (R1479), un potente inhibidor de la polimerasa NS5B de HCV. Se postuló que el balapiravir podía ser un buen candidato como agente antiviral frente a DENV debido a la similitud estructural entre NS5B de HCV y el dominio RdRp de la proteína NS5 de DENV (Chen y col., 2014). Por otra parte, varios compuestos con blancos de acción celulares han sido evaluados en ensayos clínicos. La cloroquina, por ejemplo, aprobada para el tratamiento de la malaria, pertenece al grupo de las 4-aminoquinolinas y es un agente lisosomotrópico, es decir, eleva el pH de las vesículas ácidas intracelulares, entre ellas lisosomas y endosomas, debido a la protonación de su grupo amino. Por lo tanto, este compuesto impediría la fusión de la membrana viral con la membrana endosomal. Además, este compuesto actúa como inmunomodulador disminuyendo la producción de citoquinas (Tricou y col., 2010). Por otra parte, se realizaron ensayos clínicos con el compuesto lovastatina, inhibidor de la síntesis de colesterol, que afecta tanto la entrada del virus a la célula como la maduración y salida de las partículas virales (Kaptein y col., 2016). Otro de los compuestos ensayados, denominado celgosivir, desarrollado en un principio para el tratamiento de HCV, es la prodroga del

producto natural castanospermina, un inhibidor de  $\alpha$ -glucosidasas. Durante el ensamblaje de DENV en el RE, las  $\alpha$ -glucosidasas modifican las cadenas oligosacáridicas de la glicoproteína E y estas modificaciones son necesarias para el egreso de las partículas virales (Sung y col., 2016). En la actualidad se encuentra en curso un ensayo clínico fase III con el compuesto ivermectina, un antiparasitario, que actuaría como un inhibidor de la actividad helicasa de la proteína NS3 de DENV (Low y col., 2017). Sin embargo, hasta el presente ninguno de los compuestos evaluados en ensayos clínicos ya concluidos ha resultado efectivo en el tratamiento del dengue, por lo cual el desarrollo de moléculas antivirales para hacer frente a esta enfermedad representa un desafío para la comunidad científica.

## ZIKV

En el caso de ZIKV, el desarrollo de antivirales tiene que tener en cuenta el tratamiento de mujeres embarazadas. Por lo tanto, se busca una droga que califique para la categoría clínica A/B, es decir, que no afecte el desarrollo fetal o la interfase materno-fetal y que no interfiera con la respuesta inmune antiviral ya que la misma es crítica para la prevención de enfermedades de transmisión materno-fetal. En estos últimos años, los mayores esfuerzos se han destinado a la producción de una vacuna para prevenir la infección por ZIKV y si bien se han identificado algunas moléculas con eficacia antiviral tanto *in vitro* como *in vivo* ninguna se encuentra en la fase clínica de experimentación.

Entre los compuestos que han sido evaluados tanto *in vitro* como *in vivo* se encuentran, por ejemplo, los análogos de adenosina, galidesivir (BCX4430), NITD008 y 7DMA, inhibidores de la RdRp. En ratones AG129 infectados con ZIKV, el compuesto galidesivir, administrado por vía intramuscular durante 8 días, con una dosis de 300 mg/kg/d dos veces por día, comenzando el tratamiento 4 h antes de la infección, provocó el aumento de la supervivencia y del peso corporal de los animales y la disminución de los niveles de ARN viral en el suero (Julander y col., 2017). Por su parte, ratones A129 infectados con ZIKV y tratados con NITD008 por vía oral, con una dosis de 50 mg/kg/d, una vez por día durante 4 días, comenzando el tratamiento a las 4 h post-infección, mostraron una mayor supervivencia y una disminución del pico de viremia (Deng y col., 2016). En cuanto al compuesto 7DMA, el tratamiento por vía oral con una dosis de 50 mg/kg/d, una vez por día durante 10 días, de ratones AG129 infectados con ZIKV provocó una reducción tanto de la viremia como de la mortalidad de los animales (Zmurko y col., 2016). Por otro lado, con el objetivo de bloquear la entrada del virus a la célula, se sintetizó un péptido que corresponde a una región conservada

de la proteína E de ZIKV (residuos 421 – 453), denominado Z2. Ratones A129 infectados con ZIKV y tratados con Z2 diariamente por vía i.p. con una dosis de 10 mg/kg/d, durante 6 días, comenzando el tratamiento a 1 h p.i., mostraron una reducción en la viremia y en la mortalidad.

Como estrategia para identificar moléculas con actividad antiviral frente a ZIKV también se consideró el reposicionamiento de fármacos, ensayándose diferentes compuestos como el sofosbuvir (inhibidor de RdRp aprobado para el tratamiento de HCV), la novobiocina (un antibiótico retirado del mercado que presentó actividad frente a la proteasa NS2B-NS3 de ZIKV) y la cloroquina, entre otros (Abrams y col., 2017; Xie y col., 2017).

Es de esperar que algunos de los compuestos más efectivos pasen a ser evaluados en estudios clínicos. Sin embargo, debido a que este tipo de ensayos deben realizarse en primer lugar en pacientes no embarazadas probablemente la disponibilidad de un antiviral frente a ZIKV que evite las infecciones congénitas se encuentre a varios años de ser posible (Xie y col., 2017).

## **ALCALOIDES CON ACTIVIDAD ANTIVIRAL**

Los alcaloides son un grupo de compuestos naturales que son nitrogenados y sintetizados por una amplia cantidad de organismos a partir de aminoácidos u otros derivados. Frecuentemente los alcaloides son heterociclos y la mayoría de ellos presentan grupos funcionales aminas o iminas y por lo tanto son básicos, de ahí su nombre “alkali-like”. Son poco solubles en agua pero sí son solubles a pH ácido o en diferentes solventes orgánicos y a los compuestos sintéticos que comparten estas características también se los denomina alcaloides. Los alcaloides presentan un amplio espectro de actividades biológicas incluyendo antimaláricos (quinona y cloroquinona), agentes anticancerígenos (vincristina, taxol), vasodilatadores (vincamina) y analgésicos (morfina) (Aniszewski, 2007). Este tipo de compuestos también pueden presentar actividad antiviral. Por ejemplo, se ha reportado la actividad antiviral *in vitro* de diversos alcaloides de guanidina como la ptilomicalina A, activa frente al virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) y al virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) y otros compuestos derivados de la esponja *Neofolitispa dianchora* que presentaron actividad frente al virus de la hepatitis B (Sfecci y col., 2016). A su vez se demostró que el alcaloide licorina exhibe actividad antiviral frente a diferentes virus como poliovirus (PV), SARS coronavirus, HSV-1, WNV, YFV, DENV y HCV (Chen y col., 2015a; Zou y col., 2009).

Las  $\beta$ -carbolinas y la anisomicina también son alcaloides activos para los cuales se ha reportado actividad antiviral.

## $\beta$ -carbolinas

El núcleo de las  $\beta$ -carbolinas proviene de la triptamina, un derivado de L-triptofano (Figura 13). Los alcaloides derivados de este aminoácido suelen ser compuestos biológicamente activos y abundantes en la naturaleza. El núcleo de las  $\beta$ -carbolinas se puede sintetizar utilizando una base de Schiff en una reacción como Mannich (Aniszewski, 2007).

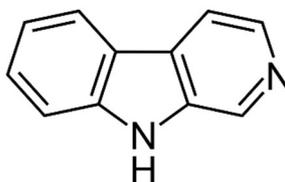


Figura 43: Núcleo de las  $\beta$ -carbolinas

Las  $\beta$ -carbolinas exhiben una gran variedad de efectos farmacológicos como antitumorales, antiparasitarios y son conocidos por ser inhibidores de las monoamino oxidasas, responsables de la oxidación de las aminas endógenas y de neurotransmisores. Además, se ha reportado la actividad antiviral de diversas  $\beta$ -carbolinas de origen vegetal y de derivados sintéticos frente a un amplio espectro de virus.

Entre las  $\beta$ -carbolinas de origen natural podemos mencionar al compuesto 1-metoxicantinona, aislado de la planta *Leitneria floridana*, que posee actividad frente a HIV (Xu y col. 2000) y a la harmina, ampliamente distribuida en plantas y obtenida principalmente a partir de la especie vegetal *Peganum harmala*, que exhibe actividad antiviral frente a HIV-1, HSV-1, HSV-2 y herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) (Benzekri y col., 2017; Chen y col., 2015b; Jiang y col., 2017). En células infectadas con HSV-2 se determinó que la harmina reduce la transcripción y la síntesis de proteínas virales y se ha propuesto que su acción antiviral estaría relacionada con la habilidad que posee este compuesto de inhibir la activación de las vías de señalización celular p38 MAPK y JNK MAPK inducidas por la infección viral (Chen y col., 2015b). Por el contrario, Jiang y col. (2017) han reportado que la harmina afectaría tanto etapas tempranas como tardías de la infección con BoHV-1 y su efecto antiviral no estaría relacionado con la vía de señalización p38 MAPK.

Por otra parte, una gran variedad de derivados sintéticos de las  $\beta$ -carbolinas han mostrado actividad antiviral frente a HIV (Ashok y col., 2015; Brahmabhatt y col., 2010; Wang y col., 2007), papilomavirus humano (Miller y col., 2010), HSV-1 (Barbosa y col., 2016; Nazari Formagio y col., 2009) y PV (Nazari Formagio y col., 2009), pero se desconoce el mecanismo de acción de estos compuestos.

Hasta la realización de este trabajo no se contaba con antecedentes en relación a la actividad antiviral de las  $\beta$ -carbolinas frente a los flavivirus pero sí se había reportado una potente actividad antiviral de una serie de derivados sintéticos de  $\gamma$ -carbolinas frente al virus de la diarrea viral bovina (BVDV), miembro del género *Pestivirus* dentro de la familia *Flaviviridae* (Sako y col., 2008). En este caso, los derivados de  $\gamma$ -carbolinas inhibieron la síntesis de ARN viral y se ha propuesto a la polimerasa viral como blanco de la acción antiviral debido a que mutaciones en dicha enzima afectan la capacidad inhibitoria de los compuestos (Salim y col., 2010).

A partir de los antecedentes expuestos, en este trabajo de tesis decidimos evaluar la actividad antiviral de  $\beta$ -carbolinas naturales (harmina, harmano, norharmano y harmol) obtenidas a partir de la especie vegetal *Peganum harmala* y de una serie de derivados sintéticos frente a la multiplicación de DENV en cultivos celulares.

### Anisomicina

La anisomicina, (2R, 3S, 4S)-4-hidroxi-2-[(4-metoxifenil) metil] pirrolidin-3-il acetato (Figura 14), es un alcaloide que originalmente se identificó como un antibiótico contra ciertos protozoos y hongos, lo que dio lugar a usos clínicos propuestos como un fármaco tópico anticandidiásico y antiamebiano en humanos (Hall y col., 1983; Lynch y col., 1954).

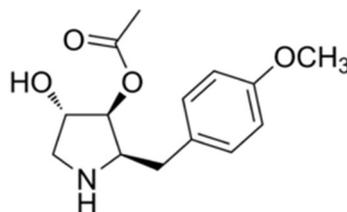


Figura 14: Estructura de anisomicina

En estudios realizados en cultivos celulares se ha demostrado que a concentraciones por encima de 10  $\mu$ M este compuesto actúa como un inhibidor de la elongación de la síntesis de proteínas debido a su capacidad de unirse al sitio A de la subunidad ribosomal 60S, bloqueando así la formación del enlace peptídico (Barbacid y col., 1974; Hansen y col., 2003). Además, varios estudios comprobaron que a concentraciones subinhibitorias, la anisomicina activa las vías de señalización dependientes de MAPKs asociadas a respuesta a stress JNK MAPK y p38 MAPK (Zinck y col., 1995; Stadheim y col., 2002; Liu y col., 2014).

Dado que existe el antecedente de que la anisomicina es capaz de inhibir la multiplicación de JEV en cultivos celulares (Chang y col., 2005), en el presente trabajo decidimos evaluar a este compuesto como posible molécula con actividad antiviral frente a DENV, ZIKV y otros flavivirus.

# *Objetivos*

## **Objetivos generales**

El objetivo general en el cual se encuadra el presente trabajo de tesis es evaluar la actividad antiviral de alcaloides naturales y sintéticos frente a la infección por flavivirus.

## **Objetivos específicos**

- 1) Evaluar y caracterizar la actividad antiviral de  $\beta$ -carbolinas naturales (harmina, harmano, norharmano y harmol) y de sus derivados sintéticos frente a DENV en cultivos celulares.
- 2) Examinar la actividad antiviral de la anisomicina frente a DENV y ZIKV.

Para este segundo objetivo nos propusimos:

- Evaluar y caracterizar la actividad antiviral de la anisomicina frente a DENV en cultivos celulares.
- Analizar el espectro de acción antiviral de la anisomicina frente a otros flavivirus y frente a virus no relacionados.
- Evaluar la actividad tóxica y antiviral de la anisomicina en un modelo animal de infección por ZIKV.

# *Materiales y métodos*

## Células

La línea celular continua Vero (ATCC, CCL-81), proveniente de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*, se creció en medio esencial mínimo de Eagle (MEM) (GIBCO) suplementado con 5 % de suero de ternero recién nacido (NBCS) (GIBCO) inactivado y 50 µg/mL de gentamicina. Para el medio de mantenimiento (MM) la concentración de suero se redujo a 1,5 %.

La línea celular continua A549 (ATCC, CCL-185), proveniente de carcinoma de pulmón humano, fue crecida en MEM suplementado con 10 % de NBCS (GIBCO) inactivado y 50 µg/mL de gentamicina. Para el MM la concentración de suero se redujo a 1,5 %.

La línea celular continua HepG2 (ATCC, HB-8065), proveniente de un hepatocarcinoma humano, fue crecida en MEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO) inactivado, piruvato de sodio (200 mM), glutamina 2 mM y 50 µg/mL de gentamicina. Para el MM la concentración de suero se redujo a 1,5 %.

La línea celular crecida en suspensión U937 (ATCC CRL-1593.2), mielomonocitos provenientes de un linfoma histiocítico humano, provista por la Dra. R. Gamberale de la Academia Nacional de Medicina, se propagó en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de SFB (Natocor) inactivado y 50 µg/mL de gentamicina. Para el MM la concentración de SFB se redujo a 5 %.

La línea celular de mosquito C6/36 HT (adaptada a crecer a 33°C), proveniente de larvas de *Aedes albopictus*, se obtuvo del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH) Dr. Julio Maiztegui (Pergamino, Argentina). Las células se crecieron en medio L-15 (Leibovitz) (GIBCO) suplementado con 0,3 % de caldo triptosa fosfato; 0,02 % de glutamina; 1 % de solución de aminoácidos no esenciales MEM (GIBCO), 5 % de SFB (GIBCO) inactivado y 50 µg/mL de gentamicina. Para el MM la concentración de suero se redujo a 2 %.

Las líneas celulares Vero 76 (ATCC CRL-1587) proveniente de riñón de mono, BHK-21 (ATCC CCL-10) proveniente de riñón de hámster, MDCK (ATCC CRL-2935) proveniente de riñón canino, MA-104 (ATCC CRL-2378.1) proveniente de riñón de mono y HeLa-Ohio-1 (cedida por Frederick Hayden de la Universidad de Virginia) proveniente de carcinoma de cérvix humano, se crecieron en MEM conteniendo 10 % de SFB (GIBCO). Para el MM la concentración de suero se redujo a 1 %.

Cuando los cultivos se incubaron en estufa con 4 % de CO<sub>2</sub>, los medios se suplementaron con HEPES 20 µM (Sigma-Aldrich) o con ácido clorhídrico 1N y se llevaron a pH 7,2 con bicarbonato de sodio 7,5 %.

### **Animales**

Ratones AG129 (sin receptores para IFN- $\alpha/\beta$  y  $-\gamma$ ) hembras y machos, fueron criados en condiciones libres de gérmenes en el Centro de Investigación de Animales de Laboratorio (LARC), de la Universidad Estatal de Utah (USU), Utah, EEUU. Ratones entre 8 y 10 semanas con un peso promedio de 22 g fueron asignados al azar a cada grupo e individualmente marcados con etiquetas en las orejas

### **Virus**

DENV: se utilizó la cepa Hawaii de DENV-1, la cepa NGC de DENV-2, la cepa H87 de DENV-3 y la cepa 8124 de DENV-4. Los aislamientos clínicos de DENV-2 fueron provistos por la Dra. Delia Enría del INEVH, Pergamino.

ZIKV: se emplearon la cepa INEVH11614 (cedida por la Dra. Silvana Levis del INEVH, Pergamino) y las cepas P6-740 y PRVABC59 que fueron provistas por el Dr. J. Julander del LARC, USU, EEUU

Los siguientes virus fueron provistos por el Dr. J. Julander del LARC, USU, EEUU

- Virus del Nilo occidental (WNV), cepa WN02
- Virus de la encefalitis japonesa (JEV), cepa SA14
- Virus Powassan (POWV), cepa M794
- Virus de la fiebre amarilla (YFV), cepa 17D
- Virus influenza A (IAV), cepa California/07/2009 (H1N1)
- Virus Chikungunya (CHIKV), cepa S27(VR-67)
- Virus de la encefalitis equina occidental (WEE), cepa California
- Poliovirus tipo 1 (PV), cepa Mahoney

- Virus respiratorio sincicial (RSV), cepa A2
- Virus parainfluenza humano 3 (HPPIV3), cepa 14702
- Virus Junín (JUNV), cepa Candid#1
- Virus Pichindé (PICV), cepa AN 4763
- Virus La Crosse (LACV), cepa Wiscosin 1960
- Virus Punta Toro (PTV), cepa Adames
- Virus de la fiebre del Valle de Rift (RVFV), cepa MP-12
- Virus Maporal (MAPV), cepa HV97021050
- Virus de la rata de Kilham (RV), cepa 1059

### **Compuestos**

Los compuestos harmina, harmano y norharmano, se adquirieron en Sigma-Aldrich mientras que el harmol fue adquirido en Wako Pure Chemical Industries Ltd. En todos los casos los compuestos fueron de grado analítico y no fueron sometidos a una purificación adicional. Los derivados sintéticos de las  $\beta$ -carbolinas fueron sintetizados en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de Buenos Aires y provistos por la Dra. María Alejandra Ponce. La síntesis de los compuestos 9N-metilharmina, 9N-metilharmano y 9N-metilnorharmano se realizó según lo descripto previamente (Cao y col., 2004; 2005), mientras que la síntesis de los ésteres alifáticos de harmol con cadenas de 2 a 6 carbonos se llevó a cabo de acuerdo a lo descripto en Begum y col. (2004).

Los compuestos anisomicina, sinefugina y 3'dATP se adquirieron en Sigma-Aldrich.

### **Obtención de stocks virales**

Los stocks de DENV y ZIKV (cepa INEVH11614) se obtuvieron en células C6/36 HT crecidas en botellas de plástico T25, utilizando una multiplicidad de infección (m.i.) de 1 UFP/célula. El inóculo viral se dejó adsorber 1 h a 33°C y luego los cultivos se cubrieron con MM y se incubaron a 33°C. Los sobrenadantes se cosecharon desde el tercero hasta el séptimo día post-infección (p.i.) y se conservaron en alícuotas a -70°C hasta su uso.

### **Ensayo de formación de placas**

Para la cuantificación del título viral infeccioso, monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 24 cavidades se infectaron con 100  $\mu$ L de diluciones seriadas al décimo de las suspensiones virales en MM. Cada dilución se ensayó por duplicado. Luego de 1 h de incubación a 37°C se retiraron los inóculos y las monocapas celulares se cubrieron con medio de plaqueo. El medio de plaqueo consistió en MEM doblemente concentrado suplementado con 4 % de NBCS (GIBCO) inactivado y 100  $\mu$ g/mL de gentamicina, mezclado con igual volumen de metilcelulosa 2 % (Sigma-Aldrich). Los cultivos se incubaron a 37°C durante distintos tiempos dependiendo del virus ensayado (4 días para ZIKV, 6 días, para DENV-1, 2 y 3 o 10 días para DENV-4) y posteriormente se fijaron con formol 10 %, se enjuagaron con agua y luego se realizó el recuento de las placas de lisis.

### **Determinación de la viabilidad celular por el método de MTS**

Para evaluar el efecto de los compuestos sobre la viabilidad celular, se utilizó el kit CellTiter 96® Aqueous Non-radioactive Cell Proliferation Assay (Promega) que contiene la sal de tetrazolio 3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboxi- metoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio (MTS) y un reactivo de acoplamiento electrónico, metasulfato de fenazina (PMS). En presencia de PMS, el MTS se reduce por deshidrogenasas celulares para formar el producto formazán coloreado y soluble. El método permite cuantificar la cantidad de células metabólicamente activas como parámetro de viabilidad celular. Para eso, las células crecidas en microplacas de 96 cavidades se incubaron con 100  $\mu$ L/ cavidad de diluciones seriadas al medio de cada compuesto en estudio por triplicado. Tres cavidades se incubaron con MM constituyendo el control sin droga. Luego de 48 h de incubación a 37°C, se agregó la solución de MTS/PMS (según instrucciones del fabricante) y se midió la absorbancia a 490 nm al cabo de 1, 2, 3 y 4 h y se calculó un promedio de las mediciones. Luego se determinó la concentración citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>), la concentración de droga que reduce en un 50% la viabilidad celular con respecto al control, mediante un análisis de regresión no lineal utilizando el programa GraphPad Prism 5.

### **Ensayo de inhibición de rendimiento viral**

Las células Vero, A549 o HepG2, crecidas en monocapa en microplacas de 24 cavidades, se infectaron con 0,1 mL/cavidad de una dilución del stock de virus tal que la m.i. fuera de 1 UFP/célula. Algunos experimentos en células Vero se llevaron a cabo a diferentes m.i. (0,1, 1, 10 o 50 UFP/célula). Luego de 1 h a 37°C se descartó el inóculo y los cultivos se cubrieron con 500 µL de diluciones seriadas al medio del compuesto a ensayar diluido en MM. En el caso de las células U937 que crecen en suspensión,  $2 \times 10^5$  células se infectaron a una m.i. de 10 UFP/célula en un volumen total de 200 µL en medio sin suero. La adsorción se realizó en tubos eppendorf durante 2 h a 37°C y luego cada suspensión celular se transfirió a una cavidad de una microplaca de 24 cavidades donde se agregaron 300 µL de las distintas concentraciones del compuesto diluido en MM.

Las células se incubaron por 48 h a 37°C momento en el cual se cosecharon los sobrenadantes y se cuantificó la infectividad viral (título de virus extracelular) por el ensayo de formación de placas. La concentración efectiva 50 ( $CE_{50}$ ), concentración de droga que reduce en un 50 % el rendimiento viral, se determinó mediante un análisis de regresión no lineal utilizando el programa GraphPad Prism 5. El índice de selectividad (IS) se calculó como el cociente entre  $CC_{50}/CE_{50}$ .

### **Evaluación del espectro antiviral de la anisomicina**

Estos ensayos fueron llevados a cabo en el Institute for Antiviral Research (IAR), USU, EEUU, bajo la supervisión del Dr. Justin Julander.

Cultivos de células Vero76, MA-104, MDCK, HeLa o BHK-21 crecidos en microplacas de 96 cavidades se trataron con diluciones seriadas al quinto de anisomicina. Luego, las células fueron infectadas con dosis apropiadas de cada uno de los virus a ensayar (las condiciones de infección han sido estandarizadas en el IAR). En todos los casos, por cada dilución de compuesto a ensayar 2 cavidades no infectadas fueron utilizadas para evaluar la citotoxicidad y 3 cavidades infectadas se utilizaron para evaluar la actividad antiviral y los cultivos fueron incubados hasta observar el máximo efecto citopático. La citotoxicidad y actividad antiviral fueron primero estimadas por una determinación visual del porcentaje de células destruidas y luego se descartaron los sobrenadantes y se agregó el colorante rojo neutro hasta una concentración final de colorante de 0,011 %. Las células se incubaron durante 2 h y luego se

leyó la absorbancia a 540 nm en un lector de placas. Se calcularon los valores de  $CC_{50}$ ,  $CE_{50}$  (concentración de compuesto que redujo en un 50% el efecto citopático viral) e IS. En el caso de los flavivirus se tomaron alícuotas de los sobrenadantes a los 3 días post-infección (d.p.i.) (antes de que se detectara el máximo efecto citopático) y se tituló el rendimiento viral por el método de punto final basado en la observación al microscopio del efecto citopático viral, calculándose el título viral en  $DICC_{50}/mL$ . Se calcularon los valores de  $CC_{50}$ ,  $CE_{50}$  (concentración de compuesto que redujo en un 50 % el rendimiento viral) e IS.

### **Actividad virucida**

Alícuotas del stock de DENV-2 se incubaron por 2 a 37°C en presencia o ausencia de los compuestos. Luego la muestra se diluyó en MM y se determinó su infectividad remanente por medio de un ensayo de formación de placas.

### **Efecto del tiempo de adición de los compuestos sobre el rendimiento viral**

En algunos casos se realizó un pre-tratamiento de los cultivos celulares con el compuesto en estudio. Para ello, las células Vero crecidas en microplacas de 24 cavidades se incubaron con 500  $\mu L$  de una determinada concentración del compuesto a ensayar diluido en MM durante distintos tiempos antes de la infección. Luego se descartó el sobrenadante, las células se lavaron con MM y se infectaron con 0,1 mL/cavidad de DENV-2 (cepa NGC) a una m.i. de 1 UFP/célula. Luego de 1 h de adsorción a 37°C se agregó MM sin compuesto. En otros experimentos el compuesto se agregó a los cultivos a distintos tiempos p.i. En todos los casos, a las 24 h p.i. se cosechó el sobrenadante de los cultivos a fin de titular el virus extracelular por el método de formación de placas. Por otro lado, una vez retirado el sobrenadante, las células se lavaron con MM y luego del agregado de 500  $\mu L$  de MM se sometieron a dos ciclos de congelamiento-descongelamiento seguido de una centrifugación a baja velocidad a fin de separar restos celulares. A partir del sobrenadante de la centrifugación se tituló el virus intracelular por el método de formación de placas.

### **Ensayo de inmunofluorescencia**

Las células Vero crecidas sobre cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades se infectaron con 200  $\mu$ L de DENV-2 (NGC) a una m.i. de 1 o 10 UFP/célula. Las células se incubaron 1h a 37°C y luego de descartar el inóculo viral se agregó MM conteniendo el compuesto a ensayar y los cultivos se incubaron durante diferentes tiempos a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se lavaron 3 veces con 500  $\mu$ L por cavidad de buffer fosfato salino (PBS) y se incubaron con 500  $\mu$ L de metanol frío durante 10 min a -20°C con el objeto de fijar y permeabilizar las células. Luego los cultivos se lavaron 3 veces con PBS en agitador durante 5 min a temperatura ambiente y se incubaron con una dilución 1/300 del anticuerpo anti-glicoproteína E de DENV (ab41349, Abcam) en PBS durante 30 min a 37°C en cámara húmeda. Luego de 3 lavados con PBS los cultivos se incubaron con una dilución 1/100 de Igs anti-ratón conjugadas a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma Aldrich) en PBS durante 30 min a 37°C en cámara húmeda. Al finalizar la incubación, las células se lavaron 2 veces con PBS y 1 vez con agua. Los núcleos celulares se tiñeron incubando las células con 500  $\mu$ L de Hoechst 0,02  $\mu$ g/mL durante 15 min a temperatura ambiente. Luego de 1 lavado con PBS y 2 lavados con agua los vidrios se montaron sobre una solución tamponada de glicerol conteniendo 2,5 % de 1,4-diazabicyclo octano (DABCO). Las muestras se visualizaron utilizando un microscopio Zeiss u Olympus IX71 de epifluorescencia óptica.

### **Ensayo de Western-Blot**

Las células Vero crecidas en monocapa en microplacas de 24 cavidades se infectaron o no con DENV-2 (NGC) (m.i.=1) y luego de 1 h de adsorción los cultivos se incubaron con MM conteniendo diferentes concentraciones de 9N-metilharmina o anisomicina por duplicado. Los cultivos se incubaron durante diferentes periodos de tiempo a 37°C y posteriormente las células se lisaron con 50  $\mu$ L de buffer Laemmli (Bio-Rad) adicionado con 5 % de  $\beta$ -mercaptoetanol. Las muestras fueron calentadas durante 3 min a 100°C y las proteínas se analizaron por SDS-PAGE. Los geles fueron corridos a 100 V por 15 min y 150 V por 1h. Una vez terminada la corrida, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Perkin Elmer LifeSciences, Inc) en un sistema semiseco (LKB, Multiphor II). Las membranas se incubaron en solución de bloqueo (buffer Tris salino (TBS) conteniendo Tween 0,1 % y BSA 3 %) durante 1 h a 37°C. A continuación las membranas se incubaron con una dilución 1/500 del anticuerpo primario: anti P-p38 (mAB # 4511 o mAB # 9211, Cell Signaling Technology)

o anti-ERK (Santacruz Biotechnology) en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche y luego de 3 lavados con TBS-Tween 0,1% las membranas se incubaron con la dilución 1/2000 del anticuerpo secundario, anti-Ig de conejo, conjugado a peroxidasa (Amersham) en solución de bloqueo, durante 1h a temperatura ambiente. La detección de las proteínas en estudio se realizó por quimioluminiscencia y para el procesamiento de los datos se utilizó el programa Image J.

Preparación de reactivo de quimioluminiscencia: Se prepararon las soluciones stock de luminol (250 mM) y de ácido cumárico (90 mM) en dimetil sulfóxido (DMSO) las cuales se guardaron a -20°C. Luego se prepararon las soluciones 1 y 2 y se guardaron en heladera por un máximo de 2 semanas. La solución 1 se preparó con 4,6 mL de H<sub>2</sub>O; 0,333 mL de Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8; 0,022 mL de ácido cumárico 90 mM y 0,050 mL de luminol 250 mM. La solución 2 se preparó con 4,66 mL de H<sub>2</sub>O; 0,333 mL de Tris 1,5 M pH 8,8 y 0,01 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %. Las soluciones 1 y 2 se mezclaron en relación 1:1 al momento de realizar el revelado.

## **Extracción de ARN**

### A partir de cultivos celulares

Las células Vero crecidas en monocapa en microplacas de 6 cavidades se infectaron con 400 µL/cavidad de DENV-2 (NGC) (m.i.=1 o 10) y se incubaron 1 h a 37°C. Luego se descartó el inóculo y los cultivos se cubrieron con 2 mL de MM (control viral) o 2 mL de MM conteniendo 9N-metilharmina (40 µM), anisomicina (200 nM) o ribavirina (80 µM). A diferentes tiempos p.i. se extrajo el ARN total de los cultivos utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen). Para ello, se agregaron 500 µL de TRIzol a cada cavidad y los cultivos se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Luego se agregaron 400 µL de cloroformo, se agitó durante 15 seg y se incubó durante 3 min a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron durante 15 min a 18.000 g a 4°C. La fase acuosa se transfirió a tubos eppendorf limpios y el ARN se precipitó al agregar el mismo volumen de isopropanol y posterior incubación a -70°C por 30 min seguido de una centrifugación durante 15 min a 18.000 g a 4°C. El pellet obtenido se lavó con etanol 70 %, se dejó secar y se resuspendió en 90 µL de agua libre de ribonucleasas. Se realizó una nueva precipitación del ARN agregando 10 µL de acetato de sodio 3 M y 250 µL de etanol 100 % e incubando las muestras a -70°C durante 30 min. Luego de una centrifugación a 18.000 g, a 4°C durante 15 min, el pellet se lavó con

etanol 70 %, se dejó secar y se resuspendió en 20 µL de agua libre de ribonucleasas. El ARN obtenido en cada muestra se cuantificó y se verificó su pureza utilizando el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

#### A partir de suero de ratones AG129

En el 5 d.p.i., se tomó aproximadamente 250µL de sangre del seno venoso submandibular por ratón y se centrifugó por 10 min a 1300 g para separar el suero. Las muestras se almacenaron a -80°C. A partir del suero se extrajo el ARN utilizando QIAamp Viral RNA Mini Spin kit acorde a las instrucciones del fabricante (Qiagen, Valencia, CA).

