

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA**

**PROGRAMA DE MAESTRIA  
CORPORACIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS**

**ÉNFASIS VIROLOGÍA**

**NOMBRE DEL PROYECTO**

***Actividad antiviral In vitro e interacciones In silico de alcaloides indólicos aislados de Tabernaemontana cymosa frente a la infección por los virus Zika, Chikungunya y Dengue***

**NOMBRE DEL ESTUDIANTE**

**Laura Milena Monsalve Escudero**

**TUTOR**

**Marlén Martínez Gutiérrez**

**CO-TUTOR**

**Sara Robledo**

**COMITÉ TUTORIAL**

**Wildeman Zapata**

**Elkin Galeano**

**Fredyc Díaz Castillo**

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

**Diciembre de 2019  
Medellín-Colombia**

## Resumen

**Introducción:** Los virus Zika (ZIKV), Chikungunya (CHIKV) y Dengue (DENV) son agentes virales transmitidos por mosquitos del género *Aedes*. El tratamiento disponible para estas virosis es inespecífico, por lo que la búsqueda de compuestos antivirales de origen natural ha cobrado importancia en los últimos años. **Objetivo general:** Evaluar la actividad *in vitro* e interacciones *in silico* de tres alcaloides indólicos aislados de *T. cymosa* frente a la infección por ZIKV, CHIKV y DENV. **Metodología:** Las infecciones se realizaron con cepas de referencia de DENV-2/NG y DENV-2/16681 y aislados clínicos de ZIKV-Acol y CHIKV-Acol. La toxicidad de cada compuesto se evaluó mediante el método MTT en VERO (desde 8,1  $\mu\text{M}$  hasta 271,4  $\mu\text{M}$ ); en células U397 y A549 se evaluó la concentración de uso para Voacangina de 17,1  $\mu\text{M}$  y para Voacangina-OH y Rupicolina de 16,4  $\mu\text{M}$ . Se determinó el potencial antiviral de los alcaloides indólicos mediante estrategia antiviral combinada y se hicieron diferentes estrategias experimentales para identificar el posible paso del ciclo replicativo que está siendo afectado (Pre-tratamiento, Trans-tratamiento y Post-tratamiento). Las partículas virales infecciosas se determinaron por titulación en placa, las copias genómicas se cuantificaron por PCR en tiempo real y la cuantificación de proteína viral se realizó por Cell-ELISA. Se hizo acoplamiento molecular para evaluar la interacción con una proteína estructural (Envoltura) y otra proteína no estructural (NS5 para ZIKV, DENV y NSP2 para CHIKV). **Resultados:** los compuestos tuvieron baja toxicidad a concentraciones menores de 16,4  $\mu\text{M}$  para Voacangina-OH y Rupicolina, y a 17,1  $\mu\text{M}$  para Voacangina en VERO, U937 y A549. Los alcaloides indólicos evaluados demostraron un potencial antiviral contra DENV-2/NG, DENV-2/16681, ZIKV y CHIKV al ser capaz de inhibir las partículas virales infecciosas mediante estrategia antiviral combinada con porcentajes de inhibición superiores a 79,7%. Voacangina inhibió pasos iniciales del ciclo replicativo de CHIKV en la línea celular VERO en un 76,8%, tuvo un posible efecto virucida frente a la cepa DENV-2/NG en la misma línea celular al inhibir partícula viral infecciosa en un 88,7% y además inhibió la infección de ZIKV en pasos previos a la replicación viral en un 86,2%, 100% y 84,8% en VERO, U937 y A549 respectivamente, y en pasos posteriores a la replicación viral en un 80,8% en VERO y en un 100% para U937 y A549, disminuyendo a su vez la síntesis de proteína en las tres líneas celulares evaluadas. Voacangina-OH disminuyó la infección de CHIKV y DENV-2/NG en un 89% y 83,5% en Pre-tratamiento, respectivamente. Además, inhibió partículas virales infecciosas de ZIKV en VERO en un 89% en Pre-tratamiento, 92,4% en Trans-tratamiento y 88,4% Post-tratamiento, adicionalmente disminuyó la infección en Pre-tratamiento en un 100% en U937 y en un 98,2% en A549, y en un 100% en Post-tratamiento en U937 y A549. Voacangina-OH fue capaz de disminuir la síntesis de proteína de ZIKV en las tres líneas celulares evaluadas. Por su parte, Rupicolina fue capaz de inhibir en post-tratamiento a CHIKV en células VERO en un 90,9% sin afectar la síntesis de proteína y a DENV-2/NG en etapas iniciales del ciclo replicativo en VERO 70,4% y en A549 en un 60%. *In silico*, la proteína E de ZIKV, CHIKV y de DENV interactuó con Voacangina, Voacangina-OH y Rupicolina con energías de unión entre -5,1 y -6,9 Kcal/mol. Con la proteína NS5 de ZIKV y DENV y NSP2 de CHIKV con energías de unión entre -6,4 y -7,4 Kcal/mol. El mejor complejo de interacción de la proteína E de DENV y Voacangina fue estable durante 10 ns de simulación en NAMD.

**Conclusión:** Los resultados *in vitro* obtenidos han demostrado que la Voacangina, la Voacangina-OH y la Rupicolina son antivirales promisorios contra la infección por ZIKV, CHIKV y DENV-2, destacando el efecto antiviral de Voacangina-OH frente a la infección por ZIKV en múltiples pasos del ciclo replicativo e independiente de línea celular.

## Abstract

**Introduction:** Zika (ZIKV), Chikungunya (CHIKV) and Dengue (DENV) viruses are viral agents transmitted by *Aedes* mosquitoes. The treatment available for these virosis is nonspecific, so the search for naturally occurring antiviral compounds has gained importance in recent years. **General aim:** To evaluate the *in vitro* activity and *in silico* interactions of three isolated indolic alkaloids from *T. cymosa* against ZIKV, CHIKV and DENV infection. **Methodology:** Infections were performed with reference strains of DENV-2 / NG and DENV-2/16681 and clinical insolation of ZIKV-Acol and CHIKV-Acol. The toxicity of each compound was evaluated by the MTT method in VERO (from 8.1  $\mu\text{M}$  to 271.4  $\mu\text{M}$ ); in U937 and A459 the use concentration for Voacangina of 17.1  $\mu\text{M}$  and for Voacangina-OH and Rupicolina of 16.4  $\mu\text{M}$  was evaluated. The antiviral potential of indole alkaloids was determined by combined antiviral strategy and different experimental strategies were made to identify the possible stages of the replicative cycle that is being affected (Pre-treatment, Trans-treatment and Post-treatment). Infectious viral particles were determined by plaque titration, genomic copies were quantified by real-time PCR and viral protein quantification was performed by Cell-ELISA. Molecular docking was made to evaluate the interaction with a structural protein (envelope) and another non-structural protein (NS5 for ZIKV and DENV and NSP2 for CHIKV). **Results:** the compounds had lower toxicity at concentrations less than 16.4  $\mu\text{M}$  for Voacangina-OH and Rupicolina, and 17.1  $\mu\text{M}$  for Voacangina on VERO, U937 and A549. The indole alkaloids evaluated demonstrated an antiviral potential against DENV-2 / NG, DENV-2/16681, ZIKV and CHIKV by being able to inhibit infectious viral particles by combined antiviral strategy with inhibition rates greater than 79.7%. Voacangina inhibited initial steps of the CHIKV replicative cycle in the VERO cell line by 76.8%; had a possible virucidal effect against the DENV-2 / NG strain in the same cell line by inhibiting infectious viral particle in 88.7%; It also inhibited ZIKV infection in steps prior to viral replication in 86.2%, 100% and 84.8% in VERO, U937 and A549 respectively, and in subsequent steps to viral replication in 80.8% in VERO and 100% for U937 and A549, in turn decreasing protein synthesis in the three cell lines evaluated. Voacangina-OH decreased the infection of CHIKV and DENV-2 / NG by 89% and 83.5% in Pre-treatment, respectively. In addition, it inhibited ZIKV infectious viral particle in VERO by 89% in Pre-treatment, 92.4% in Trans-treatment and 88.4% Post-treatment, additionally decreased infection in Pre-treatment by 100% in U937 and in 98.2% in A549, and in 100% in Post-treatment in U937 and A549. Voacangina-OH was able to decrease the synthesis of ZIKV protein in the three cell lines evaluated. For its part, Rupicolina was able to inhibit CHIKV in VERO cells by 90.9% in post-treatment without affecting protein synthesis and DENV-2 / NG in the early stages of the VERO 70.4% replicative cycle and in A549 by 60%. *In silico* protein E of ZIKV, CHIKV and DENV interacted with Voacangina, Voacangina-OH and Rupicolina with binding energies between -5.1 and -6.9 Kcal / mol. With the NS5 protein of ZIKV and DENV and NSP2 of CHIKV with binding energies between -6.4 and -7.4 Kcal / mol. The best interaction complex of DENV and Voacangin E protein was stable during 10 ns of simulation in NAMD. **Conclusion:** The *in vitro* results obtained have shown that Voacangina, Voacangina-OH and Rupicolina are promising antivirals against ZIKV, CHIKV and DENV-2 infection, highlighting the antiviral effect of Voacangina-OH against ZIKV infection in multiple steps of the replicative cycle and independent of cell line.