### **Ensayo de RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR)**

#### A partir de cultivos celulares

El ARN viral se cuantificó mediante un ensayo de qRT-PCR utilizando la expresión del ARN mensajero de actina como estándar para la normalización. Para ello se agregaron 2 µg del ARN extraído a una mezcla conteniendo 1,6 µL del primer dengue 3' (5' CACTACGCCATGCGTGTACAGC 3') (solución madre: 10 µM), 1,6 µL del primer acti 1 (5' GAGACCTTCAACACCCCAGCC 3') (solución madre: 10 µM) y agua libre de ribonucleasas hasta completar los 10 µL totales. Esta mezcla de reacción (mezcla 1) se incubó 5 min a 65°C y luego se mantuvo en hielo. Para cada muestra se preparó la siguiente mezcla de reacción 2: 1 µL dNTPs (10 mM), 4 µL buffer RT 5x, 1 µL inhibidor de ribonucleasas (RNAsin) (40 unidades/µL), 1 µL RT (MLV) (200 unidades/µL) (Promega) y 3 µL de agua (libre de ribonucleasas). Luego a los 10 µl de la mezcla 1 se agregó la mezcla de reacción 2 conteniendo la transcriptasa reversa. La transcripción reversa se realizó durante 2 h a 42°C.

La amplificación por PCR se llevó a cabo colocando 2 µL del ADN copia obtenido a partir de cada muestra por triplicado, 12,5 µL de mezcla real (Invitrogen) y los primers de DENV-2 , 3' y 5' (5' CCTGTAGCTCCACCTGAGAAG 3'), o los primers de actina, acti1 y acti2 (5' GGCCATCTCTTGCTCGAAGTC 3'), a una concentración final de 10 µM. La amplificación y detección se llevó a cabo en un termociclador IQ (Biorad) empleando las siguientes condiciones: 3 min 95°C; 40 ciclos: 15 seg 95°C, 1 min 61°C y 30 seg 72°C; 10 min 72°C. También se realizó una curva de melting para corroborar la pureza de las muestras. Para cada muestra se calculó el QR con los datos de Ct de la PCR:

$$QR=2^{\Delta\Delta ct}$$

donde  $\Delta\Delta ct = (C_t^{\text{viral}} - C_t^{\text{celular}})_{\text{control}} - (C_t^{\text{viral}} - C_t^{\text{celular}})_{\text{tratado}}$

Con el propósito de cuantificar el número de copias de genoma viral presentes en el medio extracelular de los cultivos infectados y tratados o no con 9N-metilharmina, los sobrenadantes de los cultivos fueron concentrados por ultracentrifugación a 100.000 g durante 2 h y luego el precipitado se resuspendió en TRIzol (Invitrogen) a fin de realizar la extracción del ARN. La extracción del ARN para determinar del número de copias de genoma viral tanto en el medio extracelular como en el medio intracelular y el resto de los pasos de la qRT-PCR se realizaron como se describió en el ítem anterior, pero en este caso la cuantificación se llevó a cabo mediante la realización de una curva estándar utilizando el ARN obtenido a partir de la transcripción *in vitro* de un replicón DENV-2 (Álvarez y col., 2005b).

#### A partir de suero de ratones AG129

El ARN extraído se diluyó con agua libre de ribonucleasas y se amplificó por qRT-PCR usando el Test de Zika de Logix Smart desarrollado por Co-Diagnostics, Inc. (Bountiful, UT). 5µL de la master mix, conteniendo el set de primers y la sonda Rapid Probe, marcada con el fluoroforo FAM y el quencher DABCYL, se mezclaron con 2-5 µL de ARN y agua libre de ribonucleasas hasta completar los 20 µL totales. El ARN se transcribió de forma reversa por 10 min a 55°C, seguido de la separación de hebras a 95°C por 20 seg. La reacción de PCR consistió en 40 ciclos a 95°C por 1 seg y 55°C por 20 seg. La curva estándar fue generada a partir de un ARN sintético que abarca la región de amplificación y se utilizó para cuantificar el número de copias de genoma en las muestras.

#### **Ensayo de internalización viral**

Las monocapas de células Vero, crecidas en microplacas de 24 cavidades, se infectaron con aproximadamente 100 UFP/cavidad de DENV-2 (NGC). Luego de 1 h de incubación a 4°C se retiraron los inóculos virales, se realizaron tres lavados con PBS frío y se adicionó MM precalentado a 37°C para dar inicio al proceso de internalización en ausencia o presencia de anisomicina (200 nM). Los cultivos se incubaron a 37°C y a diferentes tiempos se lavaron con PBS y se trataron con 300 µL de buffer citrato (ácido cítrico 40 mM, KCl 10 mM, NaCl 135 mM, pH 3,0) de manera de eliminar el virus adsorbido pero no internalizado. Luego las

monocapas celulares se lavaron con PBS, se cubrieron con medio de plaqueo y se incubaron a 37°C durante 6 días. Transcurrido este tiempo, los cultivos se fijaron con formol y se realizó el recuento de placas. En este ensayo cada placa formada corresponde a una célula o centro infeccioso en el que una partícula viral logró ser internalizada de manera productiva.

### **Cinética de desnudamiento viral**

Las monocapas de células Vero, crecidas en microplaca de 24 cavidades, se infectaron a 4°C con aproximadamente 100 UFP/cavidad de DENV-2 (NGC). Luego de 1 h de incubación a 4°C se realizaron 3 lavados con PBS frío y se adicionaron 450 µL de MM precalentado a 37°C para dar inicio a la internalización viral. Los cultivos se transfirieron a un baño térmico a 37°C y a distintos tiempos de incubación (0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min) se agregaron 50 µL de MM conteniendo cloruro de amonio (concentración final 50 mM) o anisomicina (concentración final 200 nM). Las células se incubaron en presencia de los compuestos a 37°C durante 3 h y luego se trataron durante 1 min con buffer citrato, pH 3,0, a fin de inactivar aquellas partículas virales que hubieran quedado adsorbidas sin internalizar. Luego de realizar tres lavados con PBS, las células se cubrieron con medio de plaqueo y al cabo de 6 días las mismas se fijaron con formol y se realizó el recuento de placas.

### **Actividad de ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp) de NS5**

Los estudios de actividad enzimática se realizaron en el laboratorio de Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques Laboratory en la Universidad Aix-Marsella bajo la supervisión del Dr. Bruno Canard.

Se analizó el efecto de los compuestos estudiados sobre la actividad RdRp de la proteína NS5 de DENV-2 según protocolo previamente descrito por Selisko y col. (2006). La secuencia codificante del dominio RdRp de NS5 de DENV-2 (NGC) fue clonada en un plásmido de expresión pQE30 (Qiagen) río arriba de una etiqueta de hexa-histidina clivable. La proteína fue expresada en *Escherichia coli* Rosetta pLacI cells (Novagen) y posteriormente purificada.

Se utilizó un buffer de reacción (HEPES 50 mM, pH 8,0, KCl 10 mM, MnCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, ditiotreitól (DTT) 10 mM) conteniendo 100 nM de uridina homopolimérica como templado para la síntesis de ARN, 20 nM de la RdRp de DENV-2 y diferentes concentraciones del compuesto a ensayar (1, 10 y 50 µM).

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 40  $\mu\text{L}$  en una placa de 96 cavidades y todos los experimentos se robotizaron mediante el uso de un automatizador BioMek 3000 (Beckman). Para cada ensayo, la mezcla enzimática se distribuyó en cada una de las cavidades de la placa y la reacción se inició con la adición de ATP (100  $\mu\text{M}$ ) seguida de una incubación de 10 min a 30°C. La reacción se detuvo mediante la adición de 20  $\mu\text{L}$  de EDTA 100 mM. Las mezclas de reacción se transfirieron entonces a una placa Greiner usando un automatizador Biomek NX (Beckman) y se agregaron 60  $\mu\text{L}$  de reactivo fluorescente Picogreen® (diluido 1/800 en buffer según instrucciones del fabricante) por cavidad. La placa se incubó 5 min en oscuridad a temperatura ambiente y la señal de fluorescencia se leyó a 480 nm (excitación) y 530 nm (emisión) usando un lector de placas TecanSafire2.

El control positivo consistió en una mezcla de reacción conteniendo DMSO 5% en lugar del compuesto en estudio mientras que en el control negativo el compuesto fue reemplazado por EDTA 100 mM.

### **Actividad de metiltransferasa (MTasa) de NS5**

La actividad de MTasa de la proteína NS5 de DENV-3 se analizó de acuerdo al ensayo previamente descrito por Barral y col. (2013). La secuencia codificante del dominio N-terminal de la proteína NS5 de DENV-3 correspondiente a la actividad de MTasa (residuos 1-277) fue clonado en un vector de expresión pMcox20A (Gateway) río abajo de una etiqueta de hexa-histidina clivable. La proteína fue expresada en *Escherichia coli* y posteriormente purificada.

Los ensayos se llevaron a cabo en la mezcla de reacción (Tris-HCl 40 mM (pH 8,0), DTT 1 mM, S-adenosilmetionina (SAM) 1,9  $\mu\text{M}$  y  $^3\text{H}$ -SAM 0,1  $\mu\text{M}$  (Perkin Elmer) en presencia de 0,7  $\mu\text{M}$  de ARN sintético GpppAC<sub>4</sub>. La enzima DENV-MTasa purificada (750 nM) se mezcló primero con los potenciales inhibidores antes de la adición del ARN sustrato y de SAM y luego la mezcla de reacción se incubó a 30°C. La concentración final de DMSO fue del 5%, y las reacciones control se realizaron en presencia de DMSO al 5%. La reacción se detuvo al cabo de 10 min añadiendo 40  $\mu\text{L}$  de S-adenosilcisteína (SAH) 100  $\mu\text{M}$  y 200  $\mu\text{L}$  de agua. Las muestras se transfirieron a filtros de dietilaminoetilcelulosa (DEAE) (Perkin Elmer) y el  $^3\text{H}$  de SAM no incorporado se eliminó del filtro mediante lavado con formiato de amonio 0,01 M (pH=8,0), agua y luego etanol absoluto. Luego los filtros se secaron y se incubaron con fluido de centelleo BetaplateScint (Wallac) para así cuantificar el  $^3\text{H}$ , como medida de la

reacción de metilación del ARN sustrato, utilizando un contador de centelleo líquido Wallac 1450 MicroBetaTriLux.

### **Evaluación de la toxicidad de la anisomicina en ratones AG129**

Los estudios de toxicidad y actividad antiviral *in vivo* se realizaron en el LARC, USU, EEUU, bajo la supervisión del Dr. Justin Julander.

Se utilizaron ratones AG129 con un peso promedio de  $23,3 \pm 4,1$  g que fueron asignados al azar en 3 grupos de 3 animales cada uno y tratados por vía s.c. una vez por día con 0,1 mL conteniendo 2, 10 o 50 mg/kg/d de anisomicina durante 10 días. A otro grupo de 3 animales se le administró NaCl 0,9 % (placebo). Diariamente se registró el peso corporal y se procedió a observar a los animales a fin de detectar la aparición de signos de toxicidad.

### **Evaluación de la actividad antiviral de la anisomicina frente a ZIKV en ratones AG129**

Ratones AG129 con un peso promedio de  $23,6 \pm 3,1$  g se infectaron por vía s.c con 0,1 mL conteniendo 200 dosis infectivas cultivos celulares 50 (DICC<sub>50</sub>) y 4 h después de la infección se comenzó con el tratamiento con anisomicina. Grupos de 10 ratones fueron tratados por vía s.c. con 0,1 mL de tres dosis diferentes de anisomicina (4, 20 o 100 mg/kg/d) una vez por día durante 10 días. A otro grupo de 10 ratones se le administró NaCl 0,9 % en lugar del compuesto (placebo). Por otra parte, otro grupo de 4 ratones no infectados y tratados con 100 mg/kg/d de anisomicina una vez por día durante 10 días también fue incluido como control de toxicidad. Los ratones fueron observados dos veces por día registrándose la mortalidad y la aparición de signos de enfermedad incluyendo excitabilidad, tendido boca abajo, parálisis, encorvadura y conjuntivitis. A los 5 d.p.i. se tomaron muestras de sangre para determinar el valor de viremia. El peso de los animales se registró entre los 8 y 21 d.p.i. También se tomó nota del primer día en el cual se observó la aparición de algún signo de enfermedad.

Los ensayos *in vivo* se realizaron con la aprobación del Comité de Uso y Cuidado de Animales Institucionales de la Universidad Estatal de Utah. El trabajo se llevó a cabo en el Centro de Investigación de Animales de Laboratorio de la Universidad Estatal de Utah acreditado por la Asociación Internacional para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio (AAALAC).

### **Análisis estadístico**

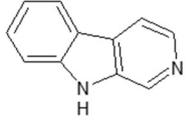
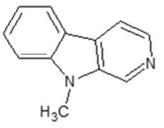
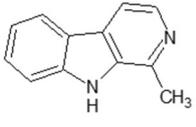
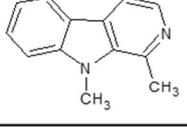
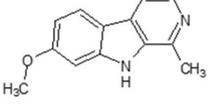
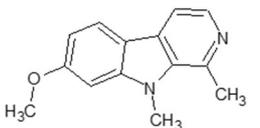
Para el análisis estadístico de los experimentos realizados *in vitro* se utilizó la prueba ANOVA seguida de un test de Dunnet o de Tukey. Para el análisis estadístico del porcentaje de supervivencia se empleó el test de Wilcoxon. En todos los casos se hizo uso del programa Prism 5, GraphPad Software, Inc.

***Capítulo 1: Evaluación y caracterización de la actividad antiviral in vitro de  $\beta$ -carbolicinas naturales y sintéticas frente a DENV***

## RESULTADOS

### *Efecto de $\beta$ -carbolinas naturales y sintéticas sobre la viabilidad celular y la multiplicación de DENV-2*

En primer lugar se evaluó el efecto citotóxico de las  $\beta$ -carbolinas naturales harmano, norharmano, harmina y harmol y de derivados sintéticos de las mismas en cultivos de células Vero. Con respecto a los compuestos obtenidos por síntesis química se ensayaron los derivados 9N-metilados de harmano, norharmano y harmina y una serie de ésteres de harmol de cadena alifática de 2, 3, 4, 5 y 6 carbonos (Tablas 1 y 2). Para ello, los cultivos de células Vero se incubaron con diluciones seriadas al medio de cada uno de los compuestos a ensayar durante 48 h y la viabilidad celular se cuantificó mediante el método de MTS, determinándose la concentración citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>). Por otra parte, se investigó la actividad antiviral de los diferentes compuestos frente a DENV-2 (cepa NGC) mediante un ensayo de inhibición del rendimiento viral realizado en células Vero (Tablas 1 y 2). Para ello, los cultivos se infectaron con una m.i. de 1 UFP/célula, luego de 1 h de adsorción a 37°C se trataron con diferentes concentraciones no citotóxicas de cada uno de los compuestos a evaluar y a las 48 h p.i. se cuantificó la producción de virus extracelular por el método de formación de placas. Finalmente, se determinó la concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) y se calculó el índice de selectividad (IS) como el cociente entre CC<sub>50</sub> y CE<sub>50</sub> (Tablas 1 y 2).

Compuesto	Formula Desarrollada	PM	CC <sub>50</sub> (μM)	CE <sub>50</sub> (μM)	IS
norharmano		168	99,9 ± 5,7	I	-
9N-metilnorharmano		182	> 153 <sup>a</sup>	I	-
harmano		182	68,7 ± 13,2	I	-
9N-metilharmano		196	247,9 ± 10,4	I	-
harmina		212	7,1 ± 0,4	I	-
9N-metilharmina		226	178,6 ± 11,5	3,2 ± 0,6	56,2 ± 14,2

**Tabla 1:** Efecto citotóxico y actividad antiviral frente a DENV-2 de las β-carbolinas naturales y sus derivados sintéticos 9N-metilados en células Vero. CC<sub>50</sub>: concentración citotóxica 50, CE<sub>50</sub>: concentración efectiva 50, IS: índice de selectividad, I: inactivo. Los datos se expresan como el promedio de tres determinaciones ± desvío estándar (DE). a: la máxima concentración de compuesto ensayada produjo un efecto citotóxico menor al 50%.

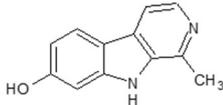
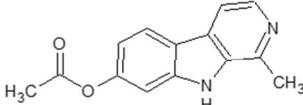
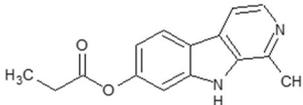
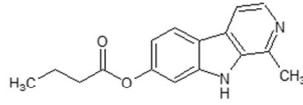
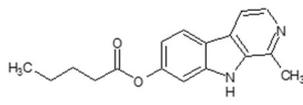
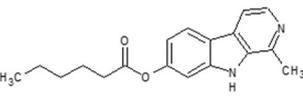
Compuesto	Formula desarrollada	PM	CC <sub>50</sub> (μM)	CE <sub>50</sub> (μM)	IS
harmol		198	203,3 ± 1,2	3,3 ± 0,4	61,3 ± 7,8
acetato de harmol		240	62,1 ± 6,4	I	-
propionato de harmol		254	62,1 ± 1,8	I	-
butirato de harmol		268	153,5 ± 12,2	39,2 ± 1,3	3,9 ± 0,4
valerato de harmol		282	580,9 ± 3,9	61,6 ± 1,5	9,4 ± 0,3
caprato de harmol		296	220,4 ± 5,5	87,6 ± 1,3	2,5 ± 0,1

Tabla 2: Efecto citotóxico y actividad antiviral frente a DENV-2 del harmol y de sus derivados sintéticos (ésteres alifáticos) en células Vero. CC<sub>50</sub>: concentración citotóxica 50, CE<sub>50</sub>: concentración efectiva 50, IS: índice de selectividad, I: inactivo. Los datos se expresan como el promedio de tres determinaciones ± DE.

De las β-carbolinas naturales ensayadas, el harmol fue el compuesto que exhibió el menor efecto citotóxico, mientras que el menor valor de CC<sub>50</sub> se obtuvo para la harmina indicando que la presencia del sustituyente metoxi (-OCH<sub>3</sub>) en C-7 resultó en una mayor citotoxicidad de este compuesto (Tabla 1). Es de destacar que la metilación del anillo pirrólico produjo derivados menos tóxicos que los compuestos de partida (Tabla 1). A su vez, se observó que la esterificación del grupo hidroxilo en los derivados de harmol produjo un aumento de la citotoxicidad de los compuestos con cadenas alifáticas cortas (C=1 o 2) pero la presencia de cadenas alifáticas de 4 o 5 C provocó un incremento de los valores de CC<sub>50</sub> dando como resultado compuestos con una actividad citotóxica similar o menor a la del harmol (Tabla 2).

De los compuestos naturales solo el harmol presentó actividad inhibitoria frente al virus con un IS de 61,3. Por el contrario, los ésteres de harmol ensayados presentaron escasa o nula capacidad inhibitoria (Tabla 2). A su vez, la 9N-metilharmina resultó ser el único derivado

metilado que provocó la inhibición dosis dependiente del rendimiento viral, exhibiendo un IS de 56,2 (Tabla 1).

Se decidió entonces continuar con el estudio del modo de acción antiviral de los compuestos harmol y 9N-metilharmina debido a que los mismos presentaron los mayores índices de selectividad frente a DENV-2.

### ***Actividad antiviral de la 9N-metilharmina y el harmol frente a los diferentes serotipos de DENV***

Teniendo en cuenta la actividad antiviral exhibida por la 9N-metilharmina y el harmol frente a DENV-2 se decidió evaluar el efecto de estos compuestos sobre la multiplicación de los otros serotipos de DENV, para lo cual se realizó un ensayo de inhibición del rendimiento viral en células Vero infectadas con cada uno de los serotipos virales, DENV-1 (cepa Hawaii), DENV-3 (cepa H87) y DENV-4 (cepa 8124), a una m.i. de 1 UFP/ célula.

Se comprobó que si bien tanto la 9N-metilharmina como el harmol presentaron actividad antiviral frente a los 4 serotipos de DENV ensayados (Tabla 3), DENV-2 resultó ser el serotipo más susceptible a ambos compuestos.

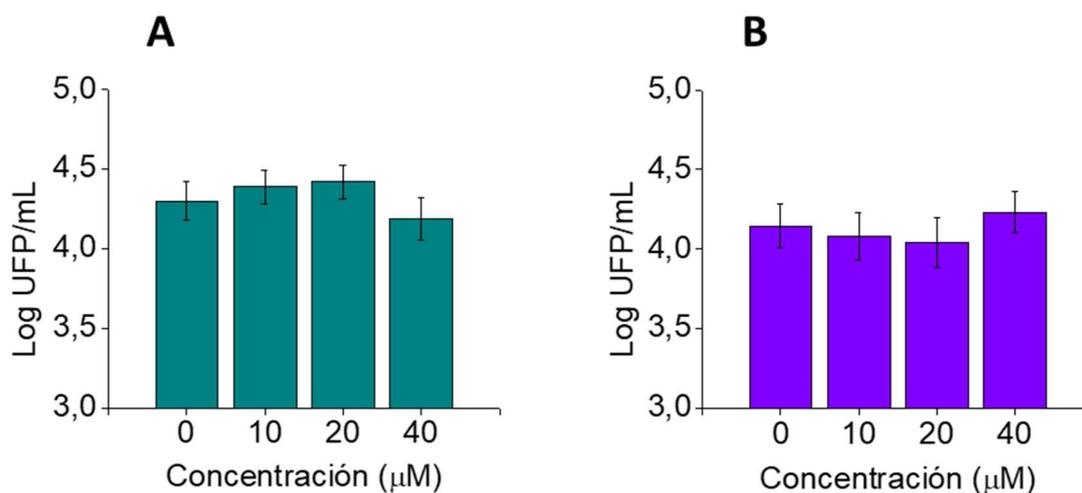
<b>Compuesto</b>	<b>CE<sub>50</sub> (μM)</b>		
	<b>DENV-1</b>	<b>DENV-3</b>	<b>DENV-4</b>
<b>9N-metilharmina</b>	49,5 ± 2,5	33,7 ± 1,3	16,3 ± 1,2
<b>harmol</b>	10,1 ± 1,1	7,7 ± 1,1	21,1 ± 1,5

**Tabla 3:** *Actividad antiviral de la 9N-metilharmina y del harmol frente a los diferentes serotipos de DENV en células Vero. CE<sub>50</sub>: concentración efectiva 50. Los datos se expresan como el promedio de tres determinaciones ± DE.*

### ***Evaluación del efecto inactivante de las β-carbolinas activas***

A fin de determinar si los compuestos activos presentaban actividad virucida, alícuotas del stock de DENV-2 se incubaron con diferentes concentraciones de harmol o 9N-metilharmina durante 2 h a 37°C y luego se determinó la infectividad remanente mediante un ensayo de formación de placas. Como se observa en la Figura 1 ninguno de los dos compuestos produjo

la inactivación directa de las partículas virales dado que los títulos de las suspensiones virales incubadas con las diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos no presentaron diferencias significativas respecto al control sin tratar.



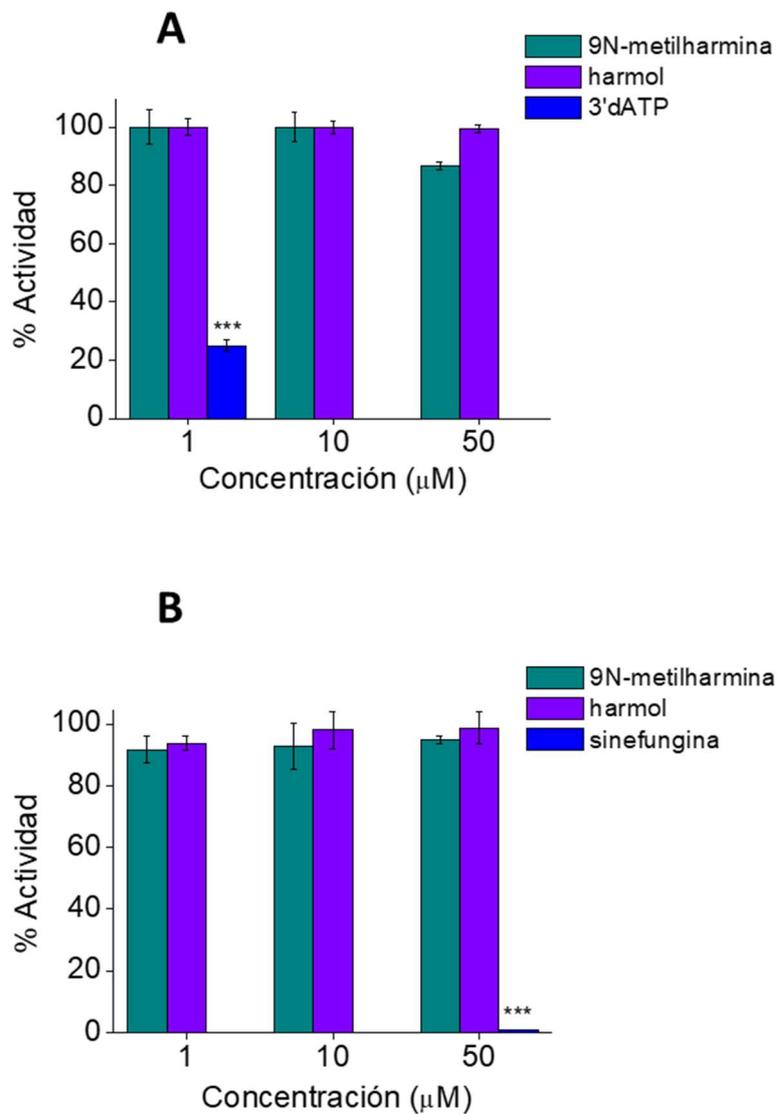
**Figura 1:** Evaluación de la actividad virucida de la 9N-metilharmina y el harmol. Aliquotas de la suspensión de DENV-2 se incubaron con diferentes concentraciones de 9N-metilharmina (A) o harmol (B) durante 2h a 37°C. La infectividad remanente se determinó por un ensayo de formación de placas. Los resultados se expresan como el valor promedio del título viral obtenido a partir de tres determinaciones  $\pm$  DE. Para todas las concentraciones de compuesto ensayadas los títulos virales de las muestras tratadas no resultaron significativamente diferentes respecto al título viral obtenido en el control sin droga según test de Dunnett.

### **Efecto de la 9N-metilharmina y del harmol sobre las actividades de RdRp y 2'O-MTasa de la proteína NS5 de DENV**

Teniendo en cuenta que en un reporte previo se había propuesto que la actividad antiviral de algunas  $\gamma$ -carbolicinas, compuestos estructuralmente relacionados con las  $\beta$ -carbolicinas, podía deberse a su efecto inhibitorio sobre la actividad RdRp de la proteína NS5 de BVDV, otro miembro de la familia *Flaviviridae* (Salim y col., 2010), se procedió a analizar el efecto de las  $\beta$ -carbolicinas activas sobre las actividades de RdRp y de 2'O-MTasa de NS5 de DENV mediante ensayos enzimáticos realizados *in vitro*.

Para determinar la actividad de polimerasa de NS5 se utilizó el dominio RdRp recombinante funcionalmente activo de NS5 de DENV-2 obtenido por expresión en *Escherichia coli*

(Selisko y col., 2006) y el ensayo se realizó en presencia de ATP, utilizando como molde un templado de poli-rU y un agente fluorescente intercalante, Picogreen®, que permite detectar la formación de ARN doble cadena (Benmansour y col., 2016). Por otra parte, para determinar la actividad de 2'O-MTasa de NS5 se empleó el dominio MTasa recombinante funcionalmente activo de DENV-3 obtenido por expresión en *Escherichia coli* (Barral y col., 2013) y se realizó un ensayo *in vitro* que consiste en la cuantificación de la incorporación de metilo marcado con <sup>3</sup>H utilizando un ARN sintético (GpppAC<sub>4</sub>) como templado y <sup>3</sup>H-SAM como donante de metilo.



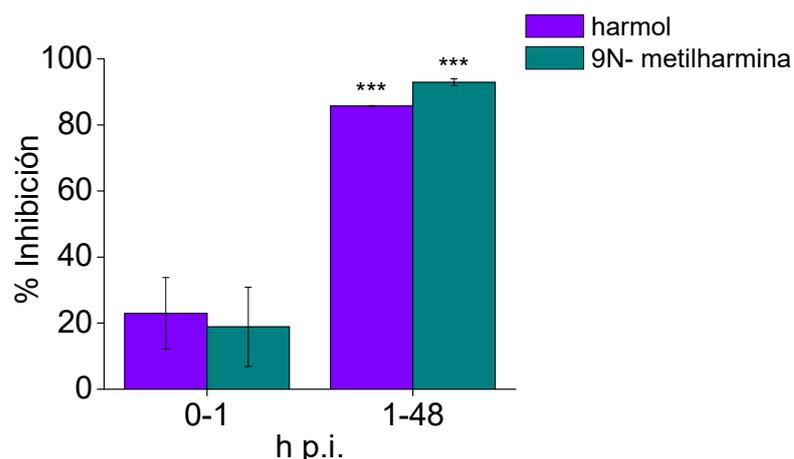
**Figura 2:** Efecto de la 9N-metilharmina y el harmol sobre la actividad de RdRp de NS5 de DENV-2 (A) y 2'O-MTasa de NS5 de DENV-3 (B). 3'dATP (1 μM) se utilizó como inhibidor de referencia de la actividad RdRp y la sinefungina se utilizó como inhibidor de referencia de la actividad de MTasa. Los porcentajes de actividad

enzimática con respecto al control sin droga graficados corresponden al promedio de tres determinaciones  $\pm$  DE. Test de Dunnett \*\*\* $p < 0,001$ . El porcentaje de actividad enzimática en presencia de sinefugina (50  $\mu$ M) fue de  $0,7 \pm 0,2$  %.

Como se muestra en la Figura 2, a diferencia de lo observado con los inhibidores de referencia, las  $\beta$ -carbolinas no afectaron ninguna de las dos actividades enzimáticas de NS5 evaluadas.

### ***Efecto de las $\beta$ -carbolinas activas en las etapas iniciales de la infección***

Con el objeto de analizar el efecto de las  $\beta$ -carbolinas activas en las etapas tempranas de la multiplicación viral, adsorción e internalización, las células Vero se infectaron con DENV-2 (m.i.=1) en presencia de 9N-metilharmina o harmol (40  $\mu$ M) durante 1 h a 37°C. Luego se descartó el inóculo viral, las células se lavaron y se incubaron con MM sin compuesto hasta las 48 h p.i. Otro grupo de cultivos se infectaron en ausencia de compuesto durante 1 h a 37°C y luego se descartó el inóculo viral y se agregó MM conteniendo 9N-metilharmina o harmol (40  $\mu$ M). En todos los casos los cultivos se incubaron a 37°C y a las 48 h p.i. se tituló el virus presente en el sobrenadante de los cultivos por el método de formación de placas. Como se muestra en la Figura 3, la presencia de 9N-metilharmina o harmol durante la primera hora de la infección no provocó cambios en la multiplicación viral con respecto al control sin tratar, indicando que los compuestos no afectarían los procesos de adsorción e internalización viral.

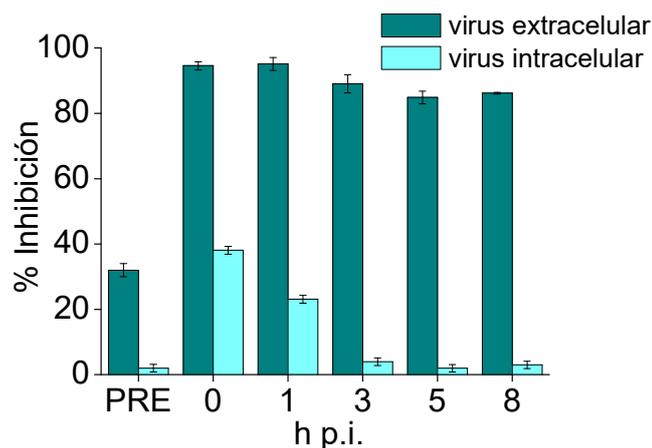


**Figura 3: Efecto de la 9N-metilharmina y el harmol sobre las etapas iniciales de la infección.** Células Vero infectadas con DENV-2 (m.i.=1) se trataron con 9N-metilharmina o harmol (40  $\mu$ M) durante la primera hora de la infección o a partir de 1 h p.i. hasta las 48 h p.i. El virus liberado al sobrenadante se tituló por el método de formación de placas. Los resultados se expresan como el porcentaje de inhibición del rendimiento viral respecto al control sin droga. Los datos representan un promedio de tres determinaciones  $\pm$  DE. Test de Dunnett \*\*\*  $p < 0,001$ .

### **Efecto del tiempo de agregado de 9N-metilharmina sobre la multiplicación viral**

Con el propósito de investigar con mayor profundidad cuál era el modo de acción antiviral de las  $\beta$ -carbolicinas se decidió continuar los estudios con uno sólo de los compuestos, la 9N-metilharmina ya que tanto este compuesto como el harmol exhibían una eficacia y una selectividad antiviral similar frente a DENV-2 tal como lo indican los valores de  $CE_{50}$  e IS obtenidos (Tablas 1 y 2).

A fin de ubicar temporalmente el efecto inhibitorio de la 9N-metilharmina, cultivos de células Vero se pre-trataron con 9N-metilharmina durante 1 h y posteriormente se infectaron con DENV-2 (m.i.=1). Transcurrida 1 h de infección se agregó medio de cultivo sin compuesto y se mantuvo hasta las 48 h p.i. Paralelamente, se infectaron células Vero, sin tratamiento previo, con DENV-2 (m.i.=1) y el compuesto se agregó a distintos tiempos p.i. y se mantuvo hasta las 48 h p.i. Finalmente se cuantificó el virus extracelular e intracelular por el método de formación de placas.



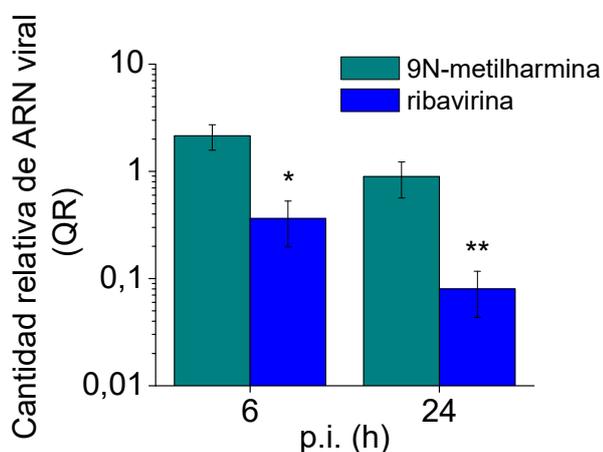
**Figura 4:** Efecto del tiempo de agregado de 9N-metilharmina sobre la producción viral. Se realizó un pre-tratamiento de las células Vero con 9N-metilharmina (40  $\mu$ M) 1 h antes de infectar (Pre) o las células se infectaron con DENV-2 (m.i.=1) y el compuesto se agregó a distintos tiempos p.i. (0, 1, 3, 5, 8 h p.i.). A las 48 h p.i. se cuantificó el virus extracelular a partir de los sobrenadantes de los cultivos y las células se sometieron a 2 ciclos de congelamiento y descongelamiento a fin de titular el virus intracelular. Los resultados se expresan como el porcentaje de inhibición del rendimiento viral respecto al control sin droga. Los datos representan un promedio de tres determinaciones  $\pm$  DE.

Como se muestra en la Figura 4, el pre-tratamiento de las células con el compuesto produjo una muy leve disminución en el título de virus extracelular sin afectar la producción de virus intracelular. En el caso de aquellos cultivos en los cuales el compuesto se agregó a distintos tiempos p.i., la 9N-metilharmina agregada junto con el inóculo viral (tiempo 0) o a 1 h p.i. produjo una escasa inhibición del título de virus intracelular y no tuvo efecto inhibitorio sobre el mismo cuando el compuesto se agregó más tardíamente. Por el contrario, el virus extracelular disminuyó en aproximadamente un 90 % con respecto al control aún en aquellos cultivos tratados con el compuesto a partir de las 8 h p.i.

#### ***Efecto de la 9N-metilharmina sobre la síntesis de ARN viral***

Dado que el tratamiento con 9N-metilharmina produjo una escasa inhibición de la formación de virus intracelular se decidió corroborar estos resultados examinando el efecto del compuesto sobre la síntesis de ARN viral por la técnica de qRT-PCR. El ARN total se extrajo a las 6 h o a las 24 h p.i. y se procedió luego a la síntesis de ADN copia y su amplificación por PCR. Se utilizó el compuesto ribavirina como compuesto de referencia a fines

comparativos ya que es un análogo de nucleósido que inhibe la síntesis de ARN viral (Takhampunya y col., 2006). Para cada muestra se calculó la cantidad relativa de ARN viral respecto al control sin droga (QR) (ver Materiales y métodos).



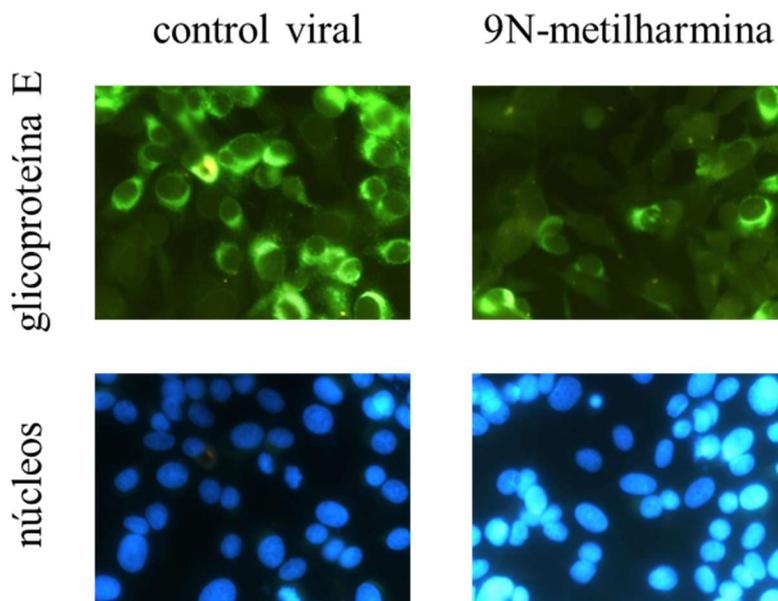
**Figura 5:** Efecto de la 9N-metilharmina sobre la síntesis de ARN viral. Cuantificación mediante qRT-PCR del ARN viral a las 6 o 24 h p.i. a partir de cultivos de células Vero infectados con DENV-2 ( $m.i. = 1$ ) en ausencia o presencia de 9N-metilharmina ( $40 \mu M$ ) o ribavirina ( $80 \mu M$ ). Los valores de QR representan el promedio de tres determinaciones  $\pm$  DE. Test de Dunnett \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$ .

La presencia de 9N-metilharmina no redujo la cantidad de ARN viral detectada a las 6 o a las 24 h p.i. en las células infectadas con respecto a los cultivos control (Figura 5). Por el contrario, el tratamiento con ribavirina provocó una disminución significativa de la síntesis de ARN viral en los dos tiempos p.i. analizados.

### ***Efecto de la 9N-metilharmina sobre la propagación de la infección***

A fin de corroborar la capacidad de la 9N-metilharmina de inhibir la propagación de la infección viral se estudió el efecto del compuesto sobre la expresión de la glicoproteína E de DENV-2 en células Vero infectadas y tratadas con 9N-metilharmina durante 48 h. Luego, las células se fijaron y se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido hacia la glicoproteína E como anticuerpo primario. El recuento de células fluorescentes a partir de 20 campos seleccionados al azar mostró una reducción significativa del  $80,0 \pm 0,6$  % del número de células infectadas con respecto al control sin droga ( $p < 0,001$ ) (Figura 6). Sin embargo, en las células que exhibieron

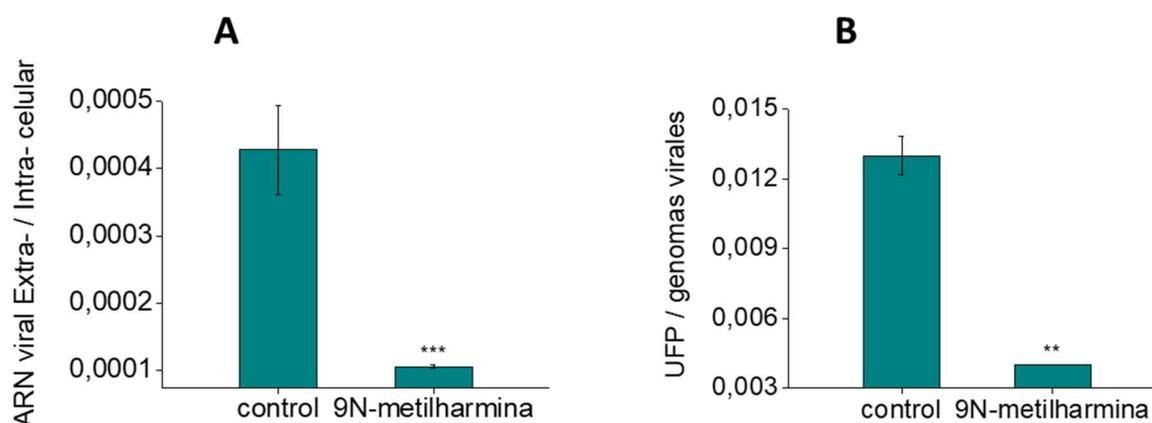
fluorescencia, el patrón de distribución intracelular de la glicoproteína viral fue similar en los cultivos tratados y no tratados con 9N-metilharmina.



**Figura 6:** *Expresión de la glicoproteína E de DENV-2 en células Vero tratadas con 9N-metilharmina (40  $\mu$ M). La expresión de la glicoproteína E se determinó por un ensayo de inmunofluorescencia indirecta y los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst. Aumento 400x.*

### ***Efecto de la 9N-metilharmina sobre la liberación de las partículas virales***

Con el fin de investigar si el compuesto 9N-metilharmina afectaba el egreso de las partículas virales de la célula hospedadora, se realizó una qRT-PCR para cuantificar el número de copias de genoma viral tanto en el medio intracelular como en el medio extracelular. Por otra parte, se cuantificó el número de partículas virales infecciosas presentes en el medio extracelular utilizando el método de formación de placas.

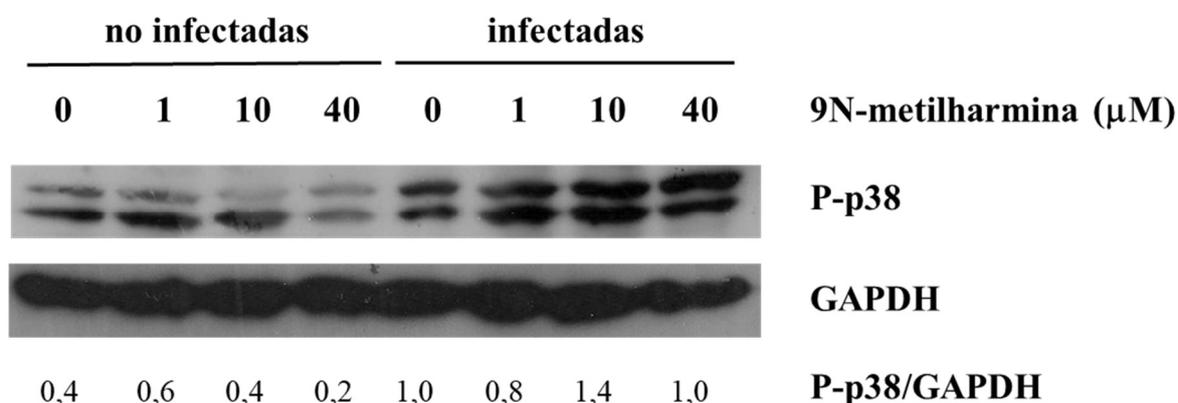


**Figura 7: Efecto de la 9N-metilharmina sobre el egreso de las partículas virales.** Células Vero infectadas con DENV-2 (*m.i.* = 1) se incubaron 1 h a 37°C y luego los cultivos se cubrieron con MM (control) o MM conteniendo 9N-metilharmina (40  $\mu$ M). A las 24 h p.i. las copias de genoma viral intracelulares y extracelulares se cuantificaron por qRT-PCR y las partículas virales infecciosas liberadas al medio extracelular se titularon por el método de formación de placas. (A) Los datos muestran la relación entre el ARN viral extracelular y el intracelular. (B) Los resultados representan la relación entre el número de partículas virales infecciosas presentes en el sobrenadante de los cultivos y el número de genomas virales presentes en dichos sobrenadantes. Los datos representados corresponden a los valores promedio de tres determinaciones  $\pm$  DE. Test de Dunnett \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ .

Si bien los niveles de ARN viral intracelular, en coincidencia con los resultados mostrados en la Figura 5, no se vieron afectados por el tratamiento con 9N-metilharmina, se observó una disminución en el número de copias de ARN viral en el medio extracelular. Por lo tanto, como se muestra en la Figura 7, el tratamiento con el compuesto provocó una reducción de 4 veces en la relación entre el número de copias de genoma viral extracelular e intracelular con respecto al control (Figura 7 A), lo cual sugiere que el compuesto afectaría la salida de las partículas virales al medio extracelular. Por otro lado, el compuesto también produjo una disminución de 3,6 veces en la relación entre partículas virales infecciosas y genomas virales en el medio extracelular respecto al control (Figura 7 B), indicando la presencia de una mayor proporción de partículas virales no infecciosas en el sobrenadante de los cultivos tratados con 9N-metilharmina respecto a los cultivos no tratados.

**Efecto de la 9N-metilharmina sobre la activación de la vía de señalización p38 MAPK**

Debido a que previamente se reportó que la  $\beta$ -carbolina harmina inhibe la vía de señalización p38 MAPK (Chen y col., 2015) y conociendo que en algunos tipos celulares se ha demostrado que la infección por DENV activa esta ruta de señalización celular (Ceballos-Olvera y col., 2010; Huerta-Zepeda y col., 2008; Nagila y col., 2013; Roth y col., 2017), decidimos examinar si la actividad antiviral de la 9N-metilharmina se relacionaba con un efecto modulador sobre la vía p38 MAPK. Para ello se realizó un ensayo de Western blot con el objeto de detectar el nivel de expresión de la proteína p38 fosforilada (P-p38) en células Vero, infectadas o no con DENV-2, y tratadas durante 24 h con diferentes concentraciones de 9N-metilharmina.



**Figura 8: Efecto de la 9N-metilharmina sobre la fosforilación de p38.** Células Vero no infectadas o infectadas con DENV-2 (*m.i.=1*) fueron tratadas con diferentes concentraciones de 9N-metilharmina. Luego de 24 h de tratamiento, las células se lisaron y se analizó la expresión de P-p38 por Western blot utilizando la expresión de GAPDH como control de carga. Los números indican la relación entre la intensidad de la banda correspondiente a P-p38 y la correspondiente a GAPDH y corresponden a un experimento representativo.

Como se observa en la Figura 8, en los cultivos sin tratar con 9N-metilharmina hay un aumento del nivel de fosforilación de p38 en las células infectadas con respecto a las células no infectadas lo cual indica, en concordancia con los trabajos previos realizados en otros sistemas celulares antes mencionados, que la infección con DENV induce la activación de esta vía de señalización celular. En los cultivos celulares no infectados el tratamiento con la máxima concentración de 9N-metilharmina ensayada (40  $\mu$ M) produjo una reducción del nivel basal de fosforilación de p38. Por el contrario, en el caso de las células infectadas los niveles de P-p38 en los cultivos tratados o no con 9N-metilharmina fueron similares tanto a

concentraciones que exhiben actividad antiviral (10 y 40  $\mu\text{M}$ ) como a una concentración sub-inhibitoria (1  $\mu\text{M}$ ).

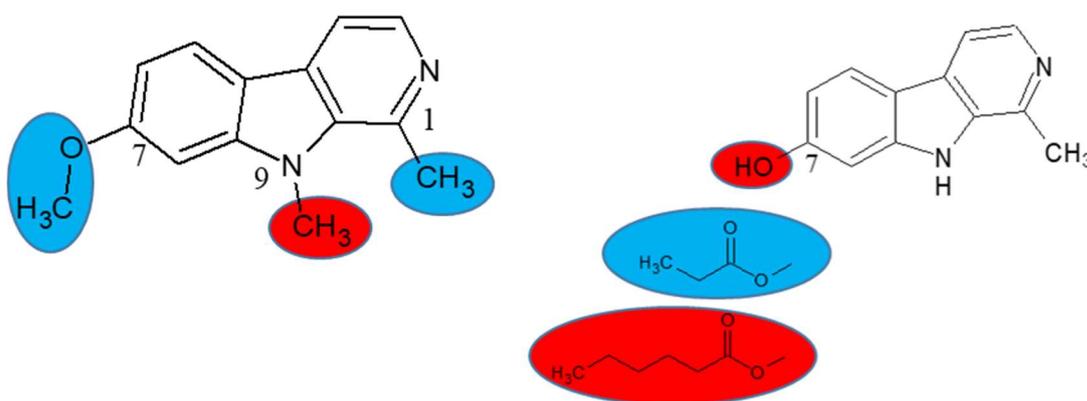
## DISCUSIÓN

El dengue es actualmente la enfermedad transmitida por artrópodos más frecuente en el mundo. Los cambios climáticos, la expansión geográfica del vector y el crecimiento de la urbanización son en gran parte responsables del dramático aumento de los casos de dengue en todo el mundo durante las últimas décadas. La vacuna disponible para DENV, aprobada en algunos países, logró reducir el número de hospitalizaciones, pero su eficacia promedio es baja y presenta riesgos para chicos menores de 9 años, parte importante de la población afectada, por lo cual su uso se recomienda solo en países con alto nivel de endemidad. La falta de eficiencia en el control del vector y la incertidumbre frente a la eficacia a largo término de la nueva vacuna frente a los cuatro serotipos virales, plantean la urgencia del desarrollo de terapias antivirales específicas frente a DENV. Actualmente no hay antivirales disponibles y muchos de los candidatos que alcanzaron los ensayos clínicos han fallado. Frente a esta situación, en este primer capítulo evaluamos un grupo de alcaloides, las  $\beta$ -carbolinas, compuestos que presentaban la capacidad de inhibir la multiplicación de otros virus, como posibles agentes antivirales frente a DENV.

Se evaluó la actividad antiviral de 4  $\beta$ -carbolinas naturales y 8 derivados sintéticos en células Vero frente a DENV-2. Con respecto a los 4 compuestos naturales se observó que la metilación en C1 (harmano) aumenta la citotoxicidad del compuesto con respecto a su análogo sin sustituir (norharmano), lo cual sugiere alguna influencia de la presencia del grupo metilo en la viabilidad celular. A su vez, si se suma un sustituyente metoxi en la posición C7 (harmina) se observa un aumento drástico de la citotoxicidad.

Ishida y col. (2001), describieron un efecto similar para el harmano y la harmina sobre la viabilidad de células linfocíticas H9. Un mayor efecto citotóxico de la harmina en comparación con otras  $\beta$ -carbolinas naturales también ha sido reportado en otras líneas celulares humanas como las células promielocíticas HL-60 y las células mieloides K562 (Jahaniani y col., 2005). Sin embargo, si el sustituyente en C7 es un grupo hidroxilo (harmol) se evidencia una considerable disminución de la citotoxicidad, siendo el harmol incluso menos tóxico que su análogo sin sustituyentes (norharmano), lo que podría sugerir que la posibilidad del compuesto de establecer interacciones del tipo puente de hidrógeno en esta posición podría disminuir su citotoxicidad. Esto también se aprecia en sus derivados esterificados de 2 o 3 C, donde la citotoxicidad aumenta, confirmando la relevancia del grupo hidroxilo en esa posición en relación al efecto citotóxico exhibido. Sin embargo, cuando los ésteres de harmol poseen

una cadena alifática más larga (valerato y caprato de harmol) se obtienen valores de  $CC_{50}$  incluso más altos que para el harmol. Estos resultados difieren de los obtenidos en las células linfocíticas H9, donde el harmol y el acetato de harmol mostraron valores de  $CC_{50}$  similares al exhibido por el harmano (Ishida y col., 2001).



**Figura a:** En azul se muestran los sustituyentes asociados a una mayor citotoxicidad de los compuestos y en rojo los sustituyentes que les confieren un menor efecto citotóxico.

Por otra parte, en los cultivos de células Vero utilizados en este trabajo los derivados 9N-metilados del norharmano, el harmano y la harmina resultaron menos citotóxicos que los compuestos de partida. Por el contrario, se ha descrito que tanto la harmina como la 9N-metilharmina exhibieron niveles de toxicidad similares en líneas celulares de origen humano como las células linfocíticas H9 y las células hepáticas HepG2 (Chen y col., 2005). El conjunto de estos resultados sugiere que el efecto citotóxico de este tipo de compuestos depende del tipo celular en estudio.

De las  $\beta$ -carbolinas ensayadas, 5 presentaron efecto inhibitorio frente a DENV-2, siendo el harmol el único de los compuestos naturales que resultó activo. Los ésteres de harmol de cadenas de 2 o 3 C no presentaron actividad antiviral mientras que los de cadenas más largas exhibieron un efecto inhibitorio muy débil. Por lo cual, la presencia del grupo hidroxilo en C7 redundaba en un menor efecto citotóxico y una mayor actividad antiviral. El derivado sintético 9N-metilharmina también presentó actividad antiviral frente a DENV-2, no así el compuesto de partida, la harmina, cuyo efecto inhibitorio sólo pudo ser evaluado a concentraciones menores a  $1\mu\text{M}$  debido a su alto grado de citotoxicidad. Por lo tanto, el harmol y la 9N-metilharmina fueron los compuestos que presentaron los mayores IS, 61,3 y 56,2,

respectivamente. Ambos compuestos también presentaron actividad antiviral frente a HIV-1 en células H9 aunque con valores de IS de 9,7 y 9,2 respectivamente (Ishida y col., 2001). En ese mismo trabajo se demostró que la presencia de cadenas alifáticas de mayor longitud en la posición 9N provocaba un incremento del efecto antiviral frente a HIV, por lo cual resultaría interesante evaluar la actividad de este tipo de derivados sintéticos frente a DENV. Por otra parte, en base a los resultados obtenidos sería importante la obtención y evaluación de la citotoxicidad y actividad antiviral del derivado 9N-metilharmol, el cual nos permitiría determinar si la presencia del grupo hidroxilo en C7 y del sustituyente metilo en la posición 9N le otorgan a la molécula una actividad antiviral mayor y más selectiva. La Dra. María Alejandra Ponce, quien tuvo a su cargo la síntesis de las  $\beta$ -carbolinas sintéticas, realizó algunos intentos de síntesis de este compuesto, pero hasta el momento no ha sido posible su obtención con un rendimiento apropiado para la realización de los ensayos biológicos.

Al evaluar los compuestos más activos frente a los otros serotipos de DENV se comprobó que, si bien tanto el harmol como la 9N-metilharmina presentaron actividad antiviral frente a DENV-1,-3 y -4, su eficacia fue menor que la determinada para DENV-2. Esta variación en la actividad antiviral frente a los diferentes serotipos virales ya ha sido descrita para diferentes agentes antivirales con variados mecanismos de acción, como por ejemplo para derivados de antibióticos (Rothan y col., 2014) y polisacáridos sulfatados (Talarico y col., 2007) que afectan la entrada de DENV a la célula o para compuestos que interfieren con la síntesis de ARN viral, tanto aquellos con un blanco de acción viral como algunos inhibidores de NS4B (Wang y col., 2015), como otros que poseen blancos de acción celulares tales como los inhibidores de la enzima inosina monofosfato deshidrogenasa (Sepúlveda y col., 2008). La susceptibilidad diferencial de los serotipos virales a esta amplia variedad de compuestos podría tener su origen en diferencias a nivel de la interacción de cada serotipo con factores celulares, sin embargo, no existen hasta el momento evidencias experimentales que permitan explicar estos resultados.

Ni el harmol ni la 9N-metilharmina mostraron actividad virucida por lo cual se descartó que estos compuestos actuaran como inactivantes de las partículas virales infecciosas. Asimismo, ninguno de los dos compuestos afectó la actividad enzimática de RdRp ni de MTasa de la proteína NS5 de DENV, por lo cual nuestros resultados no mostraron coincidencias con los reportados previamente para algunas  $\gamma$ -carbolinas sintéticas frente a BVDV, para las cuales se ha postulado a la enzima viral RdRd como blanco de su acción antiviral (Salim y col., 2010).

La presencia del harmol y de la 9N-metilharmina durante el periodo de adsorción y penetración del virus no afectó la multiplicación de DENV-2 por lo tanto, su efecto inhibitorio no estaría relacionado con el bloqueo de las etapas tempranas de la infección. Se ha descrito que algunas  $\beta$ -carbolicinas sintéticas que contienen un grupo carbohidrazida sustituido en el C-3 actuarían inhibiendo etapas iniciales de la infección por HSV-1 (Nazari Formagio y col., 2009). Sin embargo, en el mismo reporte se demuestra la actividad virucida de estos compuestos, por lo cual la inhibición del rendimiento viral que se observa cuando estos derivados están presentes junto con el inóculo viral podría deberse a su efecto inactivante sobre las partículas de HSV-1.

El pre-tratamiento de las células con 9N-metilharmina no alteró de manera relevante la producción de virus por lo cual este compuesto ejerce su actividad inhibitoria cuando está presente durante la multiplicación viral. Por otro lado, el agregado de 9N-metilharmina a tiempos tempranos p.i. provocó una escasa inhibición de la formación de virus intracelular con capacidad infecciosa y cuando el compuesto se agregó a partir de las 3 h p.i. no se observó inhibición de la producción de virus intracelular. Por el contrario, el agregado de compuesto hasta las 8 h p.i. provocó una reducción notoria del rendimiento de virus liberado al medio extracelular. Estos resultados indican que el compuesto estaría afectando fundamentalmente las etapas tardías del ciclo de multiplicación viral relacionadas con la salida del virus de la célula. Para corroborar esta hipótesis en primer lugar se realizó un ensayo de qRT-PCR para analizar el efecto de la 9N-metilharmina sobre la síntesis de ARN viral, una etapa previa a la salida del virus, determinándose que el compuesto no alteró el proceso de replicación del ARN viral. Para determinar si el compuesto afectaba el egreso de las partículas virales se llevó a cabo la cuantificación del ARN viral extracelular e intracelular luego de 24 h de tratamiento. Se observó que la 9N-metilharmina provocó una marcada disminución en la relación entre el número de copias de genoma viral en el medio extracelular y el número de copias de genoma viral intracelulares, lo cual es indicativo de un menor número de partículas virales en el sobrenadante de los cultivos tratados con la  $\beta$ -carbolicina respecto a los cultivos controles. Por otra parte, se investigó el efecto del compuesto sobre la propagación viral mediante el análisis de la expresión de la glicoproteína E a las 48 h p.i. utilizando un ensayo de inmunofluorescencia y se comprobó una marcada disminución del número de células que expresaban E en las muestras tratadas con respecto al control, corroborando que el compuesto afecta la propagación de la infección viral.

Si bien nuestros ensayos mostraron una disminución de la salida de partículas virales al medio extracelular, no se detectó una acumulación de partículas virales con capacidad infecciosa en el medio intracelular. Dicha acumulación ha sido descrita por ejemplo luego de la introducción de mutaciones puntuales en la secuencia de glicosilación N-154 de la glicoproteína E de WNV, las cuales afectan el egreso de las partículas virales (Yap y col., 2017). Por lo tanto, decidimos examinar si además de un efecto en la salida del virus, la 9N-metilharmina podía también estar afectando en forma parcial la maduración de las partículas de DENV-2. Para ello se analizó el efecto del compuesto sobre la infectividad específica determinándose que el tratamiento con 9N-metilharmina provocó una reducción en la relación entre partículas virales infecciosas y copias de genoma viral en el medio extracelular con respecto al control viral sin tratar. El conjunto de estos resultados indicaría que la 9N-metilharmina inhibe tanto la maduración como el egreso de las partículas virales.

La disminución en la infectividad específica de las partículas virales liberadas al medio extracelular también ha sido comprobada en ensayos con DENV en los cuales una región de 13 aminoácidos próxima al sitio de clivaje de prM de DENV-2 se reemplazó por las secuencias correspondientes a otros flavivirus. La gran proporción de partículas virales no infecciosas en el sobrenadante de los cultivos celulares infectados con estos virus quiméricos se ha asociado a una disminución en la eficiencia del clivaje de prM (Keelapang y col., 2004). A su vez, también se ha demostrado que el tratamiento con agentes lisosomotrópicos como la cloroquina provoca una reducción de la infectividad específica de DENV-2 relacionada con un menor grado de clivaje de la proteína prM (Randolph y col., 1990). Por lo tanto, un probable blanco de acción de la 9N-metilharmina durante el proceso de maduración viral podría ser el clivaje de prM por parte de la proteína celular furina.

Se sabe que la maduración y el egreso de las partículas de DENV requiere de la actividad de las  $\alpha$ -glucosidasas de RE, encargadas de las modificaciones post-traduccionales de las cadenas N-oligosacáridicas de la proteína E (Courageot y col., 2000; Yap y col., 2017). La cuantificación de partículas virales infecciosas y del ARN viral en el medio extracelular ha permitido demostrar que algunos inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas como la N-butil-1-desoxinojirimicina o el celgosivir bloquean la liberación de las partículas virales al medio extracelular y se ha propuesto que la alteración en el procesamiento de las cadenas de oligosacáridos provocaría fallas en el plegamiento de la glicoproteína E que impedirían el transporte del virus fuera de la célula (Sayce y col., 2016). Como se mencionó en la introducción, la glicoproteína E de DENV posee dos sitios de N-glicosilación: N67 (presente

sólo en DENV) y N153 (conservado en la familia *Flaviviridae*) localizados en el dominio II y I, respectivamente. Llamativamente DENV-2 presenta claras diferencias en la composición de las cadenas de oligosacáridos en ambos sitios de glicosilación respecto a los otros serotipos virales (Yap y col., 2017) y este hecho se relaciona con una susceptibilidad diferencial al celgosivir en determinadas líneas celulares como las células Huh7, Vero y THP-1; sin embargo, esto no ocurre en células BHK-21 (Watanabe y col., 2016). Por lo cual el análisis de la acción de este tipo de inhibidores se hace más complejo ya que la susceptibilidad a los mismos dependería no sólo del serotipo viral sino también del tipo celular en estudio. A su vez, el análisis mediante ensayos de inmunofluorescencia en células tratadas con celgosivir permitió detectar un bloqueo en el transporte de la glicoproteína E desde el RE al aparato de Golgi (Rathore y col., 2011). Por el contrario, el análisis del patrón de localización intracelular de la glicoproteína E en los cultivos tratados con 9N-metilharmina realizado en esta tesis no mostró alteraciones notorias respecto a lo observado en los cultivos sin compuesto. De todas formas, un análisis más detallado de la distribución intracelular de E mediante ensayos de co-localización de esta proteína con marcadores del RE y del aparato de Golgi permitiría descartar con mayor certeza algún efecto de la  $\beta$ -carbolina sobre el transporte intracelular de la glicoproteína viral.