# Contenido

1. MARCO TEÓRICO .....	7
1.1 Virus Dengue .....	7
Estructura genómica y proteica de DENV.....	8
Ciclo replicativo de DENV.....	9
Manifestaciones clínicas y patogénesis de DENV. ....	10
1.2 Virus Zika.....	11
Estructura genómica y proteica de ZIKV. ....	12
Ciclo replicativo de ZIKV.....	13
Manifestaciones clínicas y patogénesis de ZIKV.. ....	13
1.3 Virus Chikungunya.....	14
Estructura genómica y proteica de CHIKV.....	15
Ciclo replicativo de CHIKV.....	16
Manifestaciones clínicas y patogénesis de CHIKV. ....	16
1.4 Antivirales.....	17
1.5 <i>Tabernaemontana cymosa</i> .....	18
1.6 Alcaloides de <i>T. cymosa</i> .....	19
1.7. Compuestos tipo Indol.....	19
2. ANTECEDENTES.....	20
2.1. Productos naturales.....	20
2.2. Células .....	22
2.3. Antecedentes del grupo de investigación .....	23
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	23
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	24
5. HIPÓTESIS.....	24
6. OBJETIVO GENERAL: .....	24
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	24
8. ENFOQUE METODOLÓGICO .....	25
9. MÉTODOS.....	25
9.1. Mantenimiento de las células.....	25
9.2. Virus.....	26
9.3. Compuestos.....	26
9.4. Controles positivos de inhibición .....	27
9.5. Ensayo de viabilidad .....	27
9.6. Análisis estadístico: .....	27
10. ESTRATEGIAS ANTIVIRALES <i>IN VITRO</i> .....	28
10.1. Tamizaje antiviral.....	28

10.2.	Pre-tratamiento.....	28
10.3.	Trans-tratamiento .....	29
10.4.	Post-tratamiento .....	29
10.5.	Análisis estadístico .....	29
11.	CUANTIFICACIÓN VIRAL .....	29
11.1.	Titulación .....	29
11.2.	PCR en tiempo real (RT-qPCR) .....	30
11.3.	Cuantificación de proteína viral intracelular .....	30
11.4.	Análisis estadístico: .....	31
12.	ESTRATEGIAS PARA LAS EVALUACIONES <i>IN SILICO</i> .....	31
12.1.	Selección de la proteína diana .....	31
12.2.	Selección del ligando .....	31
12.3.	Acoplamiento molecular .....	32
12.4.	Dinámica molecular .....	32
12.5.	Secuenciación cepas de DENV-2.....	32
13.	RESULTADOS.....	32
13.1.	Viabilidad celular. ....	32
13.2.	Tamizaje antiviral.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
13.3.	Pre-tratamiento en células VERO.....	33
13.4.	Pre-tratamiento en células U937 .....	33
13.5.	Pre-tratamiento en células A549 .....	34
13.6.	Trans-tratamiento en células VERO .....	34
13.7.	Post-tratamiento en células VERO .....	34
13.8.	Post-tratamiento en células U937 y A549 .....	34
13.9.	Copias genómicas en monocapas post-tratadas.....	35
13.10.	Proteína viral en monocapas post-tratadas .....	35
13.11.	Resultados de las evaluaciones <i>In silico</i> .....	35
13.11.1.	Acoplamiento molecular proteína estructural. ....	35
13.11.2.	Acoplamiento molecular proteína no estructural .....	36
13.11.3.	Dinámica molecular.....	36
13.11.4.	Resultados secuenciación .....	36
14.	ANÁLISIS, DISCUSIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS .....	36
15.	CONCLUSIÓN GENERAL.....	43
16.	PERSPECTIVAS .....	43
17.	FIGURAS.....	44
	Figura 1. Flujo grama metodológico.....	44

Figura 2. Estructura química de los alcaloides indólicos. ....	45
Figura 3. Evaluación de la toxicidad en células VERO.....	46
Figura 4: Tamizaje antiviral de alcaloides indólicos. ....	47
Figura 5. Estrategia Pre-tratamiento en células VERO. ....	48
Figura 6. Estrategia Pre-tratamiento en células U937.....	49
Figura 7. Estrategia Pre-tratamiento en células A549.....	50
Figura 8. Estrategia de Trans-tratamiento en células VERO.....	51
Figura 9. Estrategia de Post-tratamiento en células VERO. ....	52
Figura 10. Estrategia Post-tratamiento en células U937.....	53
Figura 11. Estrategia Post-tratamiento en células A549.....	54
Figura 12. Copias genómicas intracelulares en células VERO. ....	55
Figura 13. Copias genómicas intracelulares en células U937 y A549.....	56
Figura 14. Cell-ELISA en monocapas post-tratadas. ....	57
Figura 15 Complejo de interacción ligando y proteína diana con LigPlot. ....	58
Figura 16 Complejo de interacción ligando y proteína diana con LigPlot. ....	59
Figura 17 Complejo de interacción ligando y proteína diana con LigPlot. ....	60
Figura 18 Complejo de interacción ligando y proteína diana con LigPlot. ....	61
Figura 19 Complejo de interacción ligando y proteína diana con LigPlot. ....	62
Figura 20 Complejo de interacción ligando y proteína diana con LigPlot. ....	63
Figura 21: Dinámica molecular del complejo de DENV y la proteína de envoltura. ....	64
18. TABLAS.....	65
Tabla 1. Acoplamiento molecular con proteína estructural. ....	65
Tabla 2. Acoplamiento molecular con proteína no estructural.....	66
Tabla 3. Cambios aminoácidos en el gen de la envoltura de las cepas DENV-2/NG y DENV-2/16681.....	67
19. ANEXO.....	68
19.1. Aislamiento de ZIKV/Col a partir de suero de paciente del Norte de Santander. ....	68
20. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

## 1. MARCO TEÓRICO

Los Arbovirus son aquellos que requieren de la presencia de un artrópodo hematófago hembra para transmitirse entre hospederos vertebrados [1]. Algunas de las familias de importancia clínica que pertenecen a esta categoría son *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Togaviridae* y *Flaviviridae*. En los últimos años se ha reportado un aumento en la aparición de enfermedades causadas por tres arbovirus de importancia clínica: Zika, Chikungunya y el Dengue, las cuales son enfermedades transmitidas por el vector del género *Aedes*, especialmente el *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, siendo el *Ae. aegypti* el más ampliamente distribuido en zonas tropicales y subtropicales del mundo [2].

Debido a la expansión territorial del vector en las últimas décadas, se ha hecho evidente su importancia en salud pública, por factores macrodeterminantes que aumentan su presencia a nivel mundial, en donde el cambio climático ha llevado a que el insecto colonice nuevas áreas. Además, de factores sociales como la urbanización no controlada en lugares con condiciones favorables para el desarrollo del mosquito e incluso el movimiento poblacional que provoca que la enfermedad se desarrolle en muchos lugares del mundo, ya que más de 400 millones de viajeros de Europa y Norteamérica cada año cruzan las fronteras y regresan a sus países procedentes de Asia, África y América Latina [3]. En este sentido, alrededor de la mitad de la población mundial es susceptible de sufrir las enfermedades transmitidas por el género *Aedes*; de hecho, la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo considera uno de principales problemas de salud para la humanidad [4].

Para que se pueda desarrollar la transmisión del agente viral deben converger de manera simultánea el virus, el vector y el huésped susceptible, la cual ocurre cuando la hembra del género *Aedes* al requerir sangre humana, pica al ser humano y de este modo puede garantizar la reproducción de los mosquitos, descendencia que se desarrolla en depósitos de agua limpia o semi-limpia [5]. Los huevos se convierten en larvas y posteriormente en pupas hasta emerger en forma adulta. La hembra infectante puede vivir hasta dos meses y picar varias veces al día por lo que su capacidad de transmitir los virus es mayor.

Dada la importancia del vector en la transmisión, actualmente su control a través del trabajo social constituye una estrategia importante para la prevención de la enfermedad causada por los virus Zika (ZIKV), Chikungunya (CHIKV) y de Dengue (DENV). Una de las estrategias para controlar la transmisión es la que interviene la reproducción del mosquito mediante el uso de *Wolbachia* [6]. Sin embargo, la presencia del vector sigue muy distribuida, por lo que no es viable delimitar las estrategias únicamente al trabajo social, teniendo en cuenta además el patrón epidemiológico de reemergencia que se ha demostrado [7]. Otra estrategia en el control de la transmisión es la búsqueda de compuestos con actividad antiviral frente al DENV, CHIKV y ZIKV, a través del desarrollo de experimentos que permitan la evaluación del potencial antiviral. Son varios los enfoques antivirales que se han desarrollado en las últimas décadas, entre los que destaca aquellos basados en compuestos naturales que puedan servir de base para la producción de nuevos tratamientos contra estos arbovirus.

### 1.1 Virus Dengue

La infección causada por el DENV es la enfermedad transmitida por artrópodos más común en todo el mundo con aproximadamente 50 a 100 millones de casos de infección anualmente. Alrededor de 2.500 millones de personas viven en áreas endémicas que reciben alrededor de 120 millones de viajeros cada año, por lo que la incidencia mundial del DENV y consecuentemente de la enfermedad que produce ha aumentado durante los últimos 40 años, especialmente en América Latina [8].

Durante la década de 1960 y principios de la de 1970, la transmisión del DENV se interrumpió parcialmente en el continente Américo debido a una campaña de erradicación de mosquitos *Ae. aegypti* diseñada para prevenir en este momento la fiebre amarilla [9] y colateralmente al DENV. Sin embargo, las medidas de vigilancia vectorial y de control de vectores no tuvieron continuidad y se produjo una

reaparición de gran magnitud de mosquitos que provocaron brotes, especialmente por DENV-2 y DENV-3 en el Caribe, América Central y América del Sur [10]. A finales de los años 70 y principios de los 80, el DENV-1 y DENV-4 se introdujeron con fuerza en algunos países de América Latina y el Caribe, causando epidemias de gran importancia [11]. Desde entonces, la región ha reportado la mayor incidencia de casos en el globo terráqueo (68% de todos los casos en todo el mundo) con brotes periódicos cada 3 a 5 años, siendo uno de los más grandes el ocurrido en 2002, con más de 1 millón de casos notificados [12]. Los costos directos e indirectos de la enfermedad y los programas de control de vectores representan una carga económica sustancial tanto para el sector de la salud como para la economía general de la región. Por ejemplo, un estudio informó un costo promedio de US \$ 2,1 mil millones debido a la epidemia de dengue en el continente americano por año [13], lo cual demuestra que la alta morbilidad y mortalidad asociada a esta enfermedad conduce a un gasto importante en la economía y en los sistemas de salud de los países afectados.

**Estructura genómica y proteica de DENV.** El DENV, el cual pertenece a la familia *Flaviviridae*, es un virus cuyo genoma es el ácido ribonucleico (ARN), con polaridad positiva y una longitud aproximada de 11 Kb. Su genoma codifica inicialmente para una poliproteína de la que se originan tres proteínas estructurales las cuales son Cápside (C), Pre-Membrana/Membrana (prM/M) y Envoltura (E), éstas representan un tercio del genoma desde el extremo 5'. Posteriormente, se encuentra la región que codifica para siete proteínas no estructurales que son NS1, NS2 que se divide en NS2a - NS2b, NS3, NS4 que también posee 2 dominios NS4a - NS4b y finalmente la NS5 [14]. Una de las principales características del DENV y en general de la familia a la que pertenece, es que posee envoltura viral, cuya bicapa lipídica se compone de 180 copias de la glicoproteína E y 180 copias de la glicoproteína prM/M [15]. La envoltura viral recubre la nucleocápside que es la suma del ARN y la proteína C.

Con relación a las funciones del componente proteico del DENV, la proteína E es aquella que se une al receptor de la célula hospedera y que además se convierte en el principal elemento antigénico capaz de producir inmunidad protectora por parte del hospedero [16]. Esta proteína posee tres dominios. El dominio I es el encargado de organizar la estructura uniendo los otros dos dominios; el dominio II contiene el péptido encargado de la fusión con la membrana endosomal una vez ha ingresado a la célula; el dominio III es aquel que posee una estructura similar a una inmunoglobulina encargada de la unión con el receptor de la célula diana [17]. La importancia que la proteína E representa para la comprensión en las interacciones con la célula hospedera, radica en que es la responsable de diferenciar los cuatro serotipos más prevalentes (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4). Cabe mencionar que en la actualidad se ha habla de un nuevo serotipo DENV-5, cuyo genoma completo fue secuenciado a partir de un caso grave identificado inicialmente como DENV-4 en Malasia, encontrándose posteriormente que ocupa un nuevo lugar en el árbol filogenético del DENV [18]. Cada serotipo posee genotipos que a partir de diferencias en ciertos nucleótidos dan origen a distintas cepas virales que pueden incluso implicarse en manifestaciones más severas de la enfermedad [19]. De los cuatro serotipos, el DENV-2 es aquel que se aísla de manera más frecuente y se relaciona más continuamente con casos de dengue severo [20], de hecho dos de las cepas pertenecientes a este serotipo son las más usadas en estudios de laboratorio, la cepa DENV-2/NG y la cepa DENV-2/16681).

La proteína M puede encontrarse en dos conformaciones dependiendo del momento dentro de la maduración viral, como prM en los viriones inmaduros y como M en viriones maduros. En el virión inmaduro prM y E forman 90 heterodímeros que se extienden como 60 puntos triméricos desde la superficie de la partícula viral. En el virión maduro, la proteína E se encuentra como 90 homodímeros que se encuentran en posición plana contra la superficie viral formando una capa más lisa, mientras que el péptido 'pr' se escinde de prM durante la maduración por una proteasa celular y M permanece en la partícula madura como una proteína transmembrana debajo de la cubierta de la proteína E.

En cuanto a la proteína C, se sabe que es un dímero, donde cada subunidad (monómero) tiene como

composición dos hélices alfa que, se unen al retículo endoplasmático y otras dos que se unen al genoma viral para conformar un complejo ribonucleoproteico, esto con el fin de proteger de una posible degradación por parte de la célula. Además, actúa en la fase de ensamblaje y por tanto en la formación de la partícula viral [18].

Con relación a las proteínas no estructurales, se sabe que la NS1 puede hallarse en el citoplasma y en el espacio extracelular, por lo que puede llegar a estimular al sistema inmune y explicar en parte, el sangrado y la extravasación plasmática por el daño que produce en el endotelio [21]. También está presente en balsas lipídicas de la membrana plasmática [22] lo que sugiere que puede hacer parte de dominios membranales importantes en el proceso replicativo.

Aunque la función de la proteína NS2 no está del todo clara, se cree que coordina si el ARN recién sintetizado se usa como cadena molde en el proceso replicativo o si se introduce dentro de la nucleocapside en la fase de ensamblaje, sin embargo se sabe que tanto el dominio NS2a como el NS2b son importantes en el ensamblaje de la partícula viral [18].

La proteína NS3 por su parte tiene dos dominios de gran importancia en la replicación viral, el primero en el extremo N-terminal con actividad proteasa similar a tripsina y otro en el extremo C-terminal que actúa de dos formas, como trifosfatasa (NTPase) y como helicasa de ARN (NS3Hel) [23]. Recientemente, se ha estudiado que la NS3 tiene un papel importante en el reclutamiento de la enzima ácido graso sintasa cerca del retículo endoplásmico, lo que crea un ambiente lipídico adecuado en las etapas iniciales del ensamblaje [24].

La función específica tanto de la NS4a como de la NS4b no está aún bien definida, no obstante se ha descrito que estas dos proteínas funcionan como co-factores de la polimerasa viral y como componentes importantes en la formación del complejo de replicación [25].