Otros componentes celulares que estarían involucrados en la secreción de las partículas de DENV son los factores de ribosilación de ADP (Arf), pequeñas GTPasas involucradas en la regulación del tráfico intracelular de vesículas. Estos factores inducen la curvatura de las membranas, regulan el metabolismo de los fosfolípidos y modulan la estructura de los microfilamentos de actina (D'Souza-Schorey y col., 2006). Se ha descrito que el silenciamiento de los factores Arf4 y Arf5, involucrados en el transporte desde el RE al aparato de Golgi, o del factor Arf1, implicado en la formación de vesículas en el trans-Golgi, impide la liberación de las partículas virales a partir de la célula infectada sin afectar la expresión intracelular de la glicoproteína E (Kudelko y col., 2012; Wang y col., 2014). Por otra parte, se ha comprobado la interacción entre ARf 1 y la glicoproteína E de DENV (Karyala y col., 2016) por lo cual Arf1 intervendría en el transporte de las partículas de DENV ya maduras desde el aparato de Golgi hacia el espacio extracelular.

Asimismo, la salida de los viriones de DENV está asistida por las proteínas que componen el complejo exocítico, entre las cuales se encuentra la proteína Exo70. Se comprobó que el silenciamiento de Exo70 provoca la reducción del título de virus extracelular sin afectar la síntesis de ARN viral ni la producción de virus infeccioso intracelular a las 18 h p.i., pero sí

se observó una acumulación de partículas virales infecciosas intracelulares a mayores tiempos p.i. (Chen y col., 2011). También se ha reportado que los compuestos  $\beta$ - lactona y bortezomib, inhibidores del sistema ubiquitina-proteosoma (UBP), el principal sistema proteolítico en eucariotas, impedirían la salida de DENV de la célula (Choy y col. 2015). Es interesante resaltar que la infección con DENV induce la expresión tanto de Exo70 (Chen y col., 2011) como de componentes del sistema UBP (Kanlaya y col., 2010).

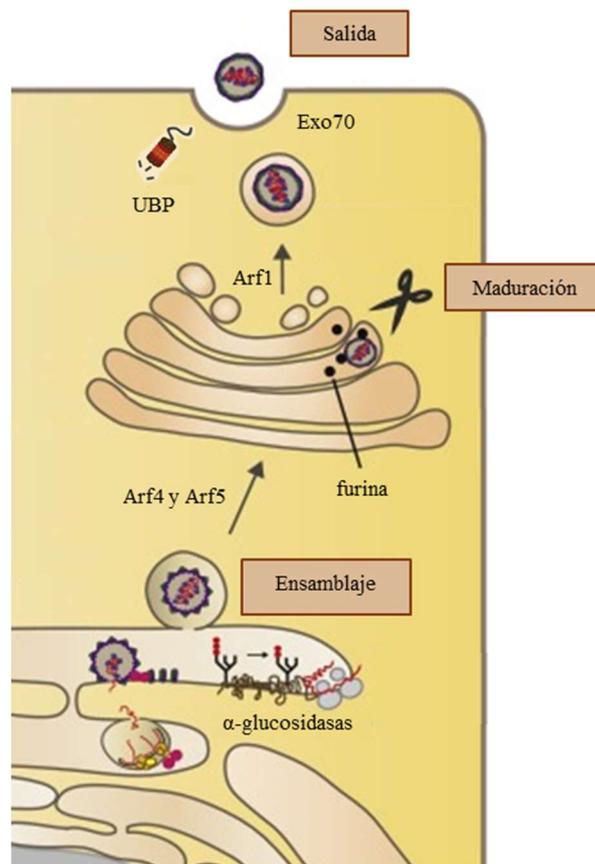


Figura b: Posibles blancos celulares de 9N-metilharmina

Los antecedentes expuestos y los resultados obtenidos sugieren que la 9N-metilharmina interfiere con la maduración y el egreso de las partículas de DENV probablemente afectando la funcionalidad de factores celulares involucrados en las últimas etapas del ciclo de multiplicación viral o la interacción de componentes virales con dichos factores.

Se ha descrito que la infección por DENV activa las vías ERK MAPK, p38 MAPK y JNK MAPK tanto en cultivos celulares como en modelos de infección *in vivo*. Sin embargo, los estudios *in vitro* han mostrado que la activación de estas vías es variable según el tipo celular estudiado. De forma similar, los inhibidores químicos específicos de estas cascadas de señalización han mostrado resultados contradictorios frente a la infección por DENV debido a que la actividad antiviral de estas moléculas también resulta altamente dependiente del tipo celular empleado (García y col., 2017).

Las vías de señalización dependientes de MAPKs también han sido propuestas como blanco de acción de las  $\beta$ -carbolinas. A diferencia de los resultados obtenidos en esta tesis, se ha comprobado que el tratamiento con harmina en células infectadas con HSV-2 provoca la reducción de la expresión de proteínas virales por lo cual, en este caso, la  $\beta$ -carbolina estaría inhibiendo etapas del ciclo viral de HSV previas a los procesos de maduración y egreso (Chen y col., 2015b). La actividad antiviral exhibida por la harmina frente a HSV-2 se relacionaría con su habilidad para inhibir la activación de las vías p38 MAPK y JNK MAPK (Chen y col., 2015b). Estos resultados también difieren de los obtenidos en este trabajo de tesis dado que el tratamiento con 9N-metilharmina no modificó los niveles de activación de p38 en las células infectadas con DENV-2. Recientemente, y en coincidencia con nuestros resultados, Jiang y col. (2017) han mostrado que no habría relación entre la actividad antiviral de la harmina frente a BoHV-1 y su efecto modulador sobre la vía p38 MAPK. Dada la influencia del tipo celular, los distintos sistemas celulares utilizados en estos trabajos podrían ser la causa de las diferencias encontradas entre las investigaciones, aunque no se pueden descartar otros factores como el tiempo de tratamiento o el tiempo p.i. en el cual se analiza la activación de las vías en estudio.

Las  $\beta$ -carbolinas son compuestos que presentan una gran variedad de actividades biológicas pero hasta el momento en que se comenzó este trabajo de tesis no existían reportes de la actividad antiviral de estas moléculas frente a DENV. Los resultados obtenidos han permitido hacer un primer análisis acerca de las características estructurales que serían relevantes para la actividad citotóxica y antiviral de estos compuestos y así poder encarar en una nueva etapa la obtención y evaluación de nuevos derivados de  $\beta$ -carbolinas con el objeto de lograr compuestos con una actividad más potente y selectiva, extendiendo además este análisis a otros flavivirus. Por otra parte, los estudios realizados indican que el compuesto 9N-metilharmina inhibe etapas tardías de la multiplicación de DENV. Estas etapas, sumamente complejas, involucran la participación de un gran número de factores celulares que podrían

ser blanco de la acción de este derivado, por lo cual se abre una gama interesante de posibilidades a investigar a fin de profundizar en el conocimiento del mecanismo de acción de este tipo de compuestos, los cuales constituyen un nuevo grupo de posibles candidatos en el desarrollo de antivirales frente a DENV.

**Capítulo 2: *Actividad antiviral de la anisomicina frente a DENV y ZIKV***

## RESULTADOS

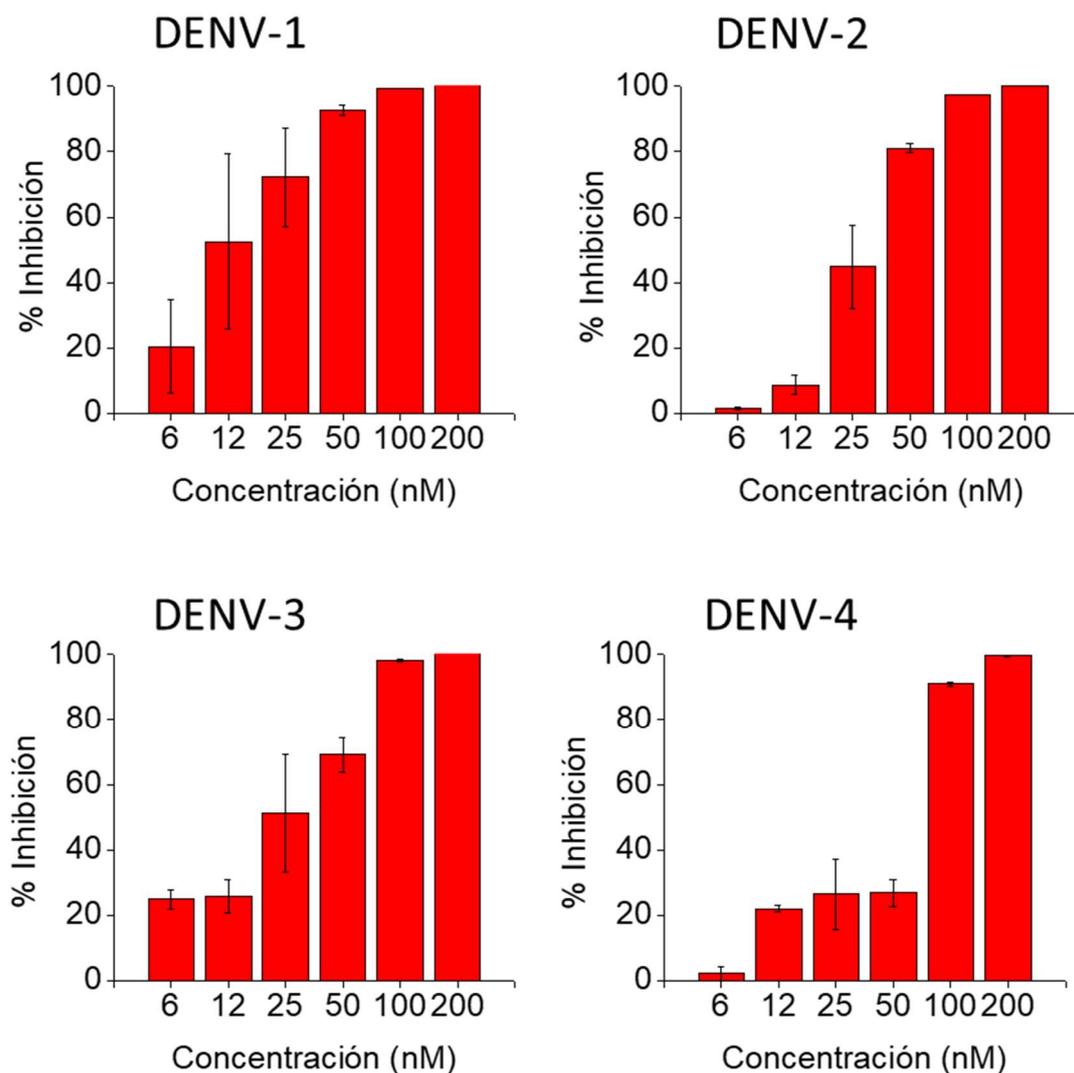
### Evaluación y caracterización de la actividad antiviral *in vitro* de la anisomicina frente a DENV

#### *Actividad antiviral de la anisomicina frente a los diferentes serotipos de DENV*

A fin de evaluar la capacidad de la anisomicina de inhibir la multiplicación de DENV se investigó su efecto citotóxico y su actividad antiviral en cultivos de células Vero. La citotoxicidad de la anisomicina se evaluó por el método de MTS, determinándose un valor de  $CC_{50}$  de  $5,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$  y su actividad antiviral se examinó mediante un ensayo de inhibición del rendimiento viral frente a los 4 serotipos de DENV: DENV-1(Hawái), DENV-2 (NGC), DENV-3 (H87) o DENV-4 (8124). Se determinó la  $CE_{50}$  y se calculó el IS como el cociente entre  $CC_{50}$  y  $CE_{50}$  (Tabla 4).

<b>Virus</b>	<b><math>CE_{50}</math> (nM)</b>	<b>IS</b>
<b>DENV-1</b>	$23,2 \pm 1,5$	$231,9 \pm 20,2$
<b>DENV-2</b>	$31,3 \pm 1,2$	$171,9 \pm 10,4$
<b>DENV-3</b>	$24,8 \pm 1,3$	$216,9 \pm 16,2$
<b>DENV-4</b>	$61,6 \pm 1,1$	$87,3 \pm 3,5$

**Tabla 4:** *Actividad antiviral de la anisomicina frente a los distintos serotipos de DENV en células Vero.  $CE_{50}$ : concentración efectiva 50. IS: índice de selectividad. Los datos representan el promedio de tres determinaciones  $\pm$  DE.*



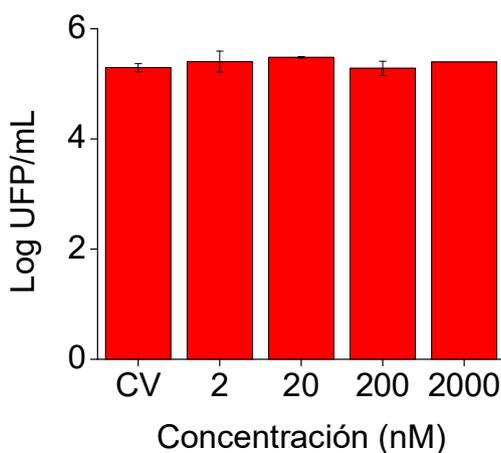
**Figura 9:** *Inhibición dosis dependiente de la multiplicación de los diferentes serotipos de DENV en cultivos celulares tratados con anisomicina.* Células Vero se infectaron con cada uno de los serotipos virales ( $m.i.=1$ ) y luego de 1 h de adsorción a 37°C los cultivos se trataron con diferentes concentraciones de anisomicina. A las 48 h p.i. se cuantificó el virus liberado al sobrenadante de los cultivos por el método de formación de placas. Los resultados se expresan como el porcentaje de inhibición del rendimiento viral respecto al control sin droga. Los datos representan el promedio de tres determinaciones  $\pm$  DE.

Como se muestra en la Tabla 4, la anisomicina presentó actividad antiviral frente a los 4 serotipos virales con valores de  $CE_{50}$  similares para los serotipos 1, 2 y 3, mientras que en los ensayos realizados con DENV-4 se observó un incremento de aproximadamente 2 veces del valor de  $CE_{50}$ , por lo cual el IS frente a este serotipo resultó menor. Para los cuatro serotipos virales la anisomicina produjo una clara inhibición dosis dependiente y la máxima

concentración no citotóxica de compuesto (200 nM) provocó una potente inhibición mayor al 99 % del rendimiento viral (Figura 9).

### ***Evaluación del efecto inactivante de la anisomicina frente a DENV-2***

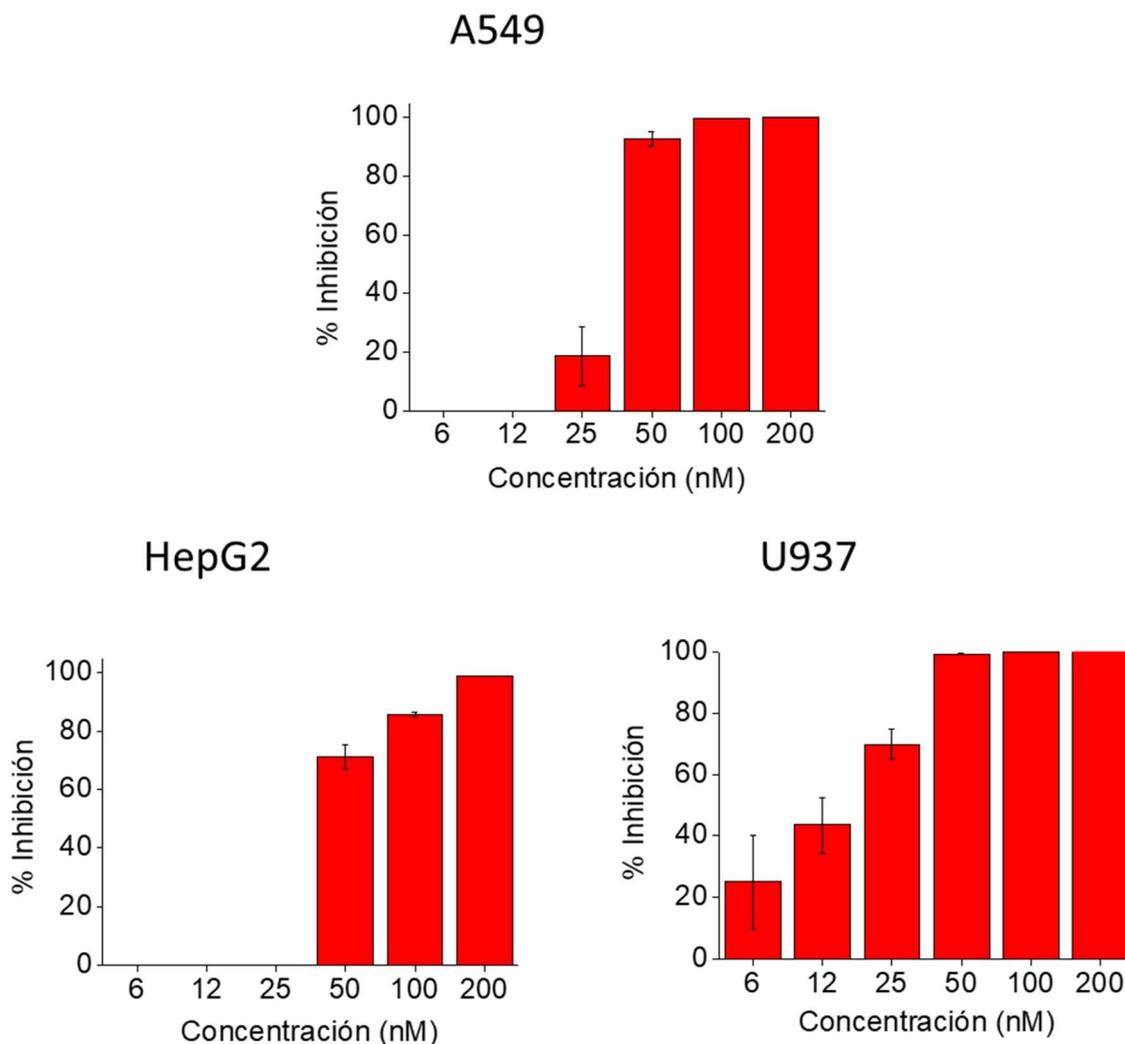
Con el propósito de determinar si la reducción de la infectividad viral en los cultivos infectados con DENV y tratados con anisomicina podía ser consecuencia de que este compuesto actuara como un agente virucida, inactivando en forma directa a la partícula viral, alícuotas de un stock de DENV-2 se incubaron en presencia de distintas concentraciones de anisomicina por 2 h a 37°C. La infectividad remanente se cuantificó por el método de formación de placas. El compuesto no presentó actividad virucida tanto a concentraciones no inhibitorias como a concentraciones inhibitorias o incluso citotóxicas como 2000 nM (Figura 10).



**Figura 10:** *Evaluación de la actividad virucida de la anisomicina.* Alícuotas de DENV-2 se incubaron con distintas concentraciones de anisomicina durante 2 h a 37°C y la infectividad remanente en las suspensiones virales se tituló por el método de formación de placas. Los datos representan el promedio de tres determinaciones  $\pm$  DE. Para todas las concentraciones de compuesto ensayadas los títulos virales de las muestras tratadas con anisomicina no resultaron significativamente diferentes respecto al título viral obtenido en el control sin droga según test de Dunnett.

***Actividad antiviral de la anisomicina frente a DENV-2 en líneas celulares humanas***

A fin de extender el estudio de la actividad antiviral del compuesto a otros tipos celulares se realizaron ensayos de rendimiento viral en distintas líneas celulares de origen humano como las líneas U937, HepG2 y A549. En todos los casos se realizó en primer lugar un ensayo de citotoxicidad por el método de MTS y luego un ensayo de inhibición del rendimiento viral infectando a las células con DENV-2 utilizando una m.i. de 1 UFP/célula, en el caso de las células A549 y HepG2, o de 10 UFP/célula para las células U937. Los cultivos se trataron con diferentes concentraciones no citotóxicas de anisomicina y a las 48 h p.i. se determinó el título de virus extracelular.



**Figura 51:** *Inhibición dosis dependiente de la multiplicación de DENV-2 en cultivos celulares de origen humano tratados con anisomicina. Los cultivos se infectaron con DENV-2 con una m.i. de 1 UFP/célula*

(células A549 y HepG2) o una m.i. de 10 UFP/célula (células U937) y luego de 1 h de adsorción a 37°C se trataron con diferentes concentraciones de anisomicina. A las 48 h p.i. se cuantificó el virus liberado al sobrenadante de los cultivos por el método de formación de placas. Los resultados se expresan como el porcentaje de inhibición del rendimiento viral respecto al control sin droga. Los datos representan el promedio de tres determinaciones  $\pm$  DE.

<b>Línea celular</b>	<b>CC<sub>50</sub> (nM)</b>	<b>CE<sub>50</sub> (nM)</b>	<b>IS</b>
<b>A549</b>	>94000	32,2 $\pm$ 1,1	>2919
<b>HepG2</b>	>94000	40,7 $\pm$ 1,1	>2310
<b>U937</b>	419,8 $\pm$ 1,1	13,2 $\pm$ 1,2	31,8 $\pm$ 0,2

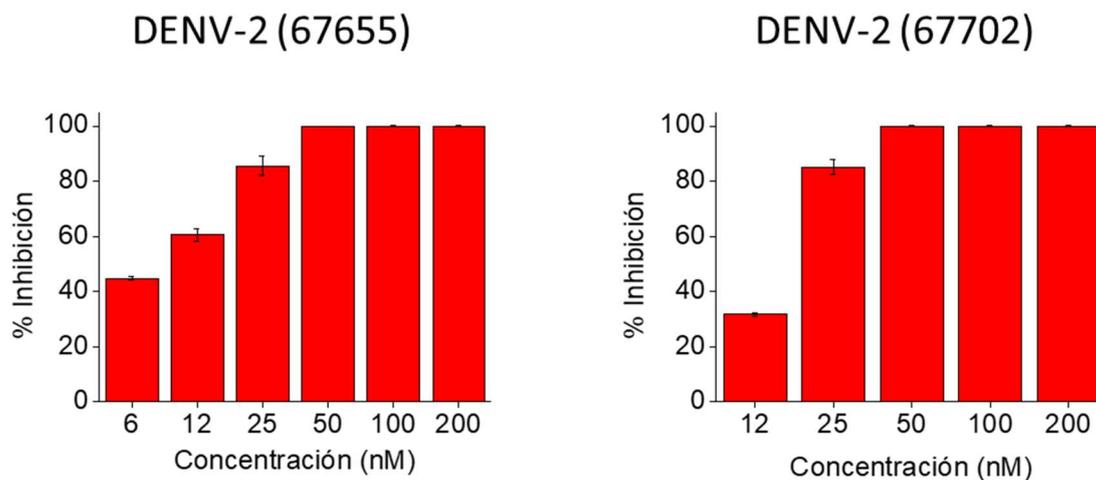
**Tabla 5:** Actividad antiviral de la anisomicina frente a DENV-2 en líneas celulares humanas. CC<sub>50</sub>: concentración citotóxica 50. CE<sub>50</sub>: concentración efectiva 50. IS: índice de selectividad. Los datos representan el promedio de tres determinaciones  $\pm$  DE.

Se observó que el índice de selectividad varía dependiendo de la línea celular utilizada. En el caso de las líneas celulares HepG2 y A549 (Tabla 5) se observan valores de IS más altos que para las células Vero (Tabla 4) debido a la escasa citotoxicidad exhibida por la anisomicina en esas dos líneas de origen humano. Por el contrario, en el caso de la línea celular U937 el compuesto exhibió un alto grado de citotoxicidad en comparación a las otras líneas celulares humanas (Tabla 5). Por lo tanto, si bien el valor de CE<sub>50</sub> en las células U937 fue bajo, el IS resultó menor que el obtenido con el resto de las líneas ensayadas. Por otra parte, en todas las líneas celulares, la máxima concentración de anisomicina ensayada en la evaluación de la actividad antiviral (200 nM) produjo una inhibición del rendimiento de DENV-2 mayor al 98 %.

### ***Efecto de la anisomicina sobre aislamientos clínicos de DENV-2***

Con el propósito de determinar la eficacia de la anisomicina frente a aislamientos clínicos de DENV se evaluó la actividad antiviral de este compuesto frente a dos aislamientos clínicos de DENV-2, identificados como DENV-2 67655 y DENV-2 67702. Para ello, las células Vero se infectaron con cada uno de los aislamientos virales (m.i.= 1) y luego de 1 h de adsorción a

37°C los cultivos se trataron con diferentes concentraciones de anisomicina y a las 48 h p.i. se cuantificó el rendimiento viral por el método de formación de placas.



**Figura 12:** Actividad antiviral de la anisomicina frente a aislamientos clínicos de *DENV-2*. Células Vero se infectaron con cada uno de los aislamientos clínicos de *DENV-2* (m.i.=1) y luego de 1 h de adsorción a 37°C los cultivos se trataron con diferentes concentraciones de anisomicina. A las 48 h p.i. se cuantificó el virus liberado al sobrenadante de los cultivos por el método de formación de placas. Los resultados se expresan como el porcentaje de inhibición del rendimiento viral respecto al control sin droga. Los datos representan el promedio de tres determinaciones  $\pm$  DE.

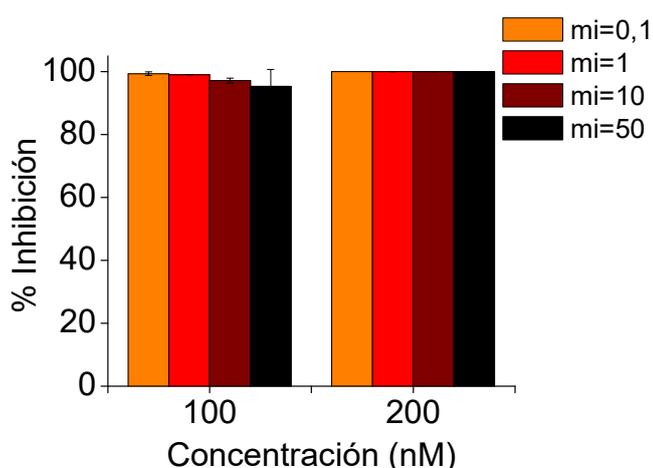
<b>DENV-2</b>	<b>CE<sub>50</sub> (nM)</b>	<b>IS</b>
<b>NGC</b>	31,3 $\pm$ 1,2	171,9 $\pm$ 10,4
<b>67655</b>	7,6 $\pm$ 1,1	707,9 $\pm$ 118,2
<b>67702</b>	15,0 $\pm$ 1,0	358,7 $\pm$ 31,9

**Tabla 6:** Efecto inhibitorio de la anisomicina frente a los aislamientos clínicos de *DENV-2* en células Vero. CE<sub>50</sub>: concentración efectiva 50. IS: índice de selectividad. Los datos representan el promedio de tres determinaciones  $\pm$  DE.

Tal como se muestra en la Figura 12 y en la Tabla 6 la anisomicina mostró una potente capacidad inhibitoria frente a los aislamientos clínicos de *DENV-2* incluso mayor a la obtenida frente a la cepa de referencia NGC.

### ***Influencia de la multiplicidad de infección en la actividad antiviral de la anisomicina***

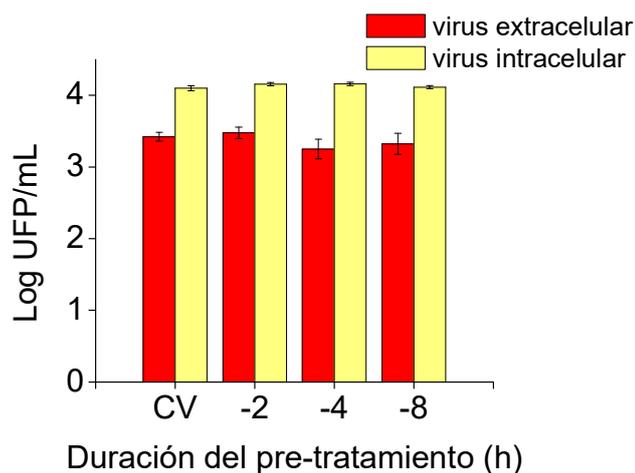
A fin de analizar la influencia de la m.i. en la actividad antiviral de la anisomicina se realizó un ensayo de inhibición del rendimiento viral en células Vero. Las células se infectaron con DENV-2 (NGC) con distintas m.i. y luego de 1 h a 37°C los cultivos se cubrieron con medio de cultivo conteniendo anisomicina. A las 48 h p.i., se cuantificó la infectividad viral a partir de los sobrenadantes del cultivo mediante un ensayo de formación de placas. Se observó que el efecto inhibitorio es independiente de la m.i. en el rango ensayado (0,1 a 50 UFP/célula) (Figura 13).



**Figura 13:** *Influencia de la multiplicidad de infección en la actividad antiviral de la anisomicina.* Células Vero se infectaron con DENV-2 a diferentes m.i. y se trataron con 100 o 200 nM de anisomicina. El título del virus extracelular obtenido a las 48 h p.i. se determinó por el método de formación de placas. Los resultados se expresan como el porcentaje de inhibición del rendimiento viral respecto al control sin droga. Los datos representan el promedio de tres determinaciones  $\pm$  DE. Las diferencias obtenidas entre las distintas m.i. para ambas concentraciones de compuesto no fueron significativas según Test de Tukey.

### ***Efecto del pre-tratamiento de las células con anisomicina sobre la multiplicación viral***

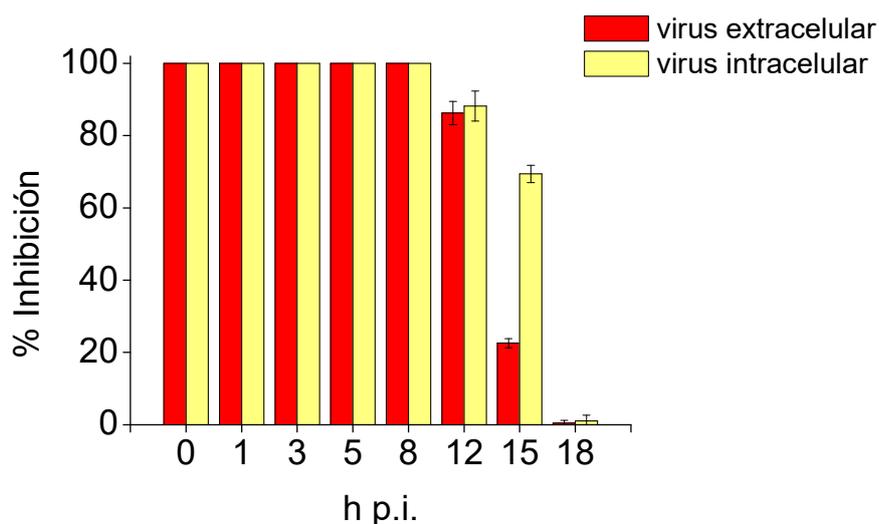
Con el objeto de comenzar a investigar el modo de acción antiviral de la anisomicina se decidió evaluar si el pre-tratamiento de los cultivos con anisomicina tenía algún efecto sobre la multiplicación de DENV-2. Para ello, cultivos de células Vero se trataron con anisomicina (200 nM) durante 2, 4 u 8 h en forma previa a la infección y luego se infectaron con DENV-2 (NGC) en ausencia de compuesto. A las 24 h p.i., se cuantificaron los títulos de virus extracelular y virus intracelular por el método de formación de placas. Como se observa en la Figura 14, el pre-tratamiento de hasta 8 h con anisomicina no afectó la multiplicación viral.