Finalmente, la proteína más conservada entre los flavivirus, la NS5 posee varias funciones en el extremo N-terminal actuando como metiltransferasa y guanidiltransferasa, mientras que en el extremo C-terminal se encuentra el dominio de ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRps), lo que la convierte en la polimerasa durante la replicación y transcripción viral [26]. La RdRp posee una arquitectura similar en diferentes familias de polimerasas, con tres subdominios denominados "dedos", "palma" y "pulgar" [27, 28].

**Ciclo replicativo de DENV.** Para que el ciclo replicativo del virus sea un hecho, el primer paso es la entrada a la célula hospedera ya sea del mamífero o del mosquito, esto ocurre cuando el DENV se acerca a la célula y la proteína E del virus se une con componentes de la membrana celular que contribuyen adicionalmente en la endocitosis mediada por clatrina, endocitosis no clásica independiente de clatrina o macropinocitosis [29]. Estudios previos han descrito que el dominio III de la proteína E interactúa con LAMR1 (receptor para laminina) [31], con proteínas de adhesión celular como ICAM-3 o DC-SIGN (CD209) [32], con proteoglicanos entre los cuales está el heparán sulfato [33], entre otras moléculas que pueden variar dependiendo del tipo de célula [34]. Es importante destacar que existen estudios que describen una interacción con un posible correceptor que favorece la habilidad de DENV para infectar diferentes células, al parecer haciendo contacto inicialmente con heparán sulfato y luego al unirse con un receptor para iniciar la endocitosis [35].

Una vez ha ocurrido la endocitosis, se forma el endosoma temprano el cual se convierte en un endosoma tardío fusionándose con un lisosoma para promover de este modo, la acidificación del pH y por ende un cambio conformacional en la proteína E que favorece la fusión de la membrana del endosoma con la membrana viral y así poder liberar la nucleocápside del virus al citoplasma [36]. Una vez allí, y dada la

naturaleza del ARN viral que le confiere la misma propiedad de un ARN mensajero, se da origen a la traducción de proteínas en los ribosomas asociados a retículo endoplásmico (RE), produciendo un polipéptido completo debido a que el genoma viral posee un solo marco de lectura abierto. Este polipéptido sufre modificaciones en el RE y gracias a la acción de proteasas celulares como furina y adicionalmente por la proteína viral proNS3, se escinde la poliproteína dando origen tanto a las tres proteínas estructurales como a las siete no estructurales, las cuales participan en la replicación del ARN viral y posterior ensamblaje de la partícula viral [37].

Con relación a la replicación, *in vitro* se ha determinado la presencia de tres tipos de ARN que difieren en su coeficiente de sedimentación, siendo éstos 20S, 20/28S y 40S [38]. El ARN 20S está constituido por una cadena de ARN de polaridad positiva y otra negativa, lo que sugiere que los intermediarios negativos que actúan como molde para la generación de ARN positivo están presentes aquí. Los otros dos tipos son ARN intermediarios de sentido positivo que se encuentran en proceso de elongación. La nucleocápside es la que da comienzo el proceso de ensamblaje, éste debido a la interacción del ARN, la proteína C y la presencia de lípidos [39]. Posteriormente, ocurre una asociación entre la proteína prM/M y proteína E, las cuales están presentes en la membrana del RE. La maduración del virión sucede en dos etapas; la primera se basa en la organización de heterodímeros de prM/M y E, aquí sobresale prM/M por lo que el aspecto de la superficie es rugosa, también se da el tránsito del virión inmaduro desde RE hasta el aparato de Golgi (regiones cis y trans) lo que promueve modificaciones postraduccionales; la segunda consiste en cambios conformacionales de la proteína E donde se producen homotrimeros antiparalelos, otorgando una apariencia lisa a la superficie del virus, seguido de una proteólisis sobre prM/M por la proteasa furina, la cual separa el péptido "pr" y la proteína M. Finalmente, ocurre la exocitosis al espacio extracitoplasmático, donde el pH neutro induce la liberación del péptido "pr", lo que provoca la conformación final de la proteína E que puede ser reconocida nuevamente por receptores de otra célula [40].

**Manifestaciones clínicas y patogénesis de DENV.** La infección que ocasiona el DENV produce un número de casos importantes tanto de morbilidad como de mortalidad, por lo que el dengue es una enfermedad de amplio espectro clínico que incluye desde cuadros asintomáticos hasta cuadros que pueden terminar en la muerte, por este motivo se debe considerar al Dengue como una sola enfermedad que puede desarrollarse de múltiples formas. Es precisamente este aspecto de la enfermedad tan variado, lo que explica la aparición de diferentes cuadros clínicos que se pueden hallar en una comunidad durante epidemias, en las cuales gran parte de la población posee sintomatología leve y posiblemente no buscan atención médica [41]; otra parte desarrolla síntomas inespecíficos que sin la atención adecuada pueden evolucionar desfavorablemente y cuyo deterioro puede desembocar en ocasiones a la muerte. La existencia de cuadros clínicos atípicos que pueden llegar a afectar de manera específica ciertos órganos, tal es el caso de la insuficiencia renal aguda, hepatopatías, miocardiopatías, encefalopatías [42], asociadas a mortalidad.

En la enfermedad se puede diferenciar tres etapas clínicas; la primera se caracteriza por la presencia de fiebre, cefalea, dolor retro ocular, artralgias y/o mialgias, síntomas que hacen parte de la denominada etapa febril y se considera como un dengue sin signos de alarma; los pacientes cuya fiebre desciende pero en los cuales existe derrame pleural o ascitis, vómitos con dolor abdominal intenso, son aquellos que entran en la etapa crítica de la enfermedad, convirtiéndose en un dengue con signos de alarma ya que la probabilidad de desarrollar un síndrome de choque aumenta [43]. Si los signos de alarma se identifican a tiempo, el paciente puede recibir atención, la cual se basa en la reposición de líquidos para restaurar las pérdidas por extravasación de plasma y vigilancia médica para evitar una inestabilidad hemodinámica mayor; por último, la etapa final es la de recuperación en la cual comienza a normalizarse las funciones vitales.

Las células diana de DENV son los monocitos, los macrófagos, las células dendríticas y los linfocitos

CD4+ y CD8+. Estudios *in vitro* también reportan células hepáticas, neuronales, fibroblásticas y endoteliales como dianas [35]. La infección comienza a través de la picadura de un mosquito, el cual infecta inicialmente células de Langerhans inmaduras que luego se dirigen a ganglios linfáticos, donde se infectan monocitos y macrófagos, las cuales son las dianas principales de la infección. Luego ocurre una diseminación del virus por el sistema linfático y como consecuencia de esta viremia primaria, se infectan monocitos, macrófagos esplénicos y hepáticos [44].

Los diferentes serotipos de DENV y los anticuerpos que reconocen distintas proteínas virales son un factor determinante en la patogénesis. En el caso de los anticuerpos dirigidos a NS1 se ha demostrado que causan una reacción cruzada con células endoteliales y plaquetas, de este modo la pérdida de funcionalidad del endotelio puede provocar pérdida de plasma en la cavidad pleural y peritoneal, además de la agregación plaquetaria y la fragilidad capilar que se asocian al desarrollo de petequia y hemorragias [45] [46]. Por otro lado, los anticuerpos contra la proteína E generan reacción cruzada con el precursor de la plasmina (plasminógeno), lo que está relacionado con el desarrollo de trombosis y Coagulación Intravascular Diseminada (CID) [47]. Debido a que existen varios serotipos de DENV, hay pacientes que sufren una segunda infección por un serotipo diferente al serotipo inicial, lo que provoca una estimulación y exacerbación de la respuesta inmune debido principalmente al fenómeno de Potenciación Dependiente de Anticuerpos o ADE por sus siglas en inglés (Antibody-dependent enhancement). Esto se presenta cuando los anticuerpos de la primera infección reconocen el segundo serotipo de manera cruzada formando un complejo, el cual se une a monocitos y macrófagos por medio del receptor Fc, favoreciendo la internalización del nuevo serotipo infectante a través de receptores Fc (FcγR) [48].

Si bien el DENV produce una enfermedad de corta duración que oscila alrededor de una semana para la mayoría de los casos, es también una muy dinámica que como ya se planteó, puede agravarse de manera súbita, por lo que la recomendación es monitorear clínicamente la evolución para evitar complicaciones, es por ello que la necesidad de tratamiento específico es un tema prioritario en la actualidad.

## 1.2 Virus Zika

El ZIKV es el agente causal de la fiebre del Zika. En el 2016 la OMS declaró la infección por el ZIKV como una emergencia para la salud pública internacional [49], debido al aumento del número de casos relacionados con secuelas graves a raíz de la infección por este virus como la microcefalia y las calcificaciones cerebrales [50] [51], el síndrome de Guillain–Barré [52] y otras manifestaciones autoinmunes.

El ZIKV se aisló por primera vez en 1947 en el Bosque Zika situado cerca de Uganda cuando se estudiaban monos Macaco *Rhesus* con sospecha de fiebre amarilla. Inicialmente la infección por ZIKV en humanos se consideró ocasional hasta 1952, año en el cual estudios serológicos validaron al ser humano como hospedero ocasional [53]. Sin embargo, en 1968 se aisló por primera vez el virus de dos pacientes Nigerianos y se demostró que el 40% de los habitantes de este país tenían anticuerpos neutralizantes del ZIKV [54], por lo que el paradigma frente a la presencia de este virus comenzó a cambiar. En tiempos más recientes, se detectó un brote en Micronesia que afectó el 73% de las personas en el 2007 con un reporte de 185 casos confirmados sin complicaciones [55]. Desde octubre del 2013 hasta abril del 2014 se identificó un brote en la Polinesia Francesa con un número de casos leves de 32.000 afectados y ya para 2015 el ZIKV llegó al continente americano, cuando se reportaron los primeros casos en Brasil [56]. Según la OMS 61 países han notificado la transmisión por mosquito (vectorial) de manera constante para junio de 2016, siendo Brasil el primer país en alertar sobre una posible asociación del ZIKV con malformaciones congénitas debido a un aumento de casos de fetos y neonatos con microcefalia, hecho a partir del cual el Ministerio de Salud de Brasil declaró una emergencia nacional de salud pública. En abril de 2016 se realizó un estudio retrospectivo en Polinesia Francesa que afirma la

relación de sufrir microcefalia en aquellos fetos cuyas madres contrajeron la enfermedad en el primer trimestre de embarazo [57]. Adicionalmente, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades CDC de Estados Unidos confirmó como causa de microcefalia la infección por ZIKV [58], debido a que el virus puede infectar células progenitoras humanas específicamente de tipo neuronal en el embrión [59]. En este sentido, la búsqueda de posibles fármacos que prevengan la enfermedad es un gran punto de interés, debido a la falta de antivirales específicos y efectivos contra ZIKV, sumando adicionalmente la complejidad en el control del vector.

**Estructura genómica y proteica de ZIKV.** El ZIKV está relacionado con el virus Spondweni el único otro miembro de su clado [55]. Los parientes más cercanos incluyen el virus de la encefalitis de San Luis, encefalitis japonesa, virus del Nilo Occidental, fiebre amarilla, DENV, virus Ilheus y virus Rocio [60]. Al ser un flavivirus, el ZIKV posee una membrana lipídica, su geometría es de tipo heicosaédrica y su genoma es ARN de cadena simple y polaridad positiva, el cual se compone de 2 regiones no codificantes (5' y 3') que flanquean un único marco de lectura abierto, éste codifica para una poliproteína [61] que se escinde en tres proteínas estructurales de cápsida (C), el precursor de membrana (prM), la proteína de envoltura (E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a y NS4b y NS5) [62]. Las funciones de las proteínas tienen una gran relación entre flavivirus, aunque se desconoce si los hallazgos pueden generalizarse, se asumen funciones similares; por su parte la proteína C participa en la unión al ARN para formar la nucleocápside; la proteína prM/M contribuye en el plegamiento y secreción de la proteína E, además se ha observado que los anticuerpos contra esta proteína estructural podrían estar implicados en el desarrollo de dengue severo en las infecciones secundarias, todo esto debido a la similitud entre ambos flavivirus, además la proteína E es la encargada de la unión al receptor y posterior fusión de membranas con el endosoma; la proteína NS1 interviene en la replicación del genoma viral; la NS2a participa en la síntesis de ARN y el ensamblaje de la partícula viral, mientras que la NS2b forma complejos con la NS3 para promover la actividad de la proteasa de serina; la NS3 posee actividad helicasa y trifosfatasa, y como ya se dijo funciona como proteasa de serina unida a NS2B; la NS4a y NS4b actúan en la replicación de ARN; por su parte la NS5 posee actividad metiltransferasa, guanidiltransferasa y polimerasa dependiente de ARN [63].

El análisis filogenético muestra que el ZIKV puede clasificarse en dos linajes, el africano y el asiático; ambos surgieron en África oriental a finales del siglo XIX o principios del XX. El linaje asiático se originó durante la migración del virus de África al sudeste de Asia donde fue detectado por primera vez en Malasia. A partir de ahí, el ZIKV se extendió a las Islas del Pacífico (Yap y Polinesia Francesa) y luego a Nueva Caledonia, Islas Cook, Isla de Pascua y posteriormente al continente Americano [64]. Un estudio de la evolución molecular del virus, basado en cepas virales recogidas de 4 países en África Occidental durante 1947-2007, identificó varios sitios dentro del genoma viral que estaban bajo fuerte presión de selección negativa. Este hallazgo sugiere la purga frecuente de polimorfismos deletéreos en genes funcionalmente importantes y la posibilidad de recombinación que rara vez ocurre entre los flavivirus [65] pero que al parecer en ZIKV son más frecuentes, de hecho, se han reportado alrededor de 13 eventos de recombinación [66]. Las implicaciones de este hallazgo podrían incluso sugerir una evaluación adicional con respecto a la propagación viral, el mantenimiento zoonótico y el potencial epidemiológico.

**Ciclo replicativo de ZIKV.** El ZIKV puede ingresar a la célula a través de varios receptores que se sospecha son probablemente similares a otros flavivirus. Entre ellos han descrito el DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin), el AXL (Tyrosine-protein kinase) y el TIM-1 (T cell immunoglobulin mucin domain) que contribuye a la eficacia de AXL para mediar la entrada. El virus entra por la picadura del mosquito hembra y hace una primera ronda replicativa en fibroblastos dérmicos, queratinocitos epidérmicos y células dendríticas inmaduras, lo que permite la migración a los ganglios linfáticos y el torrente sanguíneo [67]. Una vez el virus entra a la célula, la replicación ocurre dentro de las vesículas derivadas del RE, sin embargo un estudio demostró que el anticuerpo MAb 541 dirigido a la proteína E del ZIKV se encontró de manera sorprendente en los núcleos de las células infectadas, este hallazgo sugiere una ubicación para la replicación que difiere de la de otros flavivirus y merece más investigación [68]. Del RE se transportan al aparato de Golgi gracias a la maquinaria ESCRT (complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte), allí la prM/M se escinde y el virión madura. Los viriones adquieren su membrana de la célula hospedera enriquecida de proteínas virales para la formación de su envoltura y el virus maduro sale por gemación.

El virus Zika al igual que otros flavivirus, es transmitido por mosquitos principalmente del género *Aedes* (*Stegomyia*). Varios *Aedes* spp han sido implicados, incluyendo *Ae. aegypti*, *Ae. africanus*, *Ae. hensilli* y *Ae. albopictus* [69, 70]. El *Ae. aegypti* parece ser el principal vector en Asia y fue el vector primario sospechoso para el brote de la Polinesia Francesa [71]. Los mosquitos *Ae. hensilli* se implicaron en el brote de las islas Yap, sin embargo no ha sido posible aislar el virus Zika de estos mosquitos [72]. En África, el vector predominante de la especie *Aedes* no ha sido definitivamente identificado, aunque los estudios de aislamiento viral sugieren que *Ae. albopictus* fue el vector probable en el brote de virus Zika del 2007 en Gabón [70]. Otros modos de transmisión del ZIKV en los que no está involucrado el vector incluyen la transmisión congénita [73], la perinatal [74], la sexual [75] y por transfusión de sangre [76].