**Figura 14:** *Efecto del pre-tratamiento de las células con anisomicina sobre la producción viral.* Se realizó un pre-tratamiento de las células Vero con anisomicina (200 nM) durante 2, 4 u 8 h. Luego las células se infectaron con DENV-2 (m.i.=1) y a las 24 h p.i. se cuantificó el virus extracelular a partir de los sobrenadantes de los cultivos y las células se sometieron a 2 ciclos de congelamiento y descongelamiento a fin de titular el virus intracelular. Los títulos se determinaron por el método de formación de placas y los datos representan el promedio de tres determinaciones  $\pm$  DE. Las diferencias respecto al control sin droga (cv) no fueron significativas según test de Dunnett.

#### ***Efecto del tiempo de agregado de anisomicina sobre la producción viral***

A continuación, se realizó un ensayo de agregado de compuesto a diferentes tiempos a lo largo de la infección. Para ello, cultivos de células Vero se infectaron con DENV-2 (NGC) a una m.i. de 1 UFP/célula y a diferentes tiempos p.i. se agregó anisomicina (200 nM). A las 24 h p.i., los títulos de virus extracelular y virus intracelular se determinaron por el método de formación de placas.



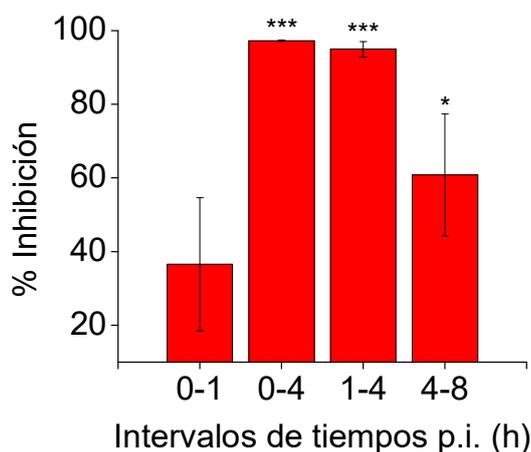
**Figura 15:** *Efecto del tiempo de agregado de anisomicina sobre la producción viral.* Células Vero se infectaron con DENV-2 ( $m.i.=1$ ) y la anisomicina se agregó a distintos tiempos p.i. A las 24 h p.i. se cuantificó el virus extracelular a partir de los sobrenadantes de los cultivos y las células se sometieron a 2 ciclos de congelamiento y descongelamiento a fin de titular el virus intracelular. Los títulos se determinaron por el método de formación de placas y los resultados se expresan como el porcentaje de inhibición del rendimiento viral respecto al control sin droga. Los datos representan el promedio de tres determinaciones  $\pm$  DE.

Se observó que el agregado de compuesto hasta las 8 h p.i. produjo una marcada inhibición tanto del virus extracelular como del virus intracelular (Figura 15). Cuando la anisomicina se agregó a partir de las 12 h p.i. se observó una reducción de los porcentajes de inhibición del rendimiento viral respecto a los tiempos tempranos de tratamiento y dicha reducción fue mayor cuanto más se retrasó el agregado de compuesto. Finalmente, cuando la anisomicina se agregó a las 18 h p.i. los títulos de virus intracelular y extracelular fueron semejantes a los del control sin compuesto. Estos resultados indican que la anisomicina estaría afectando la formación de partículas virales infecciosas y no parecería tener un efecto inhibitorio en las últimas etapas de la infección.

***Efecto del tratamiento con anisomicina durante diferentes intervalos de tiempo sobre la producción de virus infeccioso.***

Los resultados obtenidos hasta aquí indicaban que la presencia de la anisomicina dentro de las primeras 8 h de la infección era clave para que se evidenciara su habilidad de inhibir la replicación viral (Figura 15). Con el objetivo de determinar cuál era el intervalo de tiempo

dentro de las primeras 8 h de la infección en el cual la anisomicina ejercía su mayor poder inhibitorio, cultivos de células Vero se trataron con anisomicina durante diferentes intervalos de tiempo: 0- 1h p.i., 0- 4h p.i., 1-4h p.i. y 4- 8h p.i. En todos los casos, a las 24h p.i., se tituló el virus extracelular por el método de formación de placas. En la Figura 16 se muestra que la mayor inhibición de la producción de virus se observó cuando la anisomicina estuvo presente durante los intervalos de tiempo 0-4 h y 1- 4h p.i. Sin embargo, la presencia del compuesto durante la primera hora de la infección (0- 1 h p.i.) mostró solo una pequeña reducción no significativa de la infectividad viral. Por lo tanto, el intervalo de tiempo de tratamiento en el cual el compuesto mostró su mayor capacidad inhibitoria sería el comprendido entre 1 y 4 h p.i., y el mismo coincidiría con el comienzo de los procesos de desnudamiento del genoma y la síntesis de macromoléculas virales en la célula infectada.

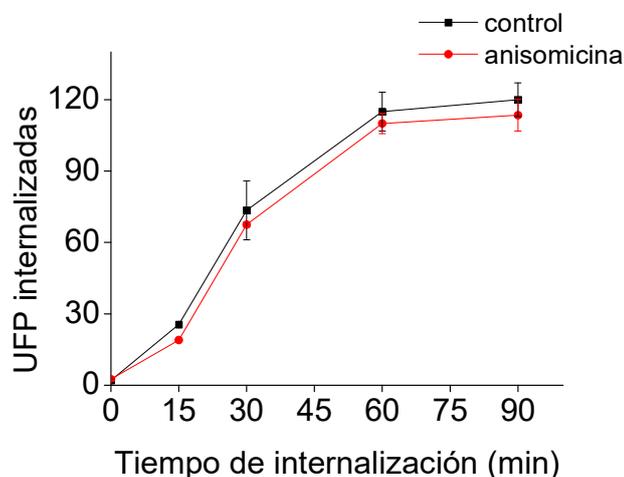


**Figura 16:** Efecto del tratamiento con anisomicina durante diferentes intervalos de tiempo sobre la producción de DENV-2. Células Vero se infectaron con DENV-2 ( $m.i.=1$ ) en presencia de anisomicina (200 nM) durante diferentes intervalos de tiempo a lo largo de la infección. A las 24 h p.i. se cuantificó el virus extracelular por el método de formación de placas. Los resultados se muestran como el porcentaje de inhibición del rendimiento viral respecto al control sin droga y los datos representan el promedio de tres determinaciones  $\pm$  DE. Test de Dunnett \*  $p<0,05$  y \*\*\*  $p<0,001$ .

### **Efecto de la anisomicina sobre las primeras etapas de la multiplicación viral**

A fin de corroborar que la anisomicina no afectaba las etapas tempranas de la multiplicación viral, se realizó en primer lugar un ensayo de internalización viral. Con este propósito, células Vero infectadas con aproximadamente 100 UFP de DENV-2 (NGC) se incubaron durante diferentes tiempos a 37°C en presencia o ausencia de compuesto y luego de inactivar las

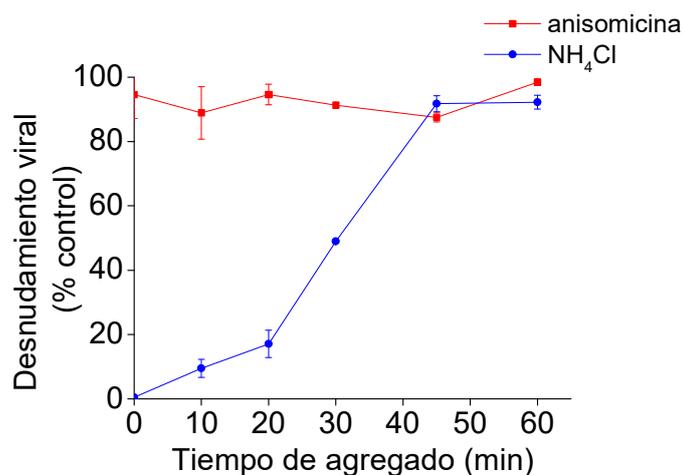
partículas virales no internalizadas con pH ácido se determinó el número de placas formadas en los cultivos controles y tratados.



**Figura 17:** Efecto de la anisomicina sobre la internalización de DENV-2. Células Vero se infectaron con aproximadamente 100 UFP de DENV-2 a 4°C por 1 h. Luego se descartó el inóculo y se agregó MM con anisomicina (200 nM) o sin compuesto (control). Los cultivos se incubaron a 37°C y a distintos tiempos se descartó el medio de cultivo y se agregó buffer citrato pH=3,0 para inactivar a las partículas virales adsorbidas pero no internalizadas. Luego de dos lavados, se agregó medio de plaqueo y el número de placas se determinó a los 6 días p.i. Los datos representan el promedio de tres determinaciones  $\pm$  DE.

La cinética de internalización en los cultivos tratados con anisomicina fue similar a la obtenida en los cultivos controles (Figura 17) lo cual indicaría que el efecto antiviral de la anisomicina frente a DENV-2 no estaría relacionado con la entrada del virus a la célula.

A continuación se analizó la cinética de desnudamiento viral en presencia o ausencia de anisomicina utilizando al compuesto  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como un inhibidor de referencia del desnudamiento viral, ya que este compuesto provoca el aumento del pH endosomal inhibiendo la fusión entre la envoltura viral y la membrana de la vesícula endocítica. Para ello, células Vero infectadas con aproximadamente 100 UFP de DENV-2 (NGC) a 4°C, se incubaron en medio de cultivo a 37°C y a diferentes tiempos p.i. se agregó anisomicina (concentración final 200 nM),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (concentración final 50 mM) o medio de cultivo (control). Los compuestos se mantuvieron durante 3 h y al cabo de ese tiempo el virus no internalizado se inactivó con pH ácido. Finalmente, los cultivos se cubrieron con medio de plaqueo y 6 días más tarde se cuantificaron las placas obtenidas.



**Figura 18:** Efecto de la anisomicina sobre el desnudamiento viral. Células Vero se infectaron con aproximadamente 100 UFP de DENV-2 a 4°C por 1 h. Luego se descartó el inóculo, los cultivos se cubrieron con MM y a diferentes tiempos se agregó NH<sub>4</sub>Cl (hasta concentración final 50 mM), anisomicina (hasta concentración final 200 nM) o MM (control). Los cultivos se incubaron durante 3 h a 37°C, luego se inactivó el virus no internalizado con buffer citrato, pH=3,0. Los cultivos se lavaron y se cubrieron con medio de plaqueo y se determinó el porcentaje de placas respecto al control para ambos tratamientos. Los datos representan el promedio de tres determinaciones  $\pm$  DE.

La máxima inhibición producida por el NH<sub>4</sub>Cl se observó cuando el mismo fue agregado a tiempos tempranos p.i. mientras que a los 45 min de incubación el agregado de este compuesto provocó menos de un 10 % de reducción en el número de placas indicando que a ese tiempo prácticamente el 90 % de las partículas internalizadas se habían desnudado. En el caso de la anisomicina no se observaron diferencias con respecto al control sin droga independientemente del tiempo de agregado (Figura 18), indicando que el efecto inhibitorio del compuesto no estaría relacionado con un bloqueo a nivel de la etapa de desnudamiento viral.

### ***Efecto de la anisomicina sobre la expresión de la glicoproteína viral E***

Teniendo en cuenta que la anisomicina podía estar afectando la síntesis de proteínas virales o de ARN viral se estudió en primer lugar el efecto del compuesto sobre la expresión de la glicoproteína E de DENV-2 (NGC) en células Vero. Para ello, las células se infectaron a una m.i. de 10 UFP/célula para lograr la infección de la mayoría de las células del cultivo y se

realizó el tratamiento con el compuesto durante 12, 15, 18 o 24 h. Las células se fijaron y se llevó a cabo una inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido hacia la glicoproteína E como anticuerpo primario. En la Figura 19 se observa que en el control sin anisomicina no fue posible observar células fluorescentes a las 12 h p.i. y recién se detectaron células con una fluorescencia tenue a partir de las 15 h p.i. La intensidad de la fluorescencia se incrementó a las 18 h p.i. siendo máxima a las 24 h p.i. Por lo tanto, en nuestras condiciones experimentales, no nos fue posible detectar la expresión de la glicoproteína E a tiempos menores a 15 h p.i. En los cultivos tratados con anisomicina no se observó fluorescencia en ninguno de los tiempos ensayados, indicando que el tratamiento con el compuesto provocó una potente inhibición de la expresión de la proteína viral.

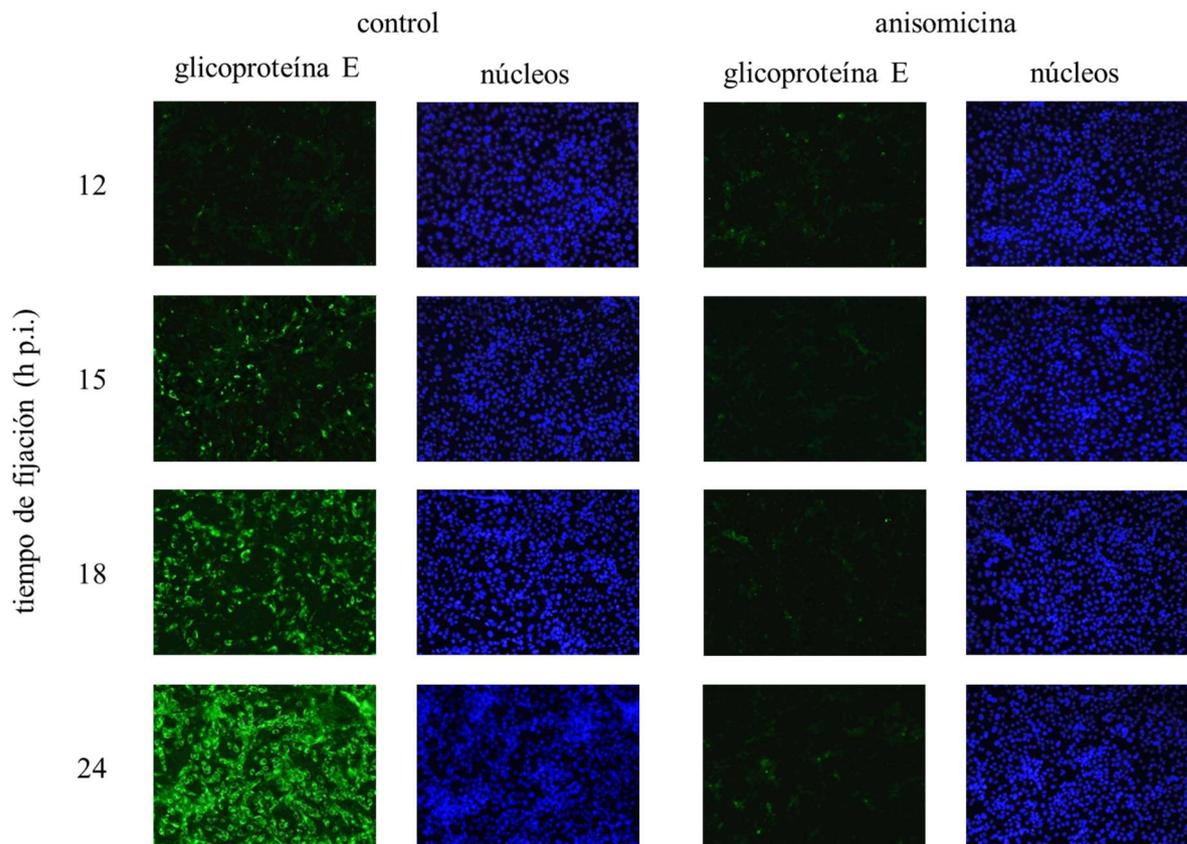
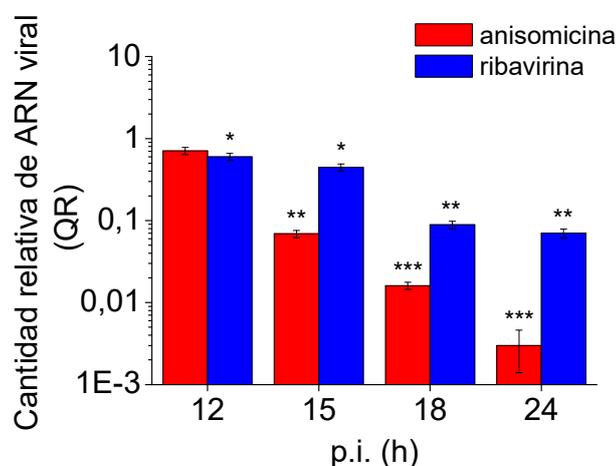


Figura 19: *Expresión de la glicoproteína E de DENV-2 en células Vero tratadas con anisomicina. Células Vero se infectaron con DENV-2 (m.i. = 10). Luego de 1 h de adsorción, se descartó el inóculo y los cultivos se incubaron con medio conteniendo o no anisomicina (200 nM) y se incubaron a 37°C. A diferentes tiempos p.i. se analizó la expresión de la glicoproteína E mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta. Aumento 100x. Control: cultivos infectados sin tratar.*

### *Efecto de la anisomicina sobre la síntesis de ARN viral*

Seguidamente se estudió el efecto de la anisomicina sobre la síntesis de ARN viral por la técnica de qRT-PCR. Las células se infectaron con DENV-2 (NGC) en condiciones similares al ensayo anteriormente descrito y se trataron con anisomicina (200 nM), ribavirina (80  $\mu$ M), o MM sin compuesto. A distintos tiempos p.i., se extrajo el ARN total y se procedió luego a la síntesis de ADN copia y amplificación por PCR. Se utilizó la ribavirina como inhibidor de referencia y para cada muestra se calculó el valor de QR.

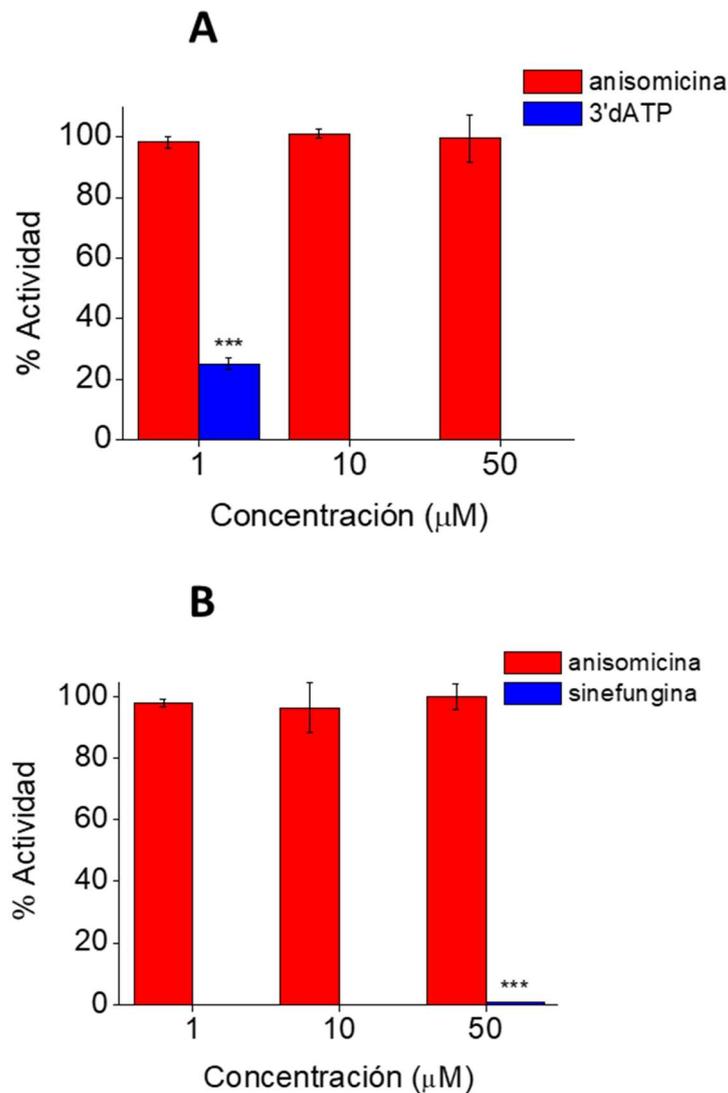


**Figura 20:** *Efecto de la anisomicina sobre la síntesis de ARN viral.* Cuantificación mediante qRT-PCR del ARN viral a diferentes tiempos p.i., a partir de cultivos infectados con DENV-2 (m.i.=10) en ausencia o presencia de anisomicina (200 nM) o ribavirina (80  $\mu$ M). Los valores de QR representan el promedio de tres determinaciones  $\pm$  DE. Test de Dunnett \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01; \*\*\* $p$ <0,001.

En la Figura 20 se observa que el valor del factor QR disminuyó en función del tiempo a lo largo de la infección, tanto en los cultivos tratados con anisomicina como en los tratados con ribavirina, alcanzándose a las 24 h p.i. un mayor grado de inhibición de la síntesis de ARN viral en el tratamiento con anisomicina en comparación con el tratamiento con la ribavirina. Estos resultados indican que la presencia de anisomicina provocó una fuerte inhibición de la síntesis de ARN viral.

**Efecto de la anisomicina sobre las actividades de RdRp y 2'O-MTasa de la proteína NS5 de DENV**

La potente acción inhibitoria de la anisomicina sobre la síntesis de ARN viral podía estar sugiriendo un efecto inhibitorio del compuesto sobre las actividades enzimáticas de la proteína viral NS5, por lo cual se analizó el efecto de la anisomicina sobre las actividades de RdRp y de 2'O-MTasa de esta proteína viral. Los resultados mostrados en la Figura 21 señalan que ninguna de las dos actividades enzimáticas de NS5 se vio afectada por el tratamiento con el compuesto.

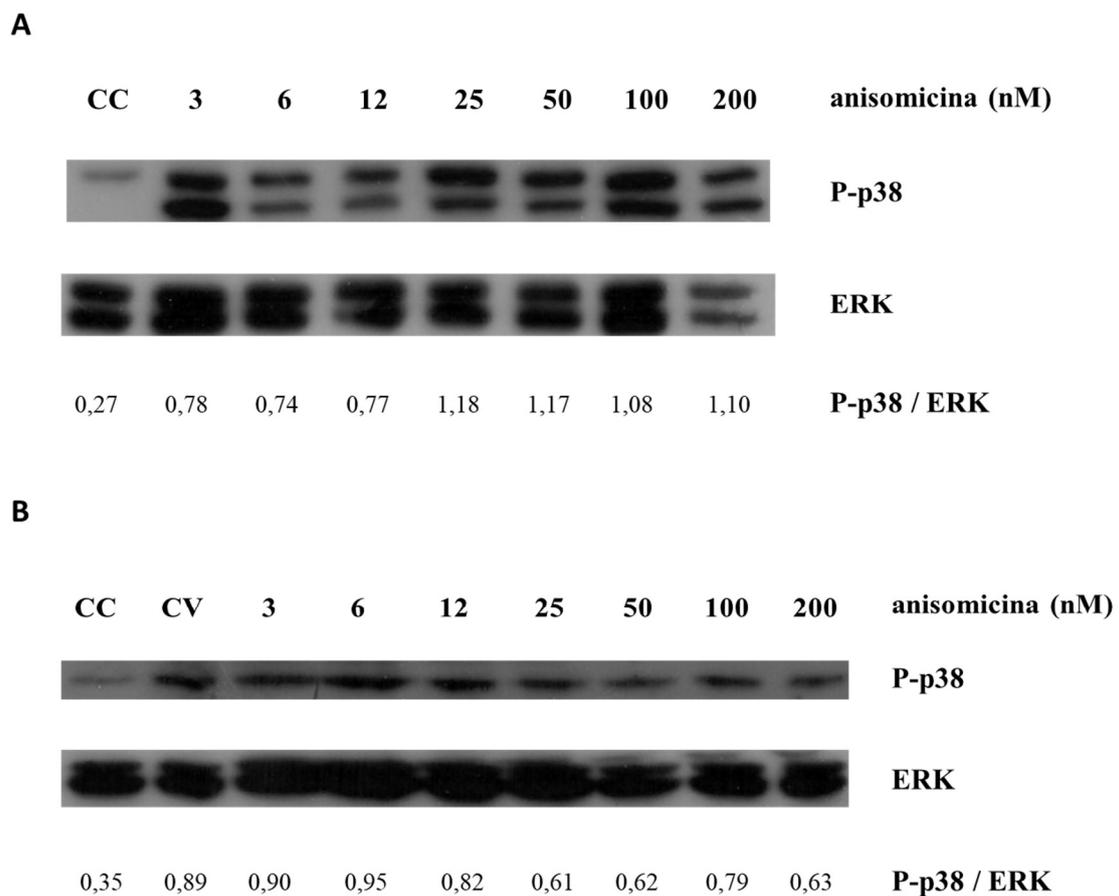


**Figura 21:** Efecto de la anisomicina sobre la actividad de RdRp de NS5 de DENV-2 (A) y de 2'O-MTasa de NS5 de DENV-3 (B). 3'dATP (1 μM) se utilizó como inhibidor de referencia de la actividad de RdRp y la sinefungina (50 μM) se utilizó como inhibidor de referencia de la actividad de MTasa. Los porcentajes de

actividad enzimática con respecto al control sin droga graficados corresponden al promedio de tres determinaciones  $\pm$  DE. El porcentaje de actividad enzimática en presencia de sinefugina (50  $\mu$ M) fue de  $0,7 \pm 0,2$  %. Test de Dunnett \*\*\* $p < 0,001$ .

**Efecto de la anisomicina sobre la vía p38 MAPK en células infectadas con DENV-2**

Dado que la anisomicina es un conocido activador de la vía de señalización p38 MAPK se decidió investigar el efecto del tratamiento con diferentes concentraciones de este compuesto sobre la fosforilación de p38 en cultivos de células Vero sin infectar o infectadas con DENV-2 (NGC).

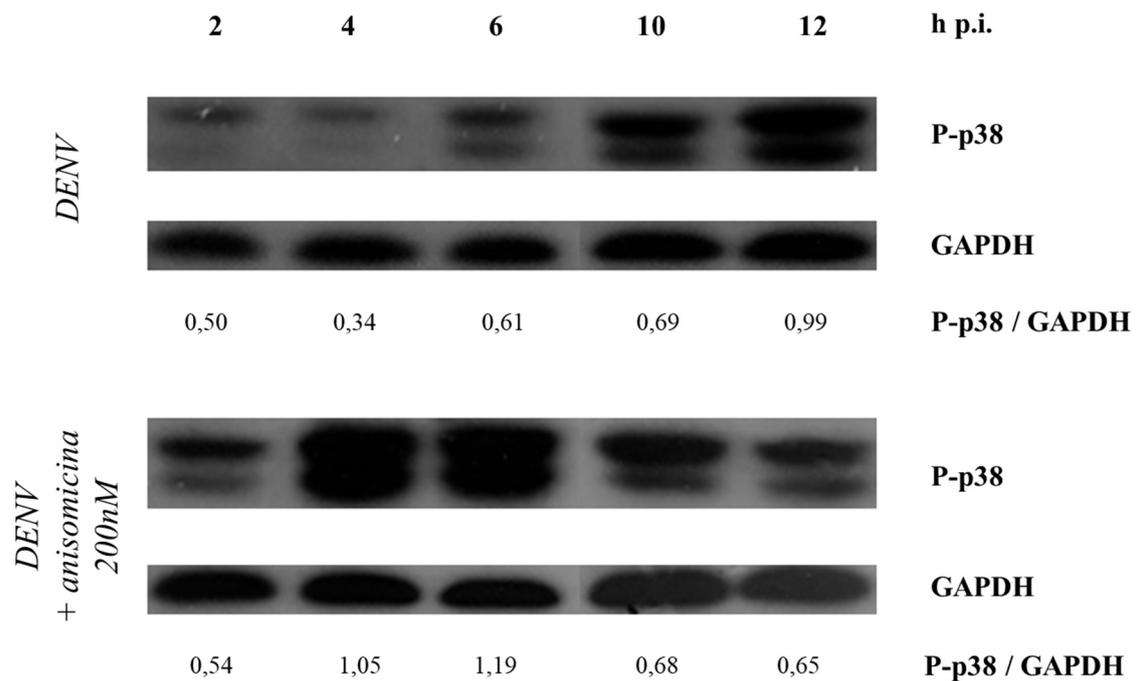


**Figura 22: Efecto de la anisomicina sobre la fosforilación de p38 a las 24h p.i.** Células Vero no infectadas (A) o infectadas con DENV-2 (m.i.=1) (B) fueron tratadas con diferentes concentraciones de anisomicina. Luego de 24 h de tratamiento, las células se lisaron y se analizó la expresión de P-p38 por Western blot utilizando la expresión de ERK como control de carga. Los números indican la relación entre la intensidad de la banda correspondiente a P-p38 y las bandas correspondientes a ERK y corresponden a un experimento representativo. CC: células no infectadas no tratadas. CV: células infectadas no tratadas.

En las muestras sin infectar se observó que la vía se encontraba activada incluso a la menor concentración de anisomicina ensayada (3 nM). Sin embargo, a partir de la concentración 25 nM se detectó un incremento en el nivel de fosforilación de p38 respecto a las concentraciones menores (Figura 22 A). Por otro lado, se observó que en coincidencia con la Figura 8 (capítulo 1), la infección viral indujo la activación de la vía respecto al control celular. En el caso del tratamiento con anisomicina, en el rango de concentraciones 3 a 12 nM se observó que los niveles P-p38 eran similares a los de los cultivos infectados sin tratar. Sin embargo, a concentraciones mayores de anisomicina se detectó un menor grado de activación de la vía (Figura 22 B).

Cabe aclarar que p38 posee varias isoformas que difieren en su PM y la detección de 1 o más bandas de esta proteína en los ensayos de Western blot depende del anticuerpo empleado. En el ensayo mostrado en la Figura 22 A, se empleó como anticuerpo primario (anti P-p38) el anticuerpo monoclonal mAB # 9211 (Cell Signaling Technology) mientras que en el ensayo que se muestra en la Figura 22 B el anticuerpo primario utilizado fue mAB # 4511 (Cell Signaling Technology).

Dado que tanto la infección viral como la anisomicina inducen la activación de la vía, los resultados anteriores son de difícil interpretación. Como en este ensayo los niveles de P-p38 se habían analizado recién a las 24 h p.i., decidimos examinar el grado de activación de la vía a lo largo de las primeras 12 h de la infección en los cultivos tratados o sin tratar con anisomicina. Para la detección de P-p38 por Western blot en estos ensayos se utilizó como anticuerpo primario (anti P-p38) el anticuerpo monoclonal mAB # 9211 (Cell Signaling Technology).



**Figura 23:** Efecto de la anisomicina sobre la fosforilación de p38 inducida por DENV-2. Células Vero infectadas con DENV-2 (m.i.=1) fueron tratadas, luego de 1 h de adsorción a 37°C, con anisomicina (200 nM). A distintos tiempos p.i., las células se lisaron y se analizó la expresión de P-p38 por Western blot utilizando la expresión de GAPDH como control de carga. Los números indican la relación entre la intensidad de la banda correspondiente a P-p38 y la correspondiente a GAPDH y corresponden a un experimento representativo.

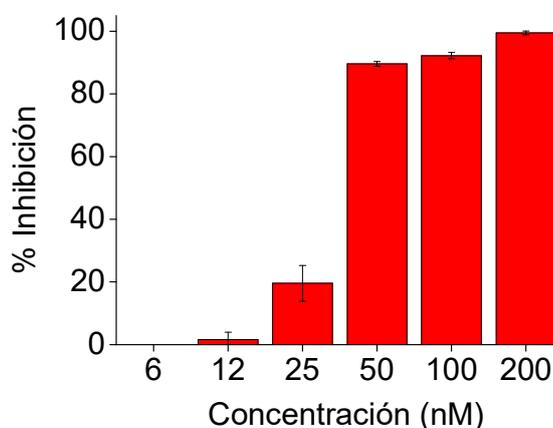
Como se muestra en la Figura 23, en las células infectadas sin tratar con el compuesto se observó un aumento gradual de la activación de la vía a partir de las 6 h p.i. Por el contrario, en los cultivos infectados y tratados con anisomicina la presencia del compuesto provocó un pico de activación de p38 MAPK a las 4 y 6 h p.i., mientras que a las 10 y 12 h p.i. se evidenció una disminución de la activación de la vía. Cabe aclarar que en algunos experimentos se podían observar altos niveles P-p38 incluso a las 2 h p.i., sin embargo, en todos los experimentos realizados los niveles de activación de la vía a las 4 y 6 h p.i. fueron superiores a los detectados a tiempos más tardíos de la infección.

Este ensayo mostró entonces que el tratamiento con el compuesto alteró la cinética de fosforilación de p38 en las células infectadas con DENV-2 por lo cual no se podría descartar que la actividad antiviral del compuesto se relacione con la modulación de esta vía de señalización.

## Evaluación del espectro antiviral de la anisomicina

### *Actividad antiviral de la anisomicina frente a otros flavivirus*

En primer lugar, se evaluó la actividad antiviral de la anisomicina frente a la cepa INEVH116141 de ZIKV aislada en Argentina a partir de un viajero que provenía de Venezuela. Para ello se infectaron células Vero (m.i.= 1) y luego de 1 h de adsorción a 37°C los cultivos se trataron con diferentes concentraciones de anisomicina y a las 48 h p.i. se cuantificó el rendimiento viral por el método de formación de placas.



**Figura 24:** *Actividad antiviral de la anisomicina frente ZIKV. Células Vero se infectaron con ZIKV (INEVH116141) (m.i.=1) y luego de 1 h de adsorción a 37°C los cultivos se trataron con diferentes concentraciones de anisomicina. A las 48 h p.i. se cuantificó el virus liberado al sobrenadante de los cultivos por el método de formación de placas. Los resultados se expresan como el porcentaje de inhibición del rendimiento viral respecto al control sin droga. Los datos representan el promedio de tres determinaciones  $\pm$  DE.*

Virus	CC <sub>50</sub> (nM)	CE <sub>50</sub> (nM)	IS
ZIKV	5400 $\pm$ 120	33,0 $\pm$ 1,1	163,0 $\pm$ 9,1
DENV-2 (NGC)	5400 $\pm$ 120	31,3 $\pm$ 1,2	171,9 $\pm$ 10,4

**Tabla 7:** *Efecto inhibitorio de la anisomicina frente a un aislamiento clínico de ZIKV en células Vero. CE<sub>50</sub>: concentración efectiva 50. IS: índice de selectividad. Los datos representan el promedio de tres determinaciones  $\pm$  DE*

Como se observa en la Figura 24 y en la tabla 7 el valor de  $CE_{50}$  obtenido para ZIKV es similar al obtenido para DENV-2, pero a la máxima concentración ensayada (200 nM) la anisomicina produjo una inhibición de 99,06% del rendimiento de ZIKV (lo cual implica una reducción de 2 unidades logarítmicas en el título viral), mientras que la misma concentración el compuesto produjo un 99,99% de inhibición (reducción de 4 unidades logarítmicas del título viral) frente a DENV-2.

Se decidió entonces investigar si el efecto antiviral de la anisomicina se extendía a otros miembros del género *Flavivirus*. Para ello, cultivos de células Vero76 o BHK-21, infectadas o no con cada uno de los virus a estudiar, se incubaron con diferentes concentraciones del compuesto la cantidad de días necesarios hasta observar el máximo efecto citopático. En el caso de los cultivos sin infectar se descartaron los sobrenadantes y la viabilidad celular se determinó por tinción con rojo neutro. Para la determinación de actividad antiviral, a los 3 d.p.i. se cosecharon los sobrenadantes de los cultivos infectados, tratados y no tratados, y se cuantificó el título viral por el método de punto final basado en la observación del efecto citopático. Se determinaron la  $CC_{50}$  y la  $CE_{50}$  y se calculó el IS.

Virus	Cepa	Línea celular	Días de incubación	$CC_{50}$ (nM)	$CE_{50}$ (nM)	IS
YFV	17D	Vero76	6	110,0	2,5	44,0
JEV	SA-14	Vero76	6	110,0	4,6	23,9
DENV	NGC	Vero76	7	130,0	7,2	18,1
ZIKV	PRVABC59	Vero76	4	100,0	13,8	7,2
ZIKV	P6-740	Vero76	6	110,0	19,1	5,8
WNV	Kern 515, WN02	Vero76	6	110,0	24,8	4,4
POWV	LB	BHK	4	140,0	58,1	2,4

**Tabla 8:** Efecto citotóxico y actividad antiviral de la anisomicina frente a distintos flavivirus.  $CC_{50}$ : concentración citotóxica 50,  $CE_{50}$ : concentración efectiva 50, IS: índice de selectividad, I: inactivo. Los datos representan el promedio de una determinación realizada por triplicado para la actividad antiviral y por duplicado para la citotoxicidad. YFV: virus de la fiebre amarilla, JEV: virus de la encefalitis japonesa, WNV: virus del Nilo occidental, POWV: virus Powassan.

En este tipo de ensayos se consideran moderadamente activos a los compuestos con  $4,6 < IS < 10$ , activos a los compuestos con  $10 < IS < 15$  y muy activos a los compuestos con  $IS > 15$ . Se demostró que YFV fue el virus más susceptible a la acción de la anisomicina. El compuesto

también resultó muy activo frente a JEV y DENV-2, mientras que frente a las dos cepas de referencia de ZIKV resultó moderadamente activo. Por el contrario, la anisomicina no exhibió actividad antiviral frente a WNV y POWV.

### *Actividad antiviral de la anisomicina frente a otros virus*

A continuación, se evaluó la actividad antiviral de la anisomicina frente a virus pertenecientes a diferentes familias a fin de conocer más sobre el espectro de acción de este compuesto. Para ello, cultivos de células Vero76, MA-104 o MDCK se infectaron o no con cada uno de los virus a ensayar y se trataron con diferentes concentraciones de anisomicina la cantidad de días necesarios hasta observar el máximo efecto citopático. En este caso tanto la viabilidad celular como la actividad antiviral se evaluaron por tinción con rojo neutro.

	Familia	Género	Virus	Cepa	Línea celular	Días de incubación	CC <sub>50</sub> (nM)	CE <sub>50</sub> (nM)	IS
ARN (+)	Togaviridae	Alphavirus	CHIKV	S27(VR-67)	Vero76	3	120	36	3,3
			WEE	California	Vero76	3	110	80	1,4
	Picornaviridae	Enterovirus	PV	Mahoney	Vero76	3	>200	>200	-
ARN (-)	Pneumoviridae	Orthopneumovirus	RSV	A2	MA-104	5	170	160	1,1
	Paramyxoviridae	Respirovirus	HPIV3	14702	MA-104	8	>200	>200	-
	Orthomyxoviridae	Influenzavirus A	IAV H1N1	California 07/20/09	MDCK	3	68	>68	<1
	Arenaviridae	Mammarenavirus	JUNV	Candid #1	Vero76	8	48	>48	<1
			PICV	AN 4763	Vero76	8	51	11	4,6
	Peribunyaviridae	Orthobunyavirus	LACV	Wisconsin 1960	Vero76	3	>200	62	>3,2
	Phenuiviridae	Phlebovirus	PTV	Adames	Vero76	5	>200	77	>2,6
			RVFV	MP-12	Vero76	5	>200	>200	-
	Hantaviridae	Orthohantavirus	MAPV	HV97021050	Vero76	8	65	>65	<1
	Parvoviridae	Parvovirus	RV	1059	HeLa	4	>200	150	>3,1

**Tabla 9: Efecto citotóxico y actividad antiviral de la anisomicina frente a virus de diferentes familias.** CC<sub>50</sub>: concentración citotóxica 50, CE<sub>50</sub>: concentración efectiva 50, IS: índice de selectividad, I: inactivo. Los datos representan el promedio de una determinación realizada por triplicado para la actividad antiviral y por duplicado para la citotoxicidad. ARN (+): genoma ARN de polaridad positiva, ARN (-): genoma ARN de polaridad negativa, ADN<sub>Nsc</sub>: genoma ADN simple cadena. CHIKV: virus Chikungunya, WEE: virus de la encefalitis equina occidental, PV: poliovirus, HPIV3: virus respiratorio sincicial, IAV: virus influenza humano A, JUNV: virus Junin, PICV: virus Pichindé, LACV: virus La Crosse, PTV: virus Punta Toro, RVFV: virus de la fiebre del valle de Rift, MAPV: virus Maporal, RVFV: virus de la fiebre del valle de Rift, RV: virus de la rata de Kilham

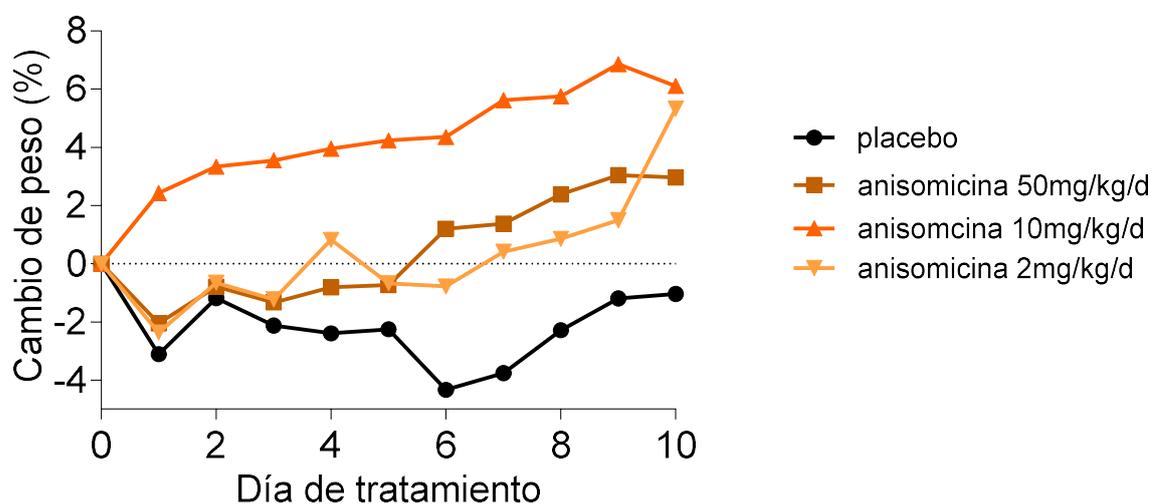
ADN  
sc

Como se muestra en la Tabla 9, el único virus para el cual la anisomicina presentó un efecto inhibitorio (con un valor de IS que coincide con el límite inferior de lo que se considera un compuesto con moderada actividad antiviral) fue el arnavirus PICV. El resto de los virus ensayados no fueron susceptibles al tratamiento con la anisomicina indicando que el efecto inhibitorio del compuesto podría estar relacionado con alguna propiedad compartida por la mayoría de los miembros del género *Flavivirus*.

### Evaluación de la actividad antiviral de la anisomicina frente a ZIKV en un modelo animal

Teniendo en cuenta la actividad antiviral exhibida por la anisomicina frente a diferentes cepas de ZIKV en cultivos celulares, se decidió evaluar la eficacia del compuesto frente a la cepa P 6-740 de ZIKV en ratones AG129.

En primer lugar, se evaluó la toxicidad del compuesto en el modelo animal a utilizar. Para ello, se administró anisomicina en distintas dosis, una vez por día durante 10 días, por vía subcutánea y los animales se mantuvieron en observación registrándose diariamente su peso corporal.



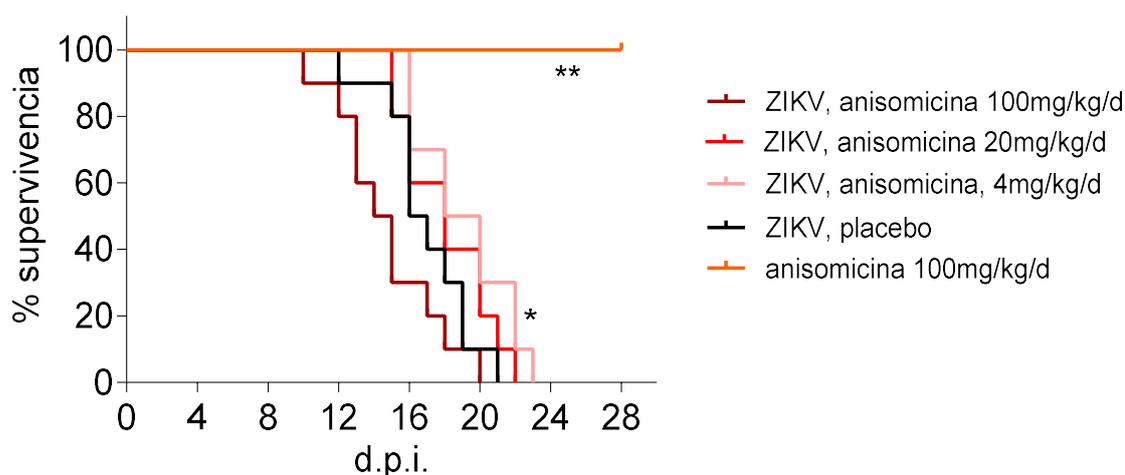
**Figura 25:** Evaluación de la toxicidad de la anisomicina en ratones AG129. Registro del cambio de peso corporal respecto del peso al inicio del experimento de los animales tratados con placebo o con diferentes dosis de anisomicina administrados diariamente durante 10 días. Los datos corresponden al promedio obtenido en cada grupo de animales ( $n=3$  por grupo).

El ensayo de toxicidad mostró que en los ratones AG129 tratados con anisomicina el peso corporal a lo largo de los días de tratamiento fue similar o incluso algo superior al exhibido por los animales del grupo control tratado con placebo (Figura 25). Los animales se observaron diariamente durante 14 días a partir del inicio del experimento y no se evidenciaron cambios en el comportamiento ni otros signos que pudieran asociarse a un efecto tóxico del compuesto para ninguna de las dosis de anisomicina ensayadas.

A fin de evaluar la eficacia antiviral del compuesto en este modelo animal, los ratones AG129 fueron infectados con 100 DICC<sub>50</sub> de ZIKV por vía subcutánea y a las 4 h p.i. el compuesto o el placebo se administraron por la misma vía. Diariamente y hasta los 10 d.p.i los animales recibieron una dosis de anisomicina o de placebo. Se emplearon tres dosis de anisomicina: 4, 20 y 100 mg/kg/d. Debido a que en el ensayo de toxicidad (Figura 25) la máxima dosis de anisomicina ensayada había sido 50 mg/kg/d, en el ensayo de actividad antiviral se incluyó como control adicional un grupo de animales no infectados y tratados con 100 mg/kg/d de anisomicina. Por lo tanto, en este experimento se trabajó con cinco grupos de animales:

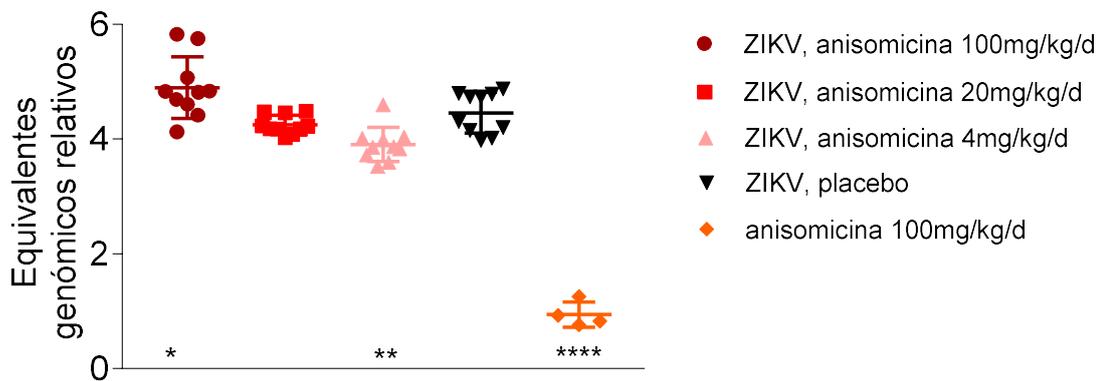
- 3 grupos de animales infectados y tratados con diferentes dosis de anisomicina (n=10 en cada caso)
- 1 grupo de animales infectados y tratados con placebo (n= 10)
- 1 grupo de animales no infectados y tratados con la dosis más alta de anisomicina (n= 4)

Los animales se observaron diariamente a lo largo de 28 días y se evaluaron diferentes parámetros. La mortalidad de los ratones se registró dos veces por día para poder determinar la curva de supervivencia. A los 5 d.p.i. se tomaron muestras de sangre a fin de cuantificar el ARN viral presente en el suero de los animales de cada grupo. Por otra parte, el peso corporal de los animales se registró día por medio entre los 8 y 21 d.p.i. y a lo largo de todo el experimento los ratones se observaron dos veces por día a fin de detectar la aparición de signos de enfermedad por infección con ZIKV.



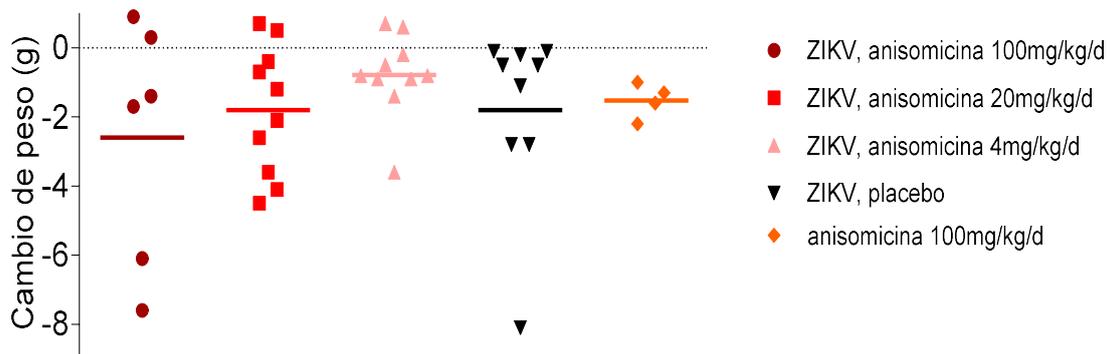
**Figura 26:** Efecto del tratamiento con anisomicina sobre la supervivencia de ratones AG129 infectados con ZIKV. Ratones AG129 fueron infectados por vía subcutánea con ZIKV y a las 4 h p.i. grupos de 10 animales se trataron con diferentes dosis de anisomicina o placebo administrados en forma diaria durante 10 días. A su vez, un grupo de 4 ratones no infectados se trataron con anisomicina 100 mg/kg/d. El gráfico muestra el porcentaje de supervivencia en cada uno de los grupos en función del tiempo. Test de Wilcoxon \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

Los animales no infectados y tratados con 100 mg/kg/d de anisomicina sobrevivieron al tratamiento y no mostraron signos de efectos tóxicos debidos a la administración del compuesto. En los ratones infectados y tratados con la dosis mayor de anisomicina (100 mg/kg/d) los signos de enfermedad y los eventos de mortalidad comenzaron a registrarse más tempranamente (7 d.p.i. y 10 d.p.i., respectivamente) que en los ratones infectados tratados con placebo (11 d.p.i. y 12 d.p.i., respectivamente). Con la dosis más alta de anisomicina se observó además un mayor intervalo de tiempo entre el comienzo de los signos de enfermedad y la mortalidad de los ratones. Por el contrario, en los ratones tratados con una dosis de 4 mg/kg/d de anisomicina los signos de enfermedad aparecieron más tardíamente observándose además un retraso de la mortalidad que resultó significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) a lo registrado para el grupo tratado con placebo (Figura 26). Por su parte, el tratamiento con la dosis intermedia de anisomicina (20 mg/kg/d) no mostró cambios relevantes respecto al grupo tratado con placebo.



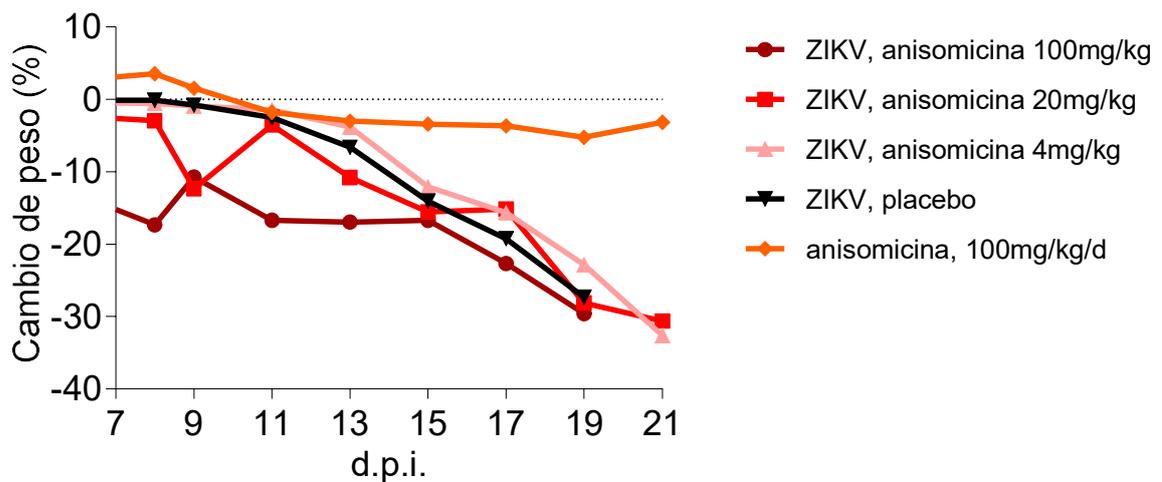
**Figura 27:** Efecto del tratamiento con anisomicina sobre la viremia en ratones AG129 infectados con ZIKV. Se cuantificó mediante qRT-PCR el ARN viral obtenido a los 5 d.p.i. a partir del suero de ratones AG129 infectados con ZIKV y tratados con distintas dosis de anisomicina o placebo. A su vez, un grupo de 4 ratones no infectados se trataron con anisomicina 100 mg/kg/d. Test de Dunnett \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ .

Se observó una correlación entre la curva de supervivencia y la viremia cuantificada a los 5 d.p.i. Los ratones tratados con 100 mg/kg/d de anisomicina presentaron un aumento significativo del ARN viral presente en el suero, mientras que la dosis menor (4 mg/kg/d) provocó una reducción significativa del ARN viral con respecto al grupo control tratado con placebo (Figura 27).



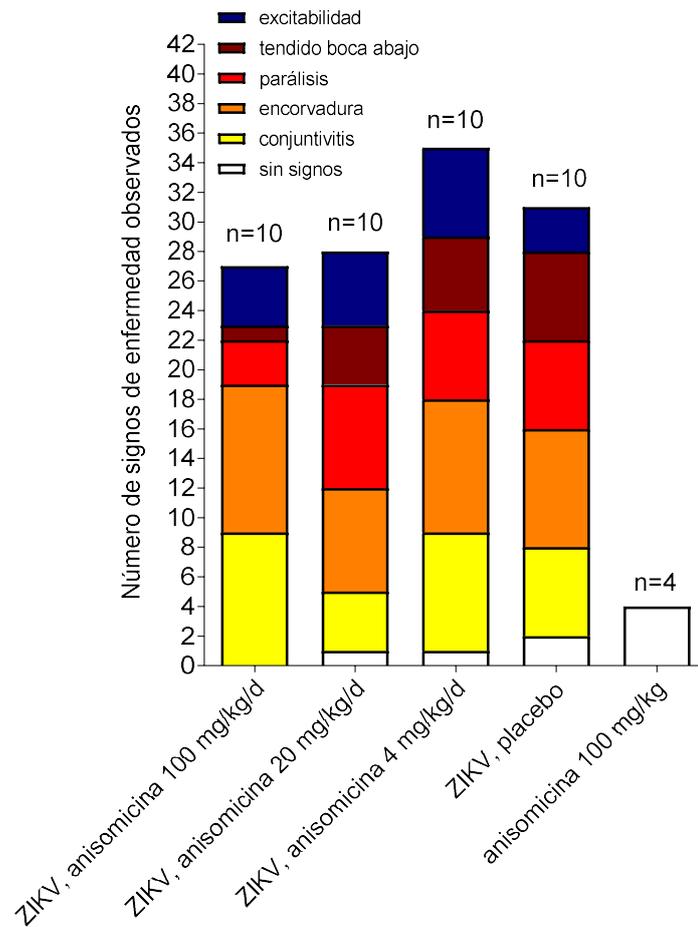
**Figura 28:** Efecto del tratamiento con anisomicina sobre el peso corporal de ratones AG129 infectados con ZIKV. Se registró el cambio en el peso corporal entre los 8 y 13 d.p.i. de ratones AG129 infectados con ZIKV y tratados con distintas dosis de anisomicina o con placebo administrados diariamente durante 10 días. A su vez, un grupo de 4 ratones no infectados se trataron con anisomicina 100 mg/kg/d.

En concordancia con los resultados de supervivencia y de viremia, el mayor cambio de peso corporal entre los 8 y 13 d.p.i. se evidenció en el grupo de animales infectados y tratados con la dosis mayor de anisomicina mientras que el menor cambio de peso se registró en los animales tratados con la dosis más baja de compuesto (Figura 28).



**Figura 29:** Efecto del tratamiento con anisomicina sobre el peso corporal de ratones AG129 infectados con ZIKV a lo largo del tiempo. Se determinó el cambio en el peso corporal con respecto al día 0 de ratones AG129 infectados con ZIKV y tratados con distintas dosis de anisomicina o con placebo administrados diariamente durante 10 días. A su vez, un grupo de 4 ratones no infectados se trataron con anisomicina 100 mg/kg/d. Los datos corresponden al promedio obtenido en cada grupo de animales a diferentes d.p.i.

Al analizar el cambio de peso corporal a lo largo del tiempo se determinó que el menor cambio de peso se observó en los ratones no infectados y tratados con 100 mg/kg/d de anisomicina. En el caso de los animales infectados la pérdida de peso corporal se evidenció más tempranamente en los ratones tratados con la dosis más alta de anisomicina mientras que el perfil de pérdida de peso en los ratones tratados con la dosis intermedia y la dosis más baja de compuesto fue similar al de los ratones tratados con placebo (Figura 29).



**Figura 30:** Signos de enfermedad en ratones AG129 infectados con ZIKV y tratados con diferentes dosis de anisomicina o con placebo. A su vez, un grupo de 4 ratones no infectados se trataron con anisomicina 100 mg/kg/d. Se representa la cantidad de ratones en cada grupo que presentaron los distintos signos de enfermedad.

Si bien como se mencionó anteriormente la dosis mayor y la dosis menor de anisomicina modificaron el tiempo de aparición de los signos de enfermedad con respecto a los animales tratados con placebo, el número de ratones que presentaron los diferentes signos de enfermedad fue similar en todos los grupos de animales infectados (Figura 30).

## DISCUSIÓN

Dentro de la familia *Flaviviridae* los géneros *Flavivirus* y *Hepacivirus* comprenden importantes patógenos para el hombre. El desarrollo de antivirales eficaces frente a HCV, el único virus del género *Hepacivirus* que infecta a los humanos, contrasta con los pobres resultados obtenidos en la búsqueda de agentes antivirales para hacer frente a las infecciones producidas por los virus del género *Flavivirus*. Esta situación puede deberse, entre otros factores, a la disponibilidad de vacunas eficientes para algunos de estos virus como YFV y JEV, a la mayor prevalencia de estas infecciones virales en los países más pobres, lo cual limita el potencial comercial de los fármacos antivirales, y a la variada gama de sintomatología que presentan estas enfermedades, desde infecciones asintomáticas a otras severas y letales. Las recientes epidemias producidas por ZIKV han puesto en evidencia los principales factores de riesgo de estas enfermedades. La globalización y los viajes internacionales favorecen la dispersión de estos virus a poblaciones sin inmunidad previa resultando en la infección de una alta proporción de la población. Por otra parte, la circulación de diferentes flavivirus en las mismas regiones geográficas conlleva el riesgo del fenómeno de ADE asociado a formas severas de enfermedad. En el caso de la infección por ZIKV, además de la transmisión por artrópodos este virus es capaz de usar vías de transmisión que antes no eran consideradas relevantes para este grupo de virus y por otra parte, se ha comprobado que el virus puede persistir en algunos tejidos por varios meses después del periodo de viremia aumentando el riesgo de transmisión (Boldescu y col., 2017). Por todo lo expuesto, hay un interés creciente en el hallazgo de compuestos que exhiban actividad antiviral frente a los diferentes miembros del género *Flavivirus*.

En este contexto, en este segundo capítulo investigamos la capacidad de la anisomicina de inhibir la multiplicación de DENV en cultivos celulares y extendimos este análisis a otros flavivirus, evaluando asimismo su actividad antiviral *in vivo* frente a ZIKV.

Los ensayos realizados en células Vero en nuestro laboratorio revelaron que la anisomicina presentó actividad antiviral frente a los 4 serotipos de DENV con valores de IS cercanos a 200 para DENV-1, -2 y -3, detectándose una menor susceptibilidad al compuesto para DENV-4 (IS= 87,3). La capacidad de la anisomicina de provocar una contundente inhibición de la multiplicación de los 4 serotipos virales es de suma importancia para un potencial agente antiviral contra DENV. Asimismo, la anisomicina no exhibió actividad virucida por lo cual este compuesto actuaría inhibiendo alguna etapa del ciclo de multiplicación viral.