**Manifestaciones clínicas y patogénesis de ZIKV.** El periodo de incubación desde que se adquiere la infección hasta el inicio de los síntomas en seres humanos es de aproximadamente 2 a 7 días y en un 80 % de los casos la infección es asintomática, especialmente en regiones endémicas como África. Cuando los síntomas se hacen presentes suelen ser auto-limitados, leves e inespecíficos. Los reportados de manera frecuente incluyen sarpullido, fiebre, artralgia, mialgia, fatiga, cefalea y conjuntivitis, éstos sin embargo pueden llegar a confundir el diagnóstico clínico con otras infecciones virales (dengue, Chikungunya, Mayaro, Rubeola, Sarampión, entre otros), infecciones bacterianas (*Rickettsias*, *Leptospira*), infecciones parasitarias (Malaria), entre otras como meningitis y artritis post-infecciosa. Sin duda el diagnóstico diferencial de mayor interés es el tipo viral y más específicamente con DENV. Los casos sospechosos deben ser confirmados por un laboratorio de referencia mediante la detección del ARN viral por RT-PCR (durante la fase aguda); también puede usarse serodiagnóstico, aunque éste es limitado por el alto grado de reacciones cruzadas con otros flavivirus [77].

Una de las características prominentes en la infección por ZIKV es la presencia de sarpullido el cual es maculopapular y pruriginoso en la mayoría de los casos, comenzando cerca del sitio de la picadura del mosquito y extendiéndose a las extremidades con resolución espontánea entre el día 1 y 4 del inicio de la enfermedad. La fiebre es de baja intensidad (37,4°C - 38,0°C) e incluso en un gran número de casos puede estar ausente. Las adenopatías son escasas pero puede haber afectación de los ganglios retro-auriculares [78] y los síntomas desaparecen normalmente en 2 semanas. Sin embargo, las secuelas clínicas más graves se han asociado cada vez más con el ZIKV. Desde el brote en Brasil, los informes de recién nacidos con microcefalia han aumentado notablemente (20 casos / 10.000 nacidos vivos frente a 5.5 / 10.000 nacidos vivos en años anteriores) [79].

Las malformaciones congénitas del sistema nervioso central (SNC) se han relacionado al ZIKV por una

parte, debido al neurotropismo viral lo que afecta preferentemente a los tejidos del cerebro y el tallo cerebral del feto en desarrollo [80] y por otra, al papel del virus en la interferencia de la autofagia durante la replicación viral que obstruye la estabilidad del centrosoma, el cual es importante para el desarrollo del cerebro. En ratones infectados con ZIKV se ha demostrado un aumento de los centrosomas que conllevan al desarrollo de la microcefalia. Por lo tanto, se ha planteado la hipótesis de que la interferencia del ZIKV en la autofagia conduce a un aumento del número de centrosomas y por ende al desarrollo de la microcefalia [81]; este posible papel en las malformaciones del SNC merece una investigación más profunda. También se han descrito secuelas neurológicas graves en adultos debido a la alta afinidad por el tejido cerebral, incluyendo meningitis, meningoencefalitis y síndrome de Guillain-Barré; esta última afectación es producida por un daño en las células nerviosas lo cual conduce a debilidad muscular y en ocasiones a la parálisis, donde en casos severos pueden afectar a los músculos que controlan la respiración. Los síntomas pueden durar semanas o meses y la mayoría de las personas se recupera completamente [82]. No obstante, se han informado casos de debilidad residual después de tres años, mientras que aproximadamente el 3% de las personas pueden experimentar una recaída de debilidad muscular y sensaciones de hormigueo muchos años después del ataque inicial. En Brasil, Colombia, El Salvador, Suriname, Venezuela y Polinesia Francesa se ha observado un aumento en los casos de síndrome de Guillain-Barré durante los brotes. Las secuelas no neurológicas incluyen pérdida auditiva transitoria, hipotensión y síntomas genitourinarios. Se han reportado casos de transmisión por esperma [75, 83].

Actualmente, no está disponible ningún fármaco o vacuna anti-ZIKV específico y debido al creciente número de casos de anomalías congénitas graves en el desarrollo del cerebro por causa del ZIKV y a su asociación como desencadenante del síndrome de Guillain-Barré, se hace necesario la búsqueda de compuestos activos frente al virus, lo que requiere el desarrollo de fármacos antivirales eficaces y seguros para el tratamiento y la prevención a nivel mundial de la infección por ZIKV.

### 1.3 Virus Chikungunya

El CHIKV es un alfavirus perteneciente a la familia *Togaviridae*, el cual se propaga por mosquitos culícidos [83, 84]. La enfermedad que produce fue reportada por primera vez en 1952 entre las fronteras de Tanzania y Mozambique cerca de las mesetas de Makonde y se aisló en 1953 en medio de la epidemia de Newala [85]. La palabra "Chikungunya" de la lengua Makonde traduce "el que se dobla", significado que hace referencia al dolor articular característico de la enfermedad causada por el virus [86]. El virus se ha mantenido en un ciclo selvático que involucra primates silvestres y mosquitos *Ae. furcifer*, *Ae. luteocéfalo*, o *Ae. taylori* que habitan los bosques africanos, para luego pasar al continente asiático desde donde es transmitido principalmente por *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* por medio de ciclo de urbano [87].

El agente viral de la fiebre del Chikungunya es endémico en Asia, subcontinente indio y Africa donde hubo un brote en 2007 en Gabón. A comienzos del año 2005 se reportó un brote en las islas del Océano Índico que se relacionó con posibles casos reportados en 2006 en Europa. En 2007 se hizo oficial la transmisión de la enfermedad en el viejo continente con 197 casos registrados en Italia, cuya transmisión se relacionó principalmente con *Ae. albopictus*. Para el año 2013 se confirmó por laboratorio en la isla de St. Martin dos casos autóctonos [88], evento que marcó el comienzo del primer brote con transmisión autóctona en las Américas y a partir del cual, se confirmó la distribución a cerca de 43 países del hemisferio occidental. A finales del 2014 se informaron brotes en las islas del Pacífico, ocasionando un número de casos sospechosos de chikungunya hasta abril de 2015 de 1'379.788 en las islas del Caribe, países de América Latina y los Estados Unidos. En ese mismo año se notificó a la Organización Panamericana de la Salud [89], 693.489 casos sospechosos y 37.480 confirmados, donde la mayoría pertenecía a Colombia. En 2017 se reportó un brote en las islas del pacífico Cook y Marshall [90].

La virosis comparte algunas manifestaciones con la enfermedad causada por el DENV y ZIKV, como la

fiebre, cefalea, escalofríos, náuseas y/o erupciones cutáneas, lo cual puede dificultar el diagnóstico clínico diferencial al momento de la consulta. En el panorama clínico, el compromiso articular es el síntoma más característico de la fiebre del Chikunguya, además de efectos más críticos como encefalopatía, miocarditis y compromiso hepático que han sido causa de muerte [91]. Pese a lo anterior y al igual que los flavivirus ya mencionados, no existe un tratamiento específico para CHIKV, por lo que en concordancia con los objetivos de la OMS en la búsqueda fármacos de origen natural ya sea para uso profiláctico o terapéutico, se hace necesario identificar moléculas aisladas de material vegetal de nuestro país que puedan tener un efecto antiviral.

**Estructura genómica y proteica de CHIKV.** Se han descrito tres genotipos para CHIKV (Asia, África occidental y Este central de Sudáfrica) [92]. El genoma viral es un ARN monocatenario de polaridad positiva, cuya longitud es de aproximadamente 12 Kb y posee dos marcos de lectura abiertos (ORF), del extremo 5' al 3'. El primero da origen a las cuatro proteínas no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4) a partir de un ARN genómico y el segundo codifica para cinco proteínas estructurales (proteína C de cápside, glicoproteínas E1, E2, E3 y 6K) que se traducen a partir de un RNA llamado subgenómico [93].

Es un virus envuelto de simetría icosaédrica con un diámetro de 60 a 70nm. Las proteínas estructurales se sintetizan como una poliproteína larga, que luego se escinde por proteasas tanto de origen viral como celular, obteniéndose las cinco proteínas estructurales. La proteína de (C) conforma la región central de la envoltura viral compuesta por cerca de 240 copias y por su lado, las glicoproteínas E2 y E1 conforman el heterodímero, cuyas proyecciones son importantes en el reconocimiento con el receptor celular, por lo que poseen gran capacidad antigénica [94]. La proteína E3 participa en la señalización requerida para enviar el resto de las proteínas no estructurales al RE, desempeñando adicionalmente un papel en la regulación del pH a lo largo de todo el ciclo replicativo [95]. La proteína 6K, también conocido como péptido señal nativo, parece tener un papel como secuencia señal para el procesamiento de la proteína E1, ya que se ha demostrado que sustituciones en la secuencia de 6K resultan en niveles inferiores intracelulares de E1 [95].