El estudio de la actividad antiviral de la anisomicina se extendió a líneas celulares humanas relacionadas con la patogénesis de DENV. Se sabe que los blancos primarios en la infección con DENV son células monocíticas, macrófagos y células dendríticas (Whitehorna y col., 2011). A su vez en los casos de dengue grave se ha reportado la infección de diferentes órganos (Elong Ngonu y col., 2018; Srikiatkachor y col., 2017), por lo cual evaluamos la actividad antiviral de la anisomicina frente a DENV-2 en la línea mieloide U937, en la línea HepG2 (carcinoma de hígado) y en la línea A549 (carcinoma de pulmón). La citotoxicidad del compuesto resultó muy baja para las células HepG2 y A549, no así para las células U937, para las cuales se obtuvo un valor de  $CC_{50}$  menor al obtenido para las células Vero, HepG2 y A549. Un estudio realizado con anisomicina en las células U937 mostró que a concentraciones superiores a 100 nM, la anisomicina actúa como inductor de apoptosis en este sistema celular (Hori y col., 2008) lo cual podría explicar el alto grado de citotoxicidad registrado en nuestros experimentos. También se ha descrito un mayor efecto citotóxico de la anisomicina en macrófagos murinos respecto a células murinas de músculo liso y esta citotoxicidad diferencial se ha asociado a un mayor grado de activación de la vía p38 MAPK en los macrófagos (Croons y col., 2009).

Con respecto a la actividad antiviral, la anisomicina inhibió la producción de DENV-2 en las tres líneas celulares ensayadas. En las células U937 se obtuvo un valor de  $CE_{50}$  menor al calculado para los otros tipos celulares, lográndose un 99 % de inhibición del rendimiento viral en cultivos tratados con una concentración de anisomicina de 50 nM, concentración menor a las reportadas por Hori y col. (2008) como inductoras de apoptosis.

La anisomicina fue además eficaz en la inhibición de la multiplicación de aislamientos clínicos de DENV-2 obteniéndose valores de IS incluso superiores al calculado para la cepa de referencia NGC. Este resultado es prometedor ya que el compuesto podría exhibir actividad antiviral frente a diferentes cepas circulantes de DENV-2 o de otros serotipos. Por otra parte, dado que en pacientes con dengue se conoce que existe una relación entre la detección de altos títulos virales y la severidad de la infección (Vaughn y col., 2000), resultó interesante el hecho de que el efecto antiviral de la anisomicina no parece estar influenciado por la m.i. empleada, al menos en las condiciones experimentales ensayadas.

El pre-tratamiento de los cultivos celulares con anisomicina no provocó la inducción de un estado antiviral frente a DENV-2. Por otra parte, el agregado de anisomicina hasta las 8 h p.i. produjo una clara inhibición de los títulos de virus intracelular y extracelular indicando que el compuesto estaría inhibiendo la formación de partículas virales infecciosas. A partir de las 8

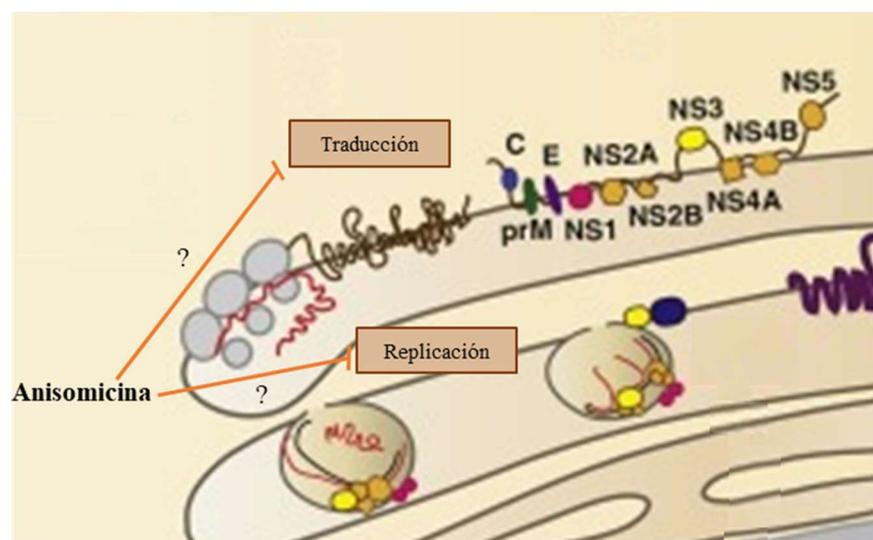
h p.i., cuanto más se retrasó el agregado de la anisomicina menor fue la inhibición de la producción de virus. A diferencia de lo reportado para inhibidores de la liberación de virus al medio extracelular (Courageot y col., 2000), el tratamiento con anisomicina entre las 18 y las 24 h p.i. no redujo la producción de virus, sugiriendo que las etapas tardías del ciclo de multiplicación de DENV no estarían afectadas por el compuesto. Asimismo, el tratamiento con anisomicina durante distintos intervalos cortos de tiempo dentro de las primeras 8 h de la infección mostró que la mayor inhibición en la producción de virus se evidenció en los cultivos tratados entre 1 y 4 h p.i., período de la infección en el cual ocurriría el desnudamiento del genoma viral, es decir la disociación de la proteína C del ARN viral, y el inicio de la síntesis de macromoléculas virales (Byk y col., 2016b).

El análisis de la cinética de internalización viral en presencia y ausencia de anisomicina no mostró diferencias significativas y tampoco se observó un efecto adverso de la anisomicina sobre el desnudamiento viral en comparación a lo observado en los cultivos tratados con  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Sin embargo, la presencia de anisomicina produjo una marcada inhibición de la expresión de la glicoproteína E y de la síntesis de ARN viral y, en este último caso, el efecto inhibitorio fue superior al exhibido por la ribavirina. Por lo tanto, los resultados obtenidos indican que la anisomicina impide la síntesis de macromoléculas virales. Una vez que la nucleocápside viral se libera en el citoplasma y la proteína C se disocia del genoma, el primer proceso de biosíntesis es la traducción. La síntesis de proteínas virales no estructurales habilita el comienzo de la replicación del genoma y a su vez la síntesis de nuevos genomas retroalimenta e incrementa los niveles de traducción proteica, por lo cual resulta difícil en el contexto de la infección discriminar si el efecto adverso de la anisomicina es sobre la traducción o sobre la síntesis de ARN. Sería interesante poder evaluar el efecto de la anisomicina utilizando un sistema de replicón de DENV, como por ejemplo el desarrollado por Alvarez y col., (2005b) en el cual las proteínas estructurales del virus se reemplazaron por un gen reportero. Luego de la transfección de células con este replicón es posible diferenciar un incremento temprano de la actividad del gen reportero correspondiente al proceso de traducción y un poco más tardíamente un incremento exponencial de dicha actividad como consecuencia de la replicación del ARN, por lo cual se podría establecer cuál de los dos procesos está afectado por la anisomicina (Alvarez y col. 2005b; Filomatori y col., 2006).

Como se mencionó en la introducción, la anisomicina es conocida por ser un inhibidor de la elongación de la síntesis de proteínas y se sabe que su mecanismo está relacionado con la unión al sitio A de la subunidad ribosomal 60S impidiendo la formación del enlace peptídico.

Si bien en el presente trabajo evidenciamos actividad antiviral a concentraciones no citotóxicas de anisomicina no se puede descartar que aún a esas bajas concentraciones de compuesto el mismo no pueda interactuar parcialmente o de manera menos eficiente con los ribosomas. Como ya ha sido mencionado, la traducción viral requiere de la disociación de la proteína C del genoma viral (Byk y col., 2016b) y no se descarta que los ribosomas tengan un papel activo en dicho proceso de disociación (Singh y col., 1992). Por lo cual, una posibilidad sería que la unión de la anisomicina a los ribosomas pudiese interferir con el desplazamiento de la proteína viral C impidiendo el desnudamiento del genoma viral y en consecuencia su traducción. Sin embargo, el hecho de que el agregado de anisomicina hasta las 8 h p.i. tenga un efecto inhibitorio contundente sobre la multiplicación viral sugiere que el compuesto estaría afectando una etapa posterior al desnudamiento del genoma viral, como lo es la síntesis de macromoléculas virales.

La actividad antiviral de la anisomicina también podría deberse a un efecto de este compuesto sobre las proteínas virales no estructurales ya que las mismas están involucradas en mayor o en menor medida en la síntesis de macromoléculas del virus. Se evaluó la posibilidad de que alguna de las actividades enzimáticas de la proteína NS5 fuese un blanco directo del efecto inhibitorio de la anisomicina. Las actividades de RdRp y 2'O-MTasa de NS5 medidas en ensayos *in vitro* no se vieron afectadas por el compuesto. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que este tipo de ensayos no permite determinar si la presencia del compuesto interfiere en la interacción de NS5 con otras proteínas virales o celulares involucradas en la replicación viral.



**Figura a:** La anisomicina ejercería su acción antiviral interfiriendo con la síntesis de macromoléculas virales. Los resultados obtenidos no permiten discriminar si el compuesto inhibe la traducción o la replicación del genoma viral.

Dado que una de las propiedades biológicas distintivas de la anisomicina es su capacidad de activar a las vías de señalización p38 MAPK y JNK MAPK decidimos investigar si la activación de p38 MAPK se relacionaba con su efecto antiviral. Se comprobó que en los cultivos no infectados todas las concentraciones de anisomicina ensayadas mostraban, luego de 24 h de tratamiento, un efecto activador de la vía, pero los mayores niveles de P-p38 se detectaron en los cultivos tratados con aquellas concentraciones de compuesto que exhibían actividad antiviral (25-200 nM). Sin embargo, en las células infectadas y tratadas con ese rango de concentraciones se detectó un menor grado de fosforilación de p38 con respecto al control infectado sin tratar, lo cual podría deberse al efecto inhibitorio del compuesto sobre la multiplicación del virus.

En este punto del análisis nos preguntamos cómo sería la cinética de activación de p38 MAPK por parte del virus y si esta cinética podía ser afectada por el tratamiento con anisomicina.

En trabajos previos se había comprobado la activación de la vía por parte de DENV-2 durante la primera hora de la infección en células endoteliales y macrófagos (Ceballos-Olvera y col., 2010; Huerta-Zepeda y col., 2008). En el caso de los macrófagos, se observó que la activación disminuye después de los primeros 5 min p.i. y en ninguno de los dos sistemas se analizaron tiempos más tardíos de la infección. Roth y col., (2017) reportaron la activación de la vía por parte de DENV-2 en células hepáticas humanas Huh7 recién a partir de las 12 h p.i. Dado los escasos antecedentes encontrados en bibliografía decidimos estudiar la cinética de activación de p38 MAPK a lo largo de las primeras 12 h de la infección. Este análisis reveló un incremento gradual en los niveles de P-p38 a partir de las 6 h p.i. el cual podría estar indicando que la síntesis de macromoléculas virales induce la activación de la vía. Por otra parte, en los cultivos infectados con DENV-2 y tratados con anisomicina se observó un marcado incremento de la activación de la vía a las 4 h y 6 h p.i. y una posterior disminución de los niveles de P-p38. Esto indica que el compuesto altera la cinética de activación de la vía p38 MAPK inducida por el virus, pudiendo generar alteraciones en la expresión de genes y/o en los niveles de quinasas celulares que interfieran con la multiplicación viral. En este sentido resultan interesantes los resultados previamente reportados para el salicilato de sodio, otro compuesto cuya acción inhibitoria frente a DENV-2 ha sido relacionada con su capacidad de activar la vía p38 MAPK debido a que su actividad antiviral es parcialmente revertida por la presencia de un inhibidor específico de la vía (Liao y col., 2001). Por lo tanto, si bien la infección viral induce la activación de p38 MAPK, la presencia de un activador de la vía que

modifique la cinética o los niveles de activación de la misma podría generar un ambiente hostil para la multiplicación viral. Por todo lo expuesto es necesario continuar con los estudios acerca de la relación entre la actividad antiviral de la anisomicina y su modulación de la vía p38 MAPK, investigando cuál es el efecto de inhibidores químicos y moleculares de esta vía sobre la actividad antiviral del compuesto. A su vez debería analizarse el efecto de concentraciones de anisomicina que no exhiben actividad antiviral sobre la cinética de activación de p38 MAPK en las células infectadas.

Además de inhibir la multiplicación de los 4 serotipos de DENV, la anisomicina también presentó actividad antiviral frente a un aislamiento clínico de ZIKV (INEVH11614) con valores de  $CE_{50}$  e IS similares a los obtenidos para la cepa de referencia de DENV-2. El efecto inhibitorio de la anisomicina frente a ZIKV también podría estar relacionado con la capacidad del compuesto de actuar como un activador de la vía p38 MAPK. Sin embargo, hasta el momento se conoce muy poco acerca de la interacción de ZIKV con las vías de señalización dependientes de MAPKs. La activación de la vía p38 MAPK durante la infección con ZIKV ha sido recientemente descrita en cultivos primarios murinos de células de retina (Zhu y col., 2017), por lo cual sería necesario analizar si, como en el caso de DENV-2, la cinética de activación de p38 MAPK inducida por ZIKV se ve alterada por la presencia de anisomicina.

La inhibición de la multiplicación de ZIKV por parte de la anisomicina nos alentó a evaluar la actividad antiviral de este compuesto frente a otros miembros del género *Flavivirus* y frente a otros virus no relacionados. A diferencia de los ensayos realizados en nuestro laboratorio en los que los cultivos se trataron con anisomicina durante 48 h, la citotoxicidad se evaluó por el método de MTS y el rendimiento viral se midió por el método de formación de placas, la evaluación del espectro antiviral de la anisomicina se llevó a cabo en el IAR de la Universidad Estatal de Utah. En este caso la citotoxicidad se evaluó por el método del rojo neutro y el rendimiento viral se determinó a través de la cuantificación del efecto citopático provocado por la infección. A su vez, los tiempos de incubación con el compuesto variaron dependiendo del virus ensayado por lo cual, en este análisis se incluyó a la cepa NGC de DENV-2 para poder realizar un análisis comparativo. Los resultados mostraron que la anisomicina inhibió la multiplicación de la mayoría de los flavivirus ensayados a excepción de WNV y POWV. En el caso de POWV, que fue el menos susceptible a la acción de la anisomicina, es el único flavivirus evaluado que no es transmitido por mosquitos sino por garrapatas (Cook y col., 2012). Los mayores IS se obtuvieron para YFV, JEV y DENV-2. Si bien la actividad de la

anisomicina frente a JEV ya había sido previamente reportada (Chang y col., 2005) no existían estudios previos para los otros flavivirus ensayados. El IS para DENV-2 (NGC) calculado en este ensayo realizado en el IAR resultó menor al obtenido en los ensayos realizados en nuestro laboratorio, probablemente porque los cultivos fueron incubados con el compuesto durante 6 días lo cual resultó en un mayor efecto citotóxico. En el caso de ZIKV se emplearon dos cepas de referencia que al igual que el aislamiento INEVH11614 pertenecen al linaje asiático, obteniéndose valores de IS algo menores al registrado para DENV-2.

Es interesante destacar que la anisomicina no presentó actividad antiviral frente a otros virus ARN no relacionados, tanto con genoma de polaridad positiva como de polaridad negativa, a excepción del arenavirus Pichindé (PICV), el cual mostró una moderada susceptibilidad. La anisomicina tampoco resultó activa frente al parvovirus RV. Estos resultados sugieren que la actividad antiviral de la anisomicina estaría relacionada con algún factor o factores comunes a la replicación de varios miembros del género *Flavivirus*, por lo cual no parece tratarse de un efecto inespecífico o generalizado.

El efecto inhibitorio de la anisomicina frente a ZIKV demostrado en los ensayos *in vitro* nos alentó a evaluar su actividad antiviral en un modelo *in vivo* para la infección por ZIKV. En primer lugar, se evaluó la toxicidad de tres dosis diferentes del compuesto en ratones AG129. El tratamiento consistió en una dosis diaria durante 10 días por vía s.c. La elección de esta vía de administración se basó en diferentes motivos. Por un lado la vía i.v. es poco práctica y se había comprobado que la administración de anisomicina (60 mg/kg/d) por esa vía a ratones BALB/c provocaba efectos adversos en tratamientos prolongados (Tang y col., 2012). Por otra parte, se había demostrado que la llegada del compuesto al cerebro de ratones C57BL/6J era más eficiente por una ruta s.c. que i.p. y teniendo en cuenta el tropismo de ZIKV se decidió optar por la vía s.c. (Wanisch y col., 2008). Con respecto a la elección de las dosis a ensayar se sabía que la inoculación por vía i.p. de una dosis de 0,1 mg/kg de anisomicina era suficiente para activar la vía p38 MAPK a las 12 h post-administración en el miocardio de ratones C57BL (Zhao y col., 2012), por lo cual se decidió utilizar dosis superiores a 0,1 mg/kg.

Las dosis de anisomicina empleadas (2, 10 y 50 mg/kg/d) no resultaron tóxicas en el esquema de tratamiento planteado. Por lo cual, para evaluar la actividad antiviral se decidió incrementar al doble las dosis a emplear: dosis baja (4 mg/kg/d), intermedia (20 mg/kg/d) y alta (100 mg/kg/d) y el tratamiento se inició a las 4 h p.i., agregando al ensayo un grupo de ratones no infectados y tratados con 100 mg/kg/d como control de toxicidad. La aparición de los signos de enfermedad en los animales tratados con la dosis alta de anisomicina ocurrió 4 días antes

que en el grupo infectado y tratado con placebo, mientras que para las dosis intermedia y baja los signos de enfermedad se registraron 1 y 4 días después que en el grupo placebo, respectivamente. Por otro lado, la mortalidad siguió la misma tendencia de aparición según la dosis: para la dosis alta la primera muerte se registró el día 10 p.i., para el grupo placebo el día 12 p.i., para la dosis intermedia el día 15 p.i. y para la dosis baja el día 16 d.p.i. En los grupos tratados con placebo o con las dosis intermedia y baja de anisomicina los ratones morían 1 o 2 días después de la aparición de los signos de enfermedad, mientras que los ratones tratados con la dosis alta por lo general permanecían enfermos por 3 o 4 días antes de morir. Por eso mismo, las curvas de supervivencia del grupo placebo y del grupo tratado con la dosis alta no resultaron significativamente distintas. En el caso de la dosis baja, la curva de supervivencia es significativamente distinta al control ya que el corrimiento observado se debió a que los ratones permanecían sin signos de enfermedad por más tiempo que los tratados con placebo. Estos resultados se correlacionaron con la cantidad de ARN viral presente en el suero de los animales a los 5 d.p.i. y con la variación del peso de los ratones entre los 8 y 13 d.p.i. Por último, el cambio de peso de los animales infectados y tratados con anisomicina a lo largo del experimento fue similar al del grupo infectado y tratado con placebo, así como tampoco se registraron cambios en la cantidad de signos de enfermedad presentados en los diferentes grupos de animales infectados. El conjunto de estos resultados nos permite concluir que la anisomicina presenta un efecto reverso frente a la infección viral con ZIKV en ratones AG129, es decir, a dosis altas de compuesto la infección se exagera mientras que a dosis bajas la infección se atenúa.

Este llamativo resultado podría relacionarse con una de las principales actividades biológicas que presenta la anisomicina. Por un lado, se sabe que a altas concentraciones la anisomicina es un inhibidor de la síntesis de proteínas y en este sentido se ha reportado que la administración de anisomicina en un rango de concentraciones entre 150 mg/kg y 22 mg/kg por vía s.c. en ratones C57B1/JF provoca una inhibición transitoria y dosis dependiente de la síntesis de proteínas celulares (Flood y col., 1973, Wanisch y col., 2008). No se encontraron reportes de este tipo para dosis de anisomicina menores a 22 mg/kg. Por otra parte, ensayos realizados en cultivos celulares demostraron que algunos flavivirus, entre ellos DENV y ZIKV, provocan la inhibición de la síntesis de proteínas celulares a medida que la infección progresa sin que la síntesis de proteínas virales se vea afectada. Se ha propuesto que el virus utilizaría un mecanismo de traducción no canónico que le permitiría proseguir con la traducción de la poliproteína viral (Roth y col., 2017). Por lo tanto, se puede plantear como posible explicación para los resultados obtenidos en el modelo *in vivo* para ZIKV que el

tratamiento con la dosis alta de anisomicina, capaz de inhibir la síntesis de proteínas celulares, resultaría ventajoso para la multiplicación del virus, el cual podría emplear un mecanismo alternativo de traducción. Por otro lado, la dosis baja de anisomicina, tendría un menor efecto sobre la síntesis de proteínas celulares por lo cual es posible evidenciar su efecto inhibitorio sobre la multiplicación viral, que conduciría a la disminución de la viremia y al retraso en la mortalidad. Se podría entonces especular que a dosis de anisomicina menores a las empleadas en este trabajo se podría evitar el efecto adverso del compuesto sobre la síntesis de proteínas celulares predominando su capacidad de inhibir la multiplicación de viral.

En este trabajo demostramos que la anisomicina presenta una consistente actividad antiviral frente a DENV y ZIKV en cultivos celulares y que dicha actividad se extiende a otros flavivirus. Sin embargo, en el modelo animal de infección por ZIKV la anisomicina no previno la mortalidad y mostró un efecto reverso ya que solamente la dosis más baja de compuesto empleada redundó en un beneficio mínimo para los animales. Estos estudios ponen en evidencia que a pesar de que la anisomicina es capaz de inhibir de manera selectiva y a muy bajas concentraciones la multiplicación viral, la compleja interacción de los diferentes factores involucrados en un modelo animal afecta la eficacia del compuesto *in vivo*. Resultaría interesante poder continuar estos estudios planteando nuevos esquemas de tratamiento que impliquen el empleo de dosis de compuesto menores a las ensayadas en este trabajo con el objeto de determinar si es factible lograr un efecto protector frente a ZIKV en este modelo animal. Por último, es de destacar que si bien existían algunos pocos reportes del efecto de la anisomicina sobre la multiplicación de virus en cultivos celulares este es el primer trabajo en el cual se analiza su actividad antiviral en un modelo *in vivo*.

# *Conclusiones*

El objetivo general dentro del cual se enmarca este trabajo es la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antiviral frente a DENV y ZIKV. En el capítulo 1, se estudió la actividad antiviral frente a DENV de una serie de  $\beta$ -carbolicinas, compuestos conocidos por exhibir una gran diversidad de actividades biológicas, que hasta el momento de la realización de esta tesis no habían sido caracterizados respecto a su actividad antiviral frente a los flavivirus. En el capítulo 2, se evaluó la actividad antiviral de la anisomicina, un conocido inhibidor de la síntesis de proteínas y activador de las vías p38 MAPK y JNK MAPK, frente a distintos flavivirus. Por otra parte se analizó su modo de acción frente a DENV y se evaluó su actividad antiviral en un modelo *in vivo* frente a ZIKV. A continuación, se presentan las principales conclusiones que se desprenden del presente trabajo.

- Los ensayos *in vitro* realizados con un grupo de  $\beta$ -carbolicinas naturales y sintéticas permitieron identificar algunas características estructurales de estas moléculas que serían relevantes para su actividad citotóxica y su efecto antiviral frente DENV-2 en cultivos celulares.
- Los diferentes serotipos virales mostraron una susceptibilidad variable frente a los compuestos activos, harmol y 9N-metilharmina, los cuales exhibieron mayor efecto inhibitorio frente a DENV-2. Los compuestos no mostraron efecto virucida y tampoco afectaron las etapas iniciales de la multiplicación viral ni las actividades enzimáticas de la proteína viral NS5.
- El análisis más detallado del modo de acción antiviral de la 9N-metilharmina frente a DENV-2 permitió determinar que su efecto estaba relacionado con la maduración y egreso de las partículas virales. Se descartó que su mecanismo de acción estuviera vinculado a la inhibición de la vía p38 MAPK.
- Por su parte la anisomicina inhibió de manera contundente y selectiva la multiplicación de los cuatro serotipos de DENV y de aislamientos clínicos de DENV-2 en cultivos de células Vero. La multiplicación de DENV-2 en cultivos celulares de origen humano también fue susceptible a la acción de este compuesto, el cual exhibió un marcado efecto inhibitorio frente a DENV-2 en cultivos infectados con un rango amplio de multiplicidades de infección.

- Se determinó que la anisomicina inhibe la síntesis de macromoléculas virales sin alterar la entrada y el desnudamiento viral ni la funcionalidad de la proteína viral NS5. Se obtuvieron además algunas evidencias experimentales que sugieren una posible vinculación entre la actividad de este compuesto y su capacidad de activar a la vía p38 MAPK, pero es necesario continuar con este análisis a fin de establecer de forma concluyente si existe una relación entre estas dos propiedades biológicas de la anisomicina.
- La evaluación de la actividad antiviral de la anisomicina frente a otros virus permitió establecer que el compuesto inhibe la multiplicación de varios miembros del género *Flavivirus*, sin afectar la de otros virus no relacionados, mostrando entonces que su efecto no es inespecífico y estaría asociado a alguna propiedad o característica común compartida por algunos flavivirus.
- El estudio de la actividad antiviral de la anisomicina frente a ZIKV en un modelo animal demostró un efecto reverso del compuesto, ya que a una dosis alta la anisomicina exacerbó los signos de enfermedad y el nivel de viremia, mientras que la menor dosis de compuesto ensayada provocó el retraso de la muerte de los animales y una disminución significativa de la carga viral respecto a los animales tratados con placebo.

Nuestros resultados permitieron identificar nuevas moléculas con efecto antiviral frente a DENV que exhiben diferentes mecanismos de acción y representan un punto de partida promisorio para futuros desarrollos, ante la carencia de agentes específicos y selectivos frente a este virus. La anisomicina presentó además actividad frente a otros flavivirus y el estudio realizado *in vivo* en un modelo de infección por ZIKV constituye un primer paso fundamental para poder evaluar la potencialidad de este compuesto en el tratamiento de las enfermedades causadas por este grupo de virus de incidencia creciente a nivel nacional y mundial.

# *Bibliografía*

- 
- Abrams RPM, Solis J, Nath A. Therapeutic Approaches for Zika Virus Infection of the Nervous System. *Neurotherapeutics*. 2017 Oct;14(4):1027-1048.
- Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Gen Virol*. 2008 Feb; 89(Pt 2):4
- Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. *Cell Microbiol*. 2009 Oct; 11(10):1533-49.
- Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Infectious dengue-1 virus entry into mosquito C6/36 cells. *Virus Res*. 2011 Sep; 160(1-2):173-9.
- Acosta EG, Kumar A, Bartenschlager R. Revisiting dengue virus-host cell interaction: new insights into molecular and cellular virology. *Adv Virus Res*. 2014; 88:1-109.
- Acosta EG, Bartenschlager R. Paradoxical role of antibodies in dengue virus infections: considerations for prophylactic vaccine development. *Expert Rev Vaccines*. 2016; 15(4):467-82.
- Alvarez DE, De Lella Ezcurra AL, Fucito S, Gamarnik AV. Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology*. 2005 Sep 1; 339(2):200-12.
- Aniszewski, T. *Alkaloids - secrets of life: Alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role*. Amsterdam: Elsevier, 2007.
- Armstrong N, Hou W, Tang Q. Biological and historical overview of Zika virus. *World J Virol*. 2017 Feb 12; 6(1):1-8. doi: 10.5501/wjv.v6.i1.1.
- Ashok P, Chander S, Balzarini J, Pannecouque C, Murugesan S. Design, synthesis of new  $\beta$ -carboline derivatives and their selective anti-HIV-2 activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015 Mar 15; 25(6):1232-5.
- Avilés G, Rangeón G, Vorndam V, Briones A, Baroni P, Enria D, Sabattini MS. Dengue reemergence in Argentina. *Emerg Infect Dis*. 1999 Jul-Aug; 5(4): 575–578.

- Barbacid M, Vazquez D. (3H)anisomycin binding to eukaryotic ribosomes. *J Mol Biol.* 1974 Apr 25;84(4):603-23.
- Barbosa VA, Baréa P, Mazia RS, Ueda-Nakamura T, Costa WFD, Foglio MA, Goes Ruiz ALT, Carvalho JE, Vendramini-Costa DB, Nakamura CV, Sarragiotto MH. Synthesis and evaluation of novel hybrids  $\beta$ -carboline-4-thiazolidinones as potential antitumor and antiviral agents. *Eur J Med Chem.* 2016 Nov 29; 124:1093-1104.
- Barral K, Sallamand C, Petzold C, Coutard B, Collet A, Thillier Y, Zimmermann J, Vasseur JJ, Canard B, Rohayem J, Debart F, Decroly E. Development of specific dengue virus 2'-O- and N7-methyltransferase assays for antiviral drug screening. *Antiviral Res.* 2013 Sep; 99(3):292-300.
- Baud D, Gubler DJ, Schaub B, Lanteri MC, Musso D. An update on Zika virus infection. *Lancet.* 2017 Nov 4; 390(10107):2099-2109.
- Begum, S., Hassan, S.I., Siddiqui, B.S. Synthesis and antimycobacterial activity of some beta-carboline alkaloids. *Nat Prod Res.* 2004 Aug;18(4):341-7.
- Benzekri R, Bouslama L, Papetti A, Hammami M, Smaoui A, Limam F. Anti HSV-2 activity of *Peganum harmala* (L.) and isolation of the active compound. *Microb Pathog.* 2017 Dec 6; 114:291-298.
- Benmansour F, Eydoux C, Querat G, de Lamballerie X, Canard B, Alvarez K, Guillemot JC, Barral K. Novel 2-phenyl-5-[(E)-2-(thiophen-2-yl)ethenyl]-1,3,4-oxadiazole and 3-phenyl-5-[(E)-2-(thiophen-2-yl)ethenyl]-1,2,4-oxadiazole derivatives as dengue virus inhibitors targeting NS5 polymerase. *Eur J Med Chem.* 2016 Feb 15; 109:146-56.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013 Apr; 25; 496(7446):504-7.
- Boldescu V, Behnam MAM, Vasilakis N, Klein CD. Broad-spectrum agents for flaviviral infections: dengue, Zika and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 2017 Aug; 16(8):565-586

- 
- Brahmbhatt KG, Ahmed N, Sabde S, Mitra D, Singh IP, Bhutani KK. Synthesis and evaluation of  $\beta$ -carboline derivatives as inhibitors of human immunodeficiency virus. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010 Aug 1; 20(15):4416-9.
- Brand C, Bisailon M, Geiss BJ. Organization of the Flavivirus RNA replicase complex. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2017 Nov; 8(6).
- Brecher M, Li Z, Liu B, Zhang J, Koetzner CA, Alifarag A, Jones SA, Lin Q, Kramer LD, Li H. A conformational switch high-throughput screening assay and allosteric inhibition of the flavivirus NS2B-NS3 protease. *PLoS Pathog*. 2017 May 25; 13(5):e1006411.
- Bujalowski PJ, Bujalowski W, Choi KH. Interactions between the Dengue Virus Polymerase NS5 and Stem-Loop A. *J Virol*. 2017 May 12; 91(11).
- Burlaud-Gaillard J, Sellin C, Georgeault S, Uzbekov R, Lebos C, Guillaume JM, Roingard P. Correlative scanning-transmission electron microscopy reveals that a chimeric flavivirus is released as individual particles in secretory vesicles. *PLoS One*. 2014 Mar 28;9(3):e93573.
- Byk LA, Gamarnik AV. Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid Protein. *Annu Rev Virol*. 2016a Sep 29; 3(1):263-281.
- Byk LA, Iglesias NG, De Maio FA, Gebhard LG, Rossi M, Gamarnik AV. Dengue Virus Genome Uncoating Requires Ubiquitination. *MBio*. 2016b Jun 28; 7(3). pii: e00804-16.
- Cao, R., Chen, Q., Hou, X., Chen, H., Guan, H., Ma, Y., Peng, W., Xu, A. Synthesis, acute toxicities, and antitumor effects of novel 9-substituted beta-carboline derivatives. *Bioorg Med Chem*. 2004 Sep 1; 12(17):4613-23.
- Cao, R., Chen, H., Peng, W., Ma, Y., Hou, X., Guan, H., Liu, X., Xu, A. Design, synthesis and in vitro and in vivo antitumor activities of novel beta-carboline derivatives. *Eur J Med Chem*. 2005 Oct; 40(10):991-1001.
- Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, Sall AA, Musso D. Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis*. 2014 Jun; 20(6):1085-6.
- Castilla V, Piccini LE, Damonte EB. Dengue virus entry and trafficking: perspectives as antiviral target for prevention and therapy. *Future Virology* 2015; 10(5): 625-45.

- 
- Ceballos-Olvera I, Chávez-Salinas S, Medina F, Ludert JE, del Angel RM. JNK phosphorylation, induced during dengue virus infection, is important for viral infection and requires the presence of cholesterol. *Virology*. 2010 Jan 5; 396(1):30-6.
  - Chang CC, Ou YC, Raung SL, Chen CJ. Antiviral effect of dehydroepiandrosterone on Japanese encephalitis virus infection. *J Gen Virol*. 2005 Sep;86(Pt 9):2513-23.
  - Chen D, Cai J, Yin J, Jiang J, Jing C, Zhu Y, Cheng J, Di Y, Zhang Y, Cao M, Li S, Peng Z, Hao X. Lycorine-derived phenanthridine downregulators of host Hsc70 as potential hepatitis C virus inhibitors. *Future Med Chem*. 2015a;7(5):561-70.
  - Chen D, Su A, Fu Y, Wang X, Lv X, Xu W, Xu S, Wang H, Wu Z. Harmine blocks herpes simplex virus infection through downregulating cellular NF- $\kappa$ B and MAPK pathways induced by oxidative stress. *Antiviral Res*. 2015b Nov; 123:27-38.
  - Chen Q, Chao R, Chen H, Hou X, Yan H, Zhou S, Peng W, Xu A. Antitumor and neurotoxic effects of novel harmine derivatives and structure-activity relationship analysis. *Int J Cancer*. 2005 May 1;114(5):675-82.
  - Chen YL, Abdul Ghafar N, Karuna R, Fu Y, Lim SP, Schul W, Gu F, Herve M, Yokohama F, Wang G, Cerny D, Fink K, Blasco F, Shi PY. Activation of peripheral blood mononuclear cells by dengue virus infection depotentiates balapiravir. *J Virol*. 2014 Feb; 88(3):1740-7.
  - Chen Z, Lin X, Zhang Z, Huang J, Fu S, Huang R. EXO70 protein influences dengue virus secretion. *Microbes Infect*. 2011 Feb;13(2):143-50.
  - Choy MM, Zhang SL, Costa VV, Tan HC, Horrevorts S, Ooi EE. Proteasome Inhibition Suppresses Dengue Virus Egress in Antibody Dependent Infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Nov 13;9(11):e0004058.
  - Cook S, Moureau G, Kitchen A, Gould EA, de Lamballerie X, Holmes EC, Harbach RE. Molecular evolution of the insect-specific flaviviruses. *J Gen Virol*. 2012 Feb; 93(Pt 2):223-34.
  - Courageot MP, Frenkiel MP, Dos Santos CD, Deubel V, Desprès P. Alpha-glucosidase inhibitors reduce dengue virus production by affecting the initial steps of virion morphogenesis in the endoplasmic reticulum. *J Virol*. 2000 Jan;74(1):564-72.

- 
- Croons V, Martinet W, Herman AG, Timmermans JP, De Meyer GR. The protein synthesis inhibitor anisomycin induces macrophage apoptosis in rabbit atherosclerotic plaques through p38 mitogen-activated protein kinase. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009 Jun; 329(3):856-64.
- Cruz-Oliveira C, Freire JM, Conceição TM, Higa LM, Castanho MA, Da Poian AT. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiol Rev*. 2015 Mar; 39(2):155-70.
- D'Souza-Schorey C, Chavier P. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 May;7(5):347-58.
- Deng YQ, Zhang NN, Li CF, Tian M, Hao JN, Xie XP, Shi PY, Qin CF. Adenosine Analog NITD008 Is a Potent Inhibitor of Zika Virus. *Open Forum Infect Dis*. 2016 Aug 30;3(4):ofw175. eCollection 2016 Oct.
- Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1952 Sep; 46(5):509-20.
- Dong H, Chang DC, Xie X, Toh YX, Chung KY, Zou G, Lescar J, Lim SP, Shi PY. Biochemical and genetic characterization of dengue virus methyltransferase. *Virology*. 2010 Sep 30; 405(2):568-78.
- Dowd KA, DeMaso CR, Pelc RS, Speer SD, Smith ARY, Goo L, Platt DJ, Mascola JR, Graham BS, Mulligan MJ, Diamond MS, Ledgerwood JE, Pierson TC. Broadly Neutralizing Activity of Zika Virus-Immune Sera Identifies a Single Viral Serotype. *Cell Rep*. 2016 Aug 9;16(6):1485-1491.
- Dubayle J, Vialle S, Schneider D, Pontvianne J, Mantel N, Adam O, Guy B, Talaga P. Site-specific characterization of envelope protein N-glycosylation on Sanofi Pasteur's tetravalent CYD dengue vaccine. *Vaccine*. 2015 Mar 10; 33(11):1360-8.
- Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, Pretrick M, Marfel M, Holzbauer S, Dubray C, Guillaumot L, Griggs A, Bel M, Lambert AJ, Laven J, Kosoy O, Panella A, Biggerstaff BJ, Fischer M, Hayes EB. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*. 2009 Jun 11; 360(24):2536-43.

- 
- Elong Ngonu A, Shresta S. Immune Response to Dengue and Zika. Immune Response to Dengue and Zika. *Annu Rev Immunol.* 2018 Jan 18.
  - Epelboin Y, Talaga S, Epelboin L, Dusfour I. Zika virus: An updated review of competent or naturally infected mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Nov 16; 11(11):e0005933.
  - Feinberg MB, Ahmed R. Advancing dengue vaccine development. *Science.* 2017 Nov 17;358(6365):865-866.
  - Filomatori CV, Lodeiro MF, Alvarez DE, Samsa MM, Pietrasanta L, Gamarnik AV. A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes Dev.* 2006 Aug 15; 20(16):2238-49.
  - Flood JF, Rosenzweig MR, Bennett EL, Orme AE. The influence of duration of protein synthesis inhibition on memory. *Physiol Behav.* 1973 Mar; 10(3):555-62.
  - García CC, Quintana VM, Castilla V, Damonte EB. Towards host-cell-targeting therapies to treat dengue virus infections. *Frontiers in anti-infective drug discovery.* 2017; 7:1-43.
  - Guzman MG, Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Montes T, Vazquez S, Morier L, Alvarez A, Gould EA, Kouri G, Halstead SB. Neutralizing antibodies after infection with dengue 1 virus. *Emerg Infect Dis.* 2007 Feb; 13(2):282-6.
  - Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martínez E, Nathan MB, Pelegriño JL, Simmons C, Yoksan S, Peeling RW. Dengue: A continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Dec; 8(12 Suppl):S7-16.
  - Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet.* 2015 Jan 31; 385(9966):453-65.
  - Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB. Dengue infection. *Nat Rev Dis Primers.* 2016 Aug 18; 2:16055
  - Hadinegoro SR, Arredondo-García JL, Capeding MR, Deseda C, Chotpitayasunondh T, Dietze R, Muhammad Ismail HI, Reynales H, Limkittikul K, Rivera-Medina DM, Tran HN, Bouckennooghe A, Chansinghakul D, Cortés M, Fanouillere K, Forrat R, Frago C, Gailhardou S, Jackson N, Noriega F, Plennevaux E, Wartel TA, Zambrano B, Saville M; CYD-TDV Dengue Vaccine Working Group. Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. *N Engl J Med.* 2015 Sep 24; 373(13):1195-206.

- 
- Hall SS, Loebenberg D, Schumacher DP. Structure-activity relationships of synthetic antibiotic analogues of anisomycin. *J Med Chem.* 1983 Apr;26(4):469-75.
  - Halstead SB, Russell PK. Protective and immunological behavior of chimeric yellow fever dengue vaccine. *Vaccine.* 2016 Mar 29; 34(14):1643-7.
  - Hansen JL, Moore PB, Steitz TA. Structures of five antibiotics bound at the peptidyl transferase center of the large ribosomal subunit. *J Mol Biol.* 2003 Jul 25;330(5):1061-75.
  - Heinz FX, Stiasny K. The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2017 Feb 8;81(1). pii: e00055-16.
  - Hori T, Kondo T, Tabuchi Y, Takasaki I, Zhao QL, Kanamori M, Yasuda T, Kimura T. Molecular mechanism of apoptosis and gene expressions in human lymphoma U937 cells treated with anisomycin. *Chem Biol Interact.* 2008 Mar 27; 172(2):125-40.
  - Huerta-Zepeda A, Cabello-Gutiérrez C, Cime-Castillo J, Monroy-Martínez V, Manjarrez-Zavala ME, Gutiérrez-Rodríguez M, Izaguirre R, Ruiz-Ordaz BH. Crosstalk between coagulation and inflammation during Dengue virus infection. *Thromb Haemost.* 2008 May; 99(5):936-43.
  - Ishida J, Wang HK, Oyama M, Cosentino ML, Hu CQ, Lee KH. Anti-AIDS agents. 46. Anti-HIV activity of harman, an anti-HIV principle from *Symplocos setchuensis*, and its derivatives. *J Nat Prod.* 2001 Jul;64(7):958-60.
  - Jahaniani F, Ebrahimi SA, Rahbar-Roshandel N, Mahmoudian M. Xanthomicrol is the main cytotoxic component of *Dracocephalum kotschyii* and a potential anti-cancer agent. *Phytochemistry.* 2005 Jul;66(13):1581-92.
  - Jiang X, Zou J, Zhuang Y, Yuan W, Zhu L, Zhu G. The Antiviral Effects of Harmine Against BoHV-1 Infection In Vitro. *Lett Drug Des Discov.* 2017 14: 1303-1307.
  - Julander JG, Siddharthan V, Evans J, Taylor R, Tolbert K, Apuli C, Stewart J, Collins P, Gebre M, Neilson S, Van Wettere A, Lee YM, Sheridan WP, Morrey JD, Babu YS. Efficacy of the broad-spectrum antiviral compound BCX4430 against Zika virus in cell culture and in a mouse model. *Antiviral Res.* 2017 Jan;137:14-22.

- 
- Kanlaya R, Pattanakitsakul SN, Sinchaikul S, Chen ST, Thongboonkerd V. The ubiquitin-proteasome pathway is important for dengue virus infection in primary human endothelial cells. *J Proteome Res.* 2010 Oct 1;9(10):4960-71.
  - Kapoor M, Zhang L, Ramachandra M, Kusukawa J, Ebner KE, Padmanabhan R. Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. *J Biol Chem.* 1995 Aug 11;270(32):19100-6.
  - Kaptein SJ, Neyts J. Towards antiviral therapies for treating dengue virus infections. *Curr Opin Pharmacol.* 2016 Oct;30:1-7.
  - Karyala P, Metri R, Bathula C, Yelamanchi SK, Sahoo L, Arjunan S, Sastri NP, Chandra N. DenHunt - A Comprehensive Database of the Intricate Network of Dengue-Human Interactions. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Sep 12;10(9):e0004965.
  - Keelapang P, Sriburi R, Supasa S, Panyadee N, Songjaeng A, Jairungsri A, Puttikhunt C, Kasinrek W, Malasit P, Sittisombut N. Alterations of pr-M cleavage and virus export in pr-M junction chimeric dengue viruses. *J Virol.* 2004 Mar;78(5):2367-81.
  - Keshet Y, Seger R. The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol.* 2010; 661:3-38.
  - Krause KK, Azouz F, Shin OS, Kumar M. Understanding the Pathogenesis of Zika Virus Infection Using Animal Models. *Immune Netw.* 2017 Oct; 17(5):287-297.
  - Kublin JL, Whitney JB. Zika virus research models. *Virus Res.* 2017 Aug 12. pii: S0168-1702(17)30622-6.
  - Kudelko M, Brault JB, Kwok K, Li MY, Pardigon N, Peiris JS, Bruzzone R, Desprès P, Nal B, Wang PG. Class II ADP-ribosylation factors are required for efficient secretion of dengue viruses. *J Biol Chem.* 2012 Jan 2;287(1):767-77.
  - Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell.* 2002 Mar 8; 108(5):717-25.

- 
- Lai JH, Lin YL, Hsieh SL. Pharmacological intervention for dengue virus infection. *Biochem Pharmacol.* 2017 Apr 1;129:14-25.
- Liao CL, Lin YL, Wu BC, Tsao CH, Wang MC, Liu CI, Huang YL, Chen JH, Wang JP, Chen LK. Salicylates inhibit flavivirus replication independently of blocking nuclear factor kappa B activation. *J Virol.* 2001 Sep; 75(17):7828-39.
- Liu Y, Ge J, Li Q, Guo X, Gu L, Ma ZG, Li XH, Zhu YP. Low-dose anisomycin sensitizes glucocorticoid-resistant T-acute lymphoblastic leukemia CEM-C1 cells to dexamethasone-induced apoptosis through activation of glucocorticoid receptor and p38-MAPK/JNK. *Leuk Lymphoma.* 2014 Sep;55(9):2179-88.
- Low JG, Ooi EE, Vasudevan SG. Current Status of Dengue Therapeutics Research and Development. *J Infect Dis.* 2017 Mar 1;215(suppl\_2):S96-S102.
- LYNCH JE, ENGLISH AR, MORRISON J, MAVEN I. Protective action of anisomycin in mice infected with *Trichomonas foetus*. *Antibiot Chemother (Northfield).* 1954 Aug;4(8):899-904.
- Ma L, Jones CT, Groesch TD, Kuhn RJ, Post CB. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 9; 101(10):3414-9.
- Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, Bhatt S, Katzelnick L, Howes RE, Battle KE, Simmons CP, Hay SI. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol.* 2014 Mar; 22(3):138-46.
- Miller JF, Turner EM, Sherrill RG, Gudmundsson K, Spaltenstein A, Sethna P, Brown KW, Harvey R, Romines KR, Golden P. Substituted tetrahydro- $\beta$ -carbolines as potential agents for the treatment of human papillomavirus infection. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010 Jan 1; 20(1):256-9.
- Ministerio de Salud, Argentina. Boletín integrado de vigilancia N393 SE01. 2018. Disponible en: [http://www.msal.gob.ar/images/stories/boletines/BIV\\_393\\_SE01](http://www.msal.gob.ar/images/stories/boletines/BIV_393_SE01)
- Mittal R, Nguyen D, Debs LH, Patel AP, Liu G, Jhaveri VM, S Kay SI, Mittal J, Bandstra ES, Younis RT, Chapagain P, Jayaweera DT, Liu XZ. Zika Virus: An Emerging Global Health Threat. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017 Dec 8; 7:486.

- 
- Morabito KM, Graham BS. Zika Virus Vaccine Development. *J Infect Dis.* 2017 Dec 16; 216(suppl\_10):S957-S963.
  - Morrison TE, Diamond MS. Animal Models of Zika Virus Infection, Pathogenesis, and Immunity. *J Virol.* 2017 Mar 29;91(8). pii: e00009-17.
  - Nagila A, Netsawang J, Suttitheptumrong A, Morchang A, Khunchai S, Srisawat C, Puttikhunt C, Noisakran S, Yenchitsomanus PT, Limjindaporn T. Inhibition of p38MAPK and CD137 signaling reduce dengue virus-induced TNF- $\alpha$  secretion and apoptosis. *Virol J.* 2013 Apr 4; 10:105.
  - Nazari Formagio AS, Santos PR, Zanolli K, Ueda-Nakamura T, Düsman Tonin LT, Nakamura CV, Sarragiotto MH. Synthesis and antiviral activity of  $\beta$ -carboline derivatives bearing a substituted carbonylhydrazide at C-3 against poliovirus and herpes simplex virus (HSV-1). *Eur J Med Chem.* 2009 Nov; 44(11):4695-701.
  - Noisakran S, Onlamoon N, Songprakhon P, Hsiao HM, Chokeyphaibulkit K, Perng GC Cells in dengue virus infection in vivo. *Adv Virol.* 2010; 2010:164878.
  - OhAinle M, Balmaseda A, Macalalad AR, Tellez Y, Zody MC, Saborío S, Nuñez A, Lennon NJ, Birren BW, Gordon A, Henn MR, Harris E. Dynamics of dengue disease severity determined by the interplay between viral genetics and serotype-specific immunity. *Sci Transl Med.* 2011 Dec 21; 3(114):114ra128.
  - Pantoja P, Pérez-Guzmán EX, Rodríguez IV, White LJ, González O, Serrano C, Giavedoni L, Hodara V, Cruz L, Arana T, Martínez MI, Hassert MA, Brien JD, Pinto AK, de Silva A, Sariol CA. Zika virus pathogenesis in rhesus macaques is unaffected by pre-existing immunity to dengue virus. *Nat Commun.* 2017 Jun 23; 8:15674.
  - Paul LM, Carlin ER, Jenkins MM, Tan AL, Barcellona CM, Nicholson CO, Michael SF, Isern S. Dengue virus antibodies enhance Zika virus infection. *Clin Transl Immunology.* 2016 Dec 16; 5(12):e117.
  - Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol.* 2008 Aug; 11(4):369-77.

- 
- Piccini LE, Castilla V, Damonte EB. Dengue-3 Virus Entry into Vero Cells: Role of Clathrin-Mediated Endocytosis in the Outcome of Infection. *PLoS One*. 2015 Oct 15; 10(10):e0140824
  - Priyamvada L, Hudson W, Ahmed R, Wrammert J. Humoral cross-reactivity between Zika and dengue viruses: implications for protection and pathology. *Emerg Microbes Infect*. 2017 May 10;6(5):e33.
  - Randolph VB, Winkler G, Stollar V. Acidotropic amines inhibit proteolytic processing of flavivirus prM protein. *Virology*. 1990 Feb;174(2):450-8.
  - Rathore AP, Paradkar PN, Watanabe S, Tan KH, Sung C, Connolly JE, Low J, Ooi EE, Vasudevan SG. Celgosivir treatment misfolds dengue virus NS1 protein, induces cellular pro-survival genes and protects against lethal challenge mouse model. *Antiviral Res*. 2011 Dec;92(3):453-60.
  - Rivino L, Lim MQ. CD4+ and CD8+ T-cell immunity to Dengue - lessons for the study of Zika virus. *Immunology*. 2017 Feb; 150(2):146-154.
  - Robinson ML, Durbin AP. Dengue vaccines: implications for dengue control. *Curr Opin Infect Dis*. 2017 Oct; 30(5):449-454.
  - Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Partial maturation: an immune-evasion strategy of dengue virus? *Trends Microbiol*. 2011 May;19(5):248-54.
  - Roth H, Magg V, Uch F, Mutz P, Klein P, Haneke K, Lohmann V, Bartenschlager R, Fackler OT, Locker N, Stoecklin G, Ruggieri A. Flavivirus Infection Uncouples Translation Suppression from Cellular Stress Responses. *MBio*. 2017 Jan 10; 8(1). pii: e02150-16.
  - Rothan HA, Mohamed Z, Paydar M, Rahman NA, Yusof R. Inhibitory effect of doxycycline against dengue virus replication in vitro. *Arch Virol*. 2014 Apr;159(4):711-8.
  - Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol*. 2011 Jul 15; 11(8):532-43.
  - Salim MT, Goto Y, Hamasaki T, Okamoto M, Aoyama H, Hashimoto Y, Musiu S, Paeshuyse J, Neyts J, Froeyen M, Herdewijn P, Baba M. Highly potent and selective inhibition of bovine

viral diarrhea virus replication by  $\gamma$ -carboline derivatives. *Antiviral Res.* 2010 Dec; 88(3):263-8.

- Sayce AC, Alonzi DS, Killingbeck SS, Tyrrell BE, Hill ML, Caputo AT, Iwaki R, Kinami K, Ide D, Kiappes JL, Beatty PR, Kato A, Harris E, Dwek RA, Miller JL, Zitzmann N. Iminosugars Inhibit Dengue Virus Production via Inhibition of ER Alpha-Glucosidases--Not Glycolipid Processing Enzymes. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Mar 14;10(3):e0004524.

- Selisko B, Dutartre H, Guillemot JC, Debarnot C, Benarroch D, Khromykh A, Desprès P, Egloff MP, Canard B. Comparative mechanistic studies of de novo RNA synthesis by flavivirus RNA-dependent RNA polymerases. *Virology.* 2006 Jul 20; 351(1):145-58.

- Sfecci E, Lacour T, Amade P, Mehiri M. Polycyclic Guanidine Alkaloids from Poecilosclerida Marine Sponges. *Mar Drugs.* 2016 Apr 9; 14(4). pii: E77. doi: 10.3390/md14040077.

- Sepúlveda CS, Fascio ML, Mazzucco MB, Palacios ML, Pellón RF, García CC, D'Accorso NB, Damonte EB. Synthesis and evaluation of N-substituted acridones as antiviral agents against haemorrhagic fever viruses. *Antivir Chem Chemother.* 2008;19(1):41-7.

- Shankar A, Patil AA, Skariyachan S. Recent Perspectives on Genome, Transmission, Clinical Manifestation, Diagnosis, Therapeutic Strategies, Vaccine Developments, and Challenges of Zika Virus Research. *Front Microbiol.* 2017 Sep 14;8:1761.

- Shannon AE, Pedroso MM, Chappell KJ, Watterson D, Liebscher S, Kok WM, Fairlie DP, Schenk G, Young PR. Product release is rate-limiting for catalytic processing by the Dengue virus protease. *Sci Rep.* 2016 Nov 29; 6:37539.

- Simpson DI. Zika virus infection in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1964 Jul; 58:335-8.

- Singh I, Helenius A. Role of ribosomes in Semliki Forest virus nucleocapsid uncoating. *J Virol.* 1992 Dec; 66(12):7049-58.

- Sreekanth GP, Chuncharunee A, Sirimontaporn A, Panaampon J, Noisakran S, Yenichitsomanus PT, Limjindaporn T. SB203580 Modulates p38 MAPK Signaling and Dengue Virus-Induced Liver Injury by Reducing MAPKAPK2, HSP27, and ATF2 Phosphorylation. *PLoS One.* 2016 Feb 22; 11(2):e0149486.

- 
- Srikiatkachorn A, Mathew A, Rothman AL. Immune-mediated cytokine storm and its role in severe dengue. *Semin Immunopathol.* 2017 Jul; 39(5):563-574.
  - Stadheim TA, Kucera GL. c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for mitoxantrone- and anisomycin-induced apoptosis in HL-60 cells. *Leuk Res.* 2002 Jan;26(1):55-65.
  - Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, Graham V, Cassotta A, Bianchi S, Vanzetta F, Minola A, Jaconi S, Mele F, Foglierini M, Pedotti M, Simonelli L, Dowall S, Atkinson B, Percivalle E, Simmons CP, Varani L, Blum J, Baldanti F, Cameroni E, Hewson R, Harris E, Lanzavecchia A, Sallusto F, Corti D. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science.* 2016 Aug 19; 353(6301):823-6.
  - Suksanpaisan L, Susantad T, Smith DR. Characterization of dengue virus entry into HepG2 cells. *J Biomed Sci.* 2009 Feb 4; 16:17.
  - Sung C, Wei Y, Watanabe S, Lee HS, Khoo YM, Fan L, Rathore AP, Chan KW, Choy MM, Kamaraj US, Sessions OM, Aw P, de Sessions PF, Lee B, Connolly JE, Hibberd ML, Vijaykrishna D, Wijaya L, Ooi EE, Low JG, Vasudevan SG. Extended Evaluation of Virological, Immunological and Pharmacokinetic Endpoints of CELADEN: A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Celgosivir in Dengue Fever Patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Aug 10; 10(8):e0004851.
  - Suwanmanee S, Luplertlop N. Dengue and Zika viruses: lessons learned from the similarities between these Aedes mosquito-vectored arboviruses. *J Microbiol.* 2017 Feb; 55(2):81-89.
  - Takhampunya R, Ubol S, Houg HS, Cameron CE, Padmanabhan R. Inhibition of dengue virus replication by mycophenolic acid and ribavirin. *J Gen Virol.* 2006 Jul; 87(Pt 7):1947-52.
  - Talarico LB, Damonte EB. Interference in dengue virus adsorption and uncoating by carrageenans. *Virology.* 2007 Jul 5;363(2):473-85. Epub 2007 Mar 6.
  - Tang Z, Xing F, Chen D, Yu Y, Yu C, Di J, Liu J. In vivo toxicological evaluation of Anisomycin. *Toxicol Lett.* 2012 Jan 5; 208(1):1-11.

- 
- Teramoto T, Balasubramanian A, Choi KH, Padmanabhan R. Serotype-specific interactions among functional domains of dengue virus 2 nonstructural proteins (NS) 5 and NS3 are crucial for viral RNA replication. *J Biol Chem*. 2017 Jun 9; 292(23):9465-9479.
  - Tittarelli E, Mistchenko AS, Barrero PR. Dengue Virus 1 in Buenos Aires from 1999 to 2010: Towards Local Spread. *PLoS One*. 2014; 9(10): e111017.
  - Tittarelli E, B. Lusso SB, Goya S, Rojo GL, Natale MI, Viegas M, Mistchenko AS, Valinotto LE. Dengue Virus 1 Outbreak in Buenos Aires, Argentina, 2016. *Emerg Infect Dis*. 2017 Oct; 23(10): 1684–1685.
  - Tricou V, Minh NN, Van TP, Lee SJ, Farrar J, Wills B, Tran HT, Simmons CP. A randomized controlled trial of chloroquine for the treatment of dengue in Vietnamese adults. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 Aug 10;4(8):e785.
  - Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis*. 2000 Jan; 181(1):2-9.
  - Vu TT, Holmes EC, Duong V, Nguyen TQ, Tran TH, Quail M, Churcher C, Parkhill J, Cardoso J, Farrar J, Wills B, Lennon NJ, Birren BW, Buchy P, Henn MR, Simmons CP. Emergence of the Asian 1 genotype of dengue virus serotype 2 in viet nam: in vivo fitness advantage and lineage replacement in South-East Asia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 Jul 20; 4(7):e757.
  - Waddell LA, Greig JD. Scoping Review of the Zika Virus Literature. *PLoS One*. 2016 May 31; 11(5):e0156376.
  - Wang PG, Kudelko M, Kwok KT, Bruzzone R, Nal B. Cellular enhancing and restricting factors of dengue virus egress. *Hong Kong Med J*. 2014 Aug;20 Suppl 4:44-6.
  - Wang QY, Dong H, Zou B, Karuna R, Wan KF, Zou J, Susila A, Yip A, Shan C, Yeo KL, Xu H, Ding M, Chan WL, Gu F, Seah PG, Liu W, Lakshminarayana SB, Kang C, Lescar J, Blasco F, Smith PW, Shi PY. Discovery of Dengue Virus NS4B Inhibitors. *J Virol*. 2015 Aug;89(16):8233-44.

- 
- Wang YH, Tang JG, Wang RR, Yang LM, Dong ZJ, Du L, Shen X, Liu JK, Zheng YT. Flazinamide, a novel  $\beta$ -carboline compound with anti-HIV actions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Apr 20; 355(4):1091-5. Epub 2007 Feb 23.
- Wangikar P, Martis EAF, Ambre PK, Nandan S and Coutinho EC. Update on Methyltransferase Inhibitors of the Dengue Virus and Further Scope in the Field. *J Infect Dis Pathol*. 2016; 1(2): e 1000108
- Wanisch K, Wotjak CT. Time course and efficiency of protein synthesis inhibition following intracerebral and systemic anisomycin treatment. *Neurobiol Learn Mem*. 2008 Oct; 90(3):485-94.
- Watanabe S, Chan KW, Dow G, Ooi EE, Low JG, Vasudevan SG. Optimizing celgosivir therapy in mouse models of dengue virus infection of serotypes 1 and 2: The search for a window for potential therapeutic efficacy. *Antiviral Res*. 2016 Mar;127:10-9.
- Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P, Fuller SD, Antony C, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe*. 2009 Apr 23; 5(4):365-75.
- Whitehorn J, Simmons CP. The pathogenesis of dengue. *Vaccine*. 2011 Sep 23; 29(42):7221-8.
- World Health Organization. Dengue vaccine: WHO position paper – July 2016. *Wkly Epidemiol Rec*. 2016 Jul 29; 91(30):349-64.
- Xie X, Zou J, Wang QY, Shi PY. Targeting dengue virus NS4B protein for drug discovery. *Antiviral Res*. 2015 Jun; 118:39-45.
- Xie X, Zou J, Shan C, Shi PY. Small Molecules and Antibodies for Zika Therapy. *J Infect Dis*. 2017 Dec 16;216(suppl\_10):S945-S950.
- Xu Z, Chang FR, Wang HK, Kashiwada Y, McPhail AT, Bastow KF, Tachibana Y, Cosentino M, Lee KH. Anti-HIV agents 45(1) and antitumor agents 205.(2) two new sesquiterpenes, leitneridanins A and B, and the cytotoxic and anti-HIV principles from *Leitneria floridana*. *J Nat Prod*. 2000 Dec; 63(12):1712-5.

- 
- Yap SSL, Nguyen-Khuong T, Rudd PM, Alonso S. Dengue Virus Glycosylation: What Do We Know? *Front Microbiol.* 2017 Jul 25; 8:1415.
  - Ye Q, Liu ZY, Han JF, Jiang T, Li XF, Qin CF. Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. *Infect Genet Evol.* 2016 Sep; 43:43-9.
  - Yu IM, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG, Chen J. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science.* 2008 Mar 28; 319(5871):1834-7.
  - Zeidler JD, Fernandes-Siqueira LO, Barbosa GM, Da Poian AT. Non-Canonical Roles of Dengue Virus Non-Structural Proteins. *Viruses.* 2017 Mar 13; 9(3). pii: E42.
  - Zhang X, Ge P, Yu X, Brannan JM, Bi G, Zhang Q, Schein S, Zhou ZH. Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nat Struct Mol Biol.* 2013 Jan; 20(1):105-10.
  - Zhao TC, Zhang L, Liu JT, Guo TL. Disruption of Nox2 and TNFRp55/p75 eliminates cardioprotection induced by anisomycin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012 Nov 15; 303(10):H1263-72.
  - Zhu S, Luo H, Liu H, Ha Y, Mays ER, Lawrence RE, Winkelmann E, Barrett AD, Smith SB, Wang M, Wang T, Zhang W. p38MAPK plays a critical role in induction of a pro-inflammatory phenotype of retinal Müller cells following Zika virus infection. *Antiviral Res.* 2017 Sep; 145:70-81.
  - Zinck R, Cahill MA, Kracht M, Sachsenmaier C, Hipskind RA, Nordheim A. Protein synthesis inhibitors reveal differential regulation of mitogen-activated protein kinase and stress-activated protein kinase pathways that converge on Elk-1. *Mol Cell Biol.* 1995 Sep; 15(9):4930-8.
  - Zmurko J, Marques RE, Schols D, Verbeken E, Kaptein SJ, Neyts J. The Viral Polymerase Inhibitor 7-Deaza-2'-C-Methyladenosine Is a Potent Inhibitor of In Vitro Zika Virus Replication and Delays Disease Progression in a Robust Mouse Infection Model. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 May 10; 10(5):e0004695.

- Zou G, Puig-Basagoiti F, Zhang B, Qing M, Chen L, Pankiewicz KW, Felczak K, Yuan Z, Shi PY. A single-amino acid substitution in West Nile virus 2K peptide between NS4A and NS4B confers resistance to lycorine, a flavivirus inhibitor. *Virology*. 2009 Feb 5; 384(1):242-52.