Las proteínas no estructurales se originan a partir de la escisión del ARN genómico. NSP4 (polimerasa dependiente de ARN o RdRp) y una proteína intermediaria llamada P123, son capaces de realizar la síntesis de ARN molde (polaridad negativa). Sin embargo, su eficiencia se ve disminuida para la síntesis de ARN de polaridad positiva, por lo que ocurre una proteólisis adicional de P123 que proporciona las proteínas NSP1 y NSP2. Por su parte NSP1 posee actividad enzimática de guanina-7-metiltransferasa y guanidiltransferasa, motivo por el cual juega un papel importante en la maduración del mRNA viral recién sintetizado. En el extremo N-terminal de la proteína NSP2 se sitúan las funciones de helicasa, nucleósido trifosfatasa (NTPasa) y ARN dependiente de las actividades 5' trifosfatasa y en el extremo C-terminal se encuentra su acción proteolítica, importante en la escisión de poliproteínas [96]. Finalmente, las funciones de la proteína NSP3 aún no están del todo claras, sin embargo se sabe que tiene tres dominios (macro dominio N-terminal con actividad fosfatasa y unión al RNA, dominio central de unión a dedos de zinc y un grupo altamente fosforilado) [97]. También se sabe que se localiza en los complejos replicativos y en ciertos focos citoplasmáticos [98].

**Ciclo replicativo de CHIKV.** Los receptores en la célula diana que se han descrito en el reconocimiento del virus son DC-SIGN, L-SIGN, sulfato de heparina, laminina, integrinas y actualmente, se ha evaluado el papel de la prohibitina como proteína receptora [99]. Luego de la adherencia, se promueve la endocitosis mediada por receptor, formándose así un endosoma en el cual la disminución del pH fomenta una disociación del heterodímero E2-E1 promoviendo la exposición de E1 y, por ende, la fusión entre la envoltura viral y la membrana del endosoma con el fin de liberar el material genómico al citoplasma. El ARN viral, al igual que con los flavivirus, es reconocido por los ribosomas como un mRNA y se traduce en una poliproteína que, al ser escindida, da origen a las cuatro proteínas no estructurales que contribuyen con la síntesis de un RNA intermediario de cadena negativa el cual, a su vez, es la plantilla para la síntesis de RNA genómico (49S) y subgenómico (26S); éste último codifica el precursor de las proteínas estructurales. El proceso replicativo se lleva a cabo con la participación de proteínas celulares, las cuales junto con las proteínas no estructurales del virus, conforman complejos de replicación en la membrana del RE [100].

La proteína C se libera inicialmente de la poliproteína, la cual hará parte de la nucleocápside viral además de tener señales de exportación e importación nucleares. Luego se escinden las glicoproteínas E1 y pE2, ésta última al ser procesada, origina E2 y E3 [101]. Las glicoproteínas E1-E2 conforman el heterodímero, fundamental para la unión y entrada de la partícula viral a la célula por medio del reconocimiento del receptor. Finalmente, y luego de la replicación del genoma viral y del ensamblaje con las proteínas estructurales, se conforma la nucleocápside en el citoplasma para luego salir de la célula hospedera por gemación, proceso en el cual se adquiere la bicapa lipídica que envuelve la nucleocápside [102].

**Manifestaciones clínicas y patogénesis de CHIKV.** La infección por CHIKV es una enfermedad debilitante, que puede dejar secuelas crónicas y que desafortunadamente puede llevar a la muerte. Al ser inoculado por medio de la picadura del mosquito, el virus entra a los capilares y se puede replicar en macrófagos, fibroblastos y células endoteliales. Las natural killer (NK) son las primeras células del sistema inmune innato en actuar contra la infección. Se ha documentado que las NK también causan inflamación al infiltrarse en las articulaciones, especialmente en el tejido sinovial, lo que conduce a artritis crónica que también se fomenta gracias a un componente de persistencia viral [88].

Además, en la fase virémica de la enfermedad hay replicación del virus tanto en hepatocitos como en miocitos. Los pacientes con edades extremas pueden desarrollar encefalopatía, insuficiencia cardiorrespiratoria, insuficiencia renal y hepatitis, además los neonatos pueden adquirir el virus al momento del parto si sus madres tienen la infección activa, dando como resultado sepsis, trombocitopenia, coagulación intravascular diseminada, edemas y hemorragias cerebrales. Se ha documentado también, infección a través de barrera placentaria lo que provoca un inadecuado desarrollo neurológico [93].

De manera global, la infección puede dividirse en una enfermedad de dos etapas: etapa aguda y etapa crónica. La etapa aguda se desarrolla generalmente de 2 a 6 días después de la picadura del mosquito infeccioso y los primeros síntomas tienen una aparición repentina, cuya duración es usualmente de una semana antes de una mejoría espontánea. En esta etapa puede existir una manifestación subclínica de la enfermedad, pero la fiebre del Chikungunya se caracteriza principalmente por hipertermia cercana a 39°C, cefalea, fatiga intensa, anorexia, náuseas y una erupción petequeal o maculopapular, cuya manifestación clínica más característica es la poliartalgia intensa, debido en gran medida a la infiltración de células monocucleares que causan intenso dolor muscular y articular (103). Las articulaciones proximales también pueden inflamarse con grandes derrames articulares en las rodillas y los codos. La intensidad de los síntomas hace que la mayoría de los pacientes busquen un tratamiento eficaz. Desafortunadamente, ningún fármaco antiviral ha demostrado ser eficaz contra la infección por CHIKV [103], por lo tanto, el tratamiento de la etapa aguda se limita a los analgésicos y los antiinflamatorios no

esteroideos (AINE).

La etapa crónica comienza luego de una mejoría de corta duración (etapa aguda), con recaídas inflamatorias, reumatismo duradero y una pérdida significativa en la calidad de vida. Este deterioro es más frecuente en pacientes mayores de 40 años o con enfermedades subyacentes, en particular enfermedades reumáticas o traumáticas [104]. Con el tiempo, las complicaciones reumáticas se pueden manifestar años después de la infección aguda por CHIKV, especialmente con el desarrollo de reumatismos potencialmente destructivos [105].

#### 1.4 Antivirales

Como en cualquier otro tipo de infección, controlar las infecciones virales pueden abordarse desde un punto de vista profiláctico (protector) o terapéutico (con el fin de combatir una infección que ya se ha establecido en el hospedero). Sin embargo, a diferencia de otras infecciones bacterianas, parasitarias o fúngicas, los virus no son un organismo autónomo, por lo que es fundamental la presencia de células vivas en las cuales se pueda llevar a cabo el proceso de replicación viral. En este sentido, el ciclo replicativo viral involucra vías metabólicas de las células, lo que hace difícil el diseño de un tratamiento sin efectos adversos sobre las células hospederas [106]. Con base en el aumento de casos a nivel mundial de los virus ZIKV, CHIKV y DENV y la falta de opciones terapéuticas para las arbovirosis, se hace necesario el hallazgo de moléculas que puedan ser usadas como posibles fármacos antivirales.

Muchos análogos de nucleósidos son inhibidores de las polimerasas víricas y se han descrito como moléculas prometedoras contra virus ARN, su acción recae en la incorporación de nucleósidos modificados al genoma viral lo que provoca una infectividad reducida [107]. Se ha explorado el efecto del BCX4430, el cual es un análogo de nucleósido de adenosina como inhibidor selectivo de ARN polimerasa para ZIKV que ha demostrado una reducción del efecto citopático y del rendimiento viral en células VERO (provenientes de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*), Huh7 (derivada de carcinoma hepático de *Homo sapiens*) y RD (derivadas de músculo de *Homo sapiens*), así como el aumento en la supervivencia de ratones AG129 luego de ser inoculados, los cuales carecen de receptores para IFN tipo I y II [107]. Otro estudio que incluyó el 6MMPr (tiopurina 6-metilmercaptapurina riboside) demostró actividad eficaz frente a la replicación de ZIKV en células VERO y SH-SY5Y (línea neuronal de *Homo sapiens*), además del hecho de que los nucleósidos de tiopurina también inhiben la síntesis *de novo* de la purina que reduce la disponibilidad de nucleótidos y por ende favorece una menor tasa de replicación del virus [108].

Algunas pequeñas moléculas también han sido blanco de estudios como el caso de 7-Deaza-2'-C-Metiladenosina, que gracias a los ensayos de adición del fármaco en diferentes tiempos en células VERO, se reveló que el compuesto actúa en el momento en el cual se da inicio la replicación viral intracelular, además *in vivo* se demostró que el tratamiento con 7DMA en ratones AG129 infectados por ZIKV, redujo significativamente la viremia y retrasó la morbimortalidad [109]. Un sustituyente 2'-C-metilo (nucleósidos metilados 2'-C) demostró ser un elemento estructural importante para la inhibición altamente selectiva de ZIKV, al permitir la terminación de la cadena de ARN viral con una citotoxicidad reducida en VERO [110]. Es importante demostrar de manera más extensa la seguridad de las pequeñas moléculas especialmente para las mujeres embarazadas y comprobar su efectividad para traspasar la barrera placentaria y cerebral con el fin de evitar las consecuencias más graves que se han registrado por parte de ZIKV (microcefalia y el SGB).

El Balapiravir es un profármaco de un análogo de nucleósido (llamado R1479) que fue llevado a ensayos clínicos para el posible tratamiento contra el DENV, sin embargo este ensayo, el primero de su tipo para este virus, no admite el balapiravir como fármaco candidato, ya que tiene un efecto sobre la proteína celular quinasa durante la infección y por tanto no alcanzó el punto final de eficacia en estas pruebas

[111].

Dentro de los inhibidores de la replicación del genoma viral para CHIKV se ha descrito el ácido micofenólico, un inhibidor competitivo de la enzima inosina monofosfato deshidrogenasa, la cual cataliza un paso esencial en la biosíntesis *de novo* del nucleótido de guanina. El ácido micofenólico inhibe la replicación del CHKV por un mecanismo similar a la de Ribavirina con una reducción dosis dependiente del número de copias genómicas [112].

El uso de algunos fármacos aprobados inicialmente para otros propósitos por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), han tenido un efecto inhibitorio del ZIKV tales como PHA-690509 y la Niclosamida, ambos fueron reportados como inhibidores efectivos en la infección por ZIKV cuando se añadieron 1 h antes o 4 h después de la inoculación del virus, lo que indica que pueden tener un actividad tanto en etapas iniciales como en etapas posteriores a la entrada del virus, específicamente la Niclosamida que ha demostrado su capacidad para neutralizar el pH endolisosomal e interferir posiblemente con la fusión dependiente del pH [113]. Por otro lado, el ácido micofenólico que también se ha probado para CHIKV, se evaluó en la infección por ZIKV en células HuH-7 demostrando que a partir de 0,1  $\mu\text{M}$  hay una reducción del porcentaje de infección dependiente de la concentración ; la mefloquina que es un antiparasitario capaz de alterar el pH lisosomal redujo la infección por ZIKV a partir de 1  $\mu\text{M}$ ; la Daptomicina, un antibiótico lipopeptídico que se inserta en las membranas celulares ricas en fosfatidilglicerol (PG) también se identificó como inhibidor en la infección por ZIKV, sugiriendo un efecto en las membranas endosomales tardías ricas en PG, críticas para la entrada viral [114]. La Bromocriptina demostró actividad en un ensayo de adición a las 12 horas después de la inoculación con ZIKV, al interactuar con varios residuos del sitio activo de la cavidad proteolítica de NS2B-NS3, y posiblemente ocupar el sitio activo e inhibir la actividad proteasa de ZIKV [115].

Un estudio llevado a cabo en 2010 investigó los efectos profilácticos y terapéuticos *in vitro* de la cloroquina en la replicación de CHIKV en células VERO, demostrando que el mecanismo de inhibición de la cloroquina para el alfavirus se centró en la entrada de virus al alterar la disminución del pH en el endosoma [116]. En 2008 Ozdeny y colaboradores demostraron *in vitro* reducción de la infección por CHIKV en células musculares humanas al ser tratadas con decanoil-RVCR-clorometilcetona (D-RVCR-CMC), el cual es un inhibidor de la furina y restringió el procesamiento de la glicoproteína E3E2 [117]. Se ha descrito que compuestos con un núcleo 10 H-fenotiazinas tales como clorpromazina, metdilazina, perfenazina, tioridazina, etopropazina y tietylperazina, inhiben la entrada de CHIKV, estas fenotiazinas son antipsicóticos clínicamente aprobadas [118]. La Niclosamida y la Nitazoxanida también han demostrado limitar la entrada del CHIKV, además de inhibir la liberación de la partícula viral infecciosa en U2OS y BHK-21.

## 1.5 *Tabernaemontana cymosa*

La farmacognosia ha permitido estudiar los principios activos o moléculas obtenidas de productos naturales que pueden tener un potencial terapéutico, lo que se traduce en una aplicación en la industria farmacéutica [119]. Particularmente el estudio de las plantas, ha sido una fuente muy importante para el aislamiento y caracterización de moléculas que pueden ser sometidas a etapas iniciales de evaluación *in vitro* y conocer así, su potencial frente a un agente causal de enfermedades, para este caso particular los virus ZIKV, CHIKV y DENV.

A raíz de los resultados obtenidos de una encuesta etnobotánica realizada en la Región Caribe colombiana [120], se recolectó y procesó la planta *Tabernaemontana cymosa* (*T. cymosa*), cuya clasificación taxonómica es [121]:

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden: Asteranae Takht.

- Orden: Gentianales Juss. ex Bercht. & J. Presl
- Familia: Apocynaceae Juss.
- Género: *Tabernaemontana* L.
- Especie: *T. cymosa*

La planta posee cerca de 15 pies de altura, seis de los cuales corresponden al tronco. Las hojas poseen una morfología ovalada con una terminación lanceolada aguda de 6 pulgadas de largo. Posee flores de color blanco con tonalidades rojizas con cinco sépalos lanceolados-oblongos sin enrollamiento intrincado. Además, sus frutos son estambres con una cresta lateral con un color rojizo oxidado que contiene las semillas parcialmente envueltas en funículos suculentos amarillentos o naranjados [122]. Diferentes partes de la planta se han identificado en el herbario del Jardín Botánico Guillermo Piñeres (Cartagena, Colombia) bajo el Voucher No. JBC 3243.

El género *Tabernaemontana* posee actividades biológicas documentadas y validadas con relación a su efecto anticancerígeno, antioxidante, anticonceptivo, antiinflamatorio y antimicrobiano [123]. Sin embargo, *T. cymosa* es una especie que ha sido poco explorada a nivel de la farmacognosia, aunque se ha descrito el uso de la sus raíces en el tratamiento del reumatismo [124], para tratar áreas afectadas por agujones y espinas [125], enfermedades dermatológicas y diabetes [126], además sus flores se han usado para padecimientos cardiacos [127]. Existen reportes de la actividad larvicida de los extractos etanólicos de las semillas los cuales mostraron una buena actividad en larvas de *Ae. aegypti* en estadios III y IV [128]. También se ha demostrado que el acetato de lupeol y la Voacangina, dos compuestos aislados de *T. cymosa*, inhiben eficientemente la replicación por el DENV-2 [102].

## 1.6 Alcaloides de *T. cymosa*

Las especies que pertenecen a la familia *Apocynaceae* son plantas ricas en alcaloides indólicos [129], los cuales son compuestos nitrogenados producto del metabolismo secundario de la planta, que al ser de tipo indólicos y tener un pirrol junto con un anillo bencénico, son originados del metabolismo del aminoácido triptófano. Un estudio realizó la identificación del transcriptoma que se requiere para la síntesis de Ibogaína, compuesto del cual, y gracias a la acción de dos enzimas (ibogamina 10- hidroxilasa (I10H) y la Noribogaine-10-O-metiltransferasa), se logra la adición de un grupo metoxicarbonil en carbono 16 que produce finalmente la Voacangina [130]. La Voacangina es estructuralmente similar a otro alcaloide indólico cuyo nombre es la Voacangina hidroxindolenina, la diferencia más importante entre ambos compuestos es la hidroxilación en el carbono 7. Por su parte, la Rupicolina o también llamada Voacangina pseudoindoxil, difiere de los alcaloides anteriores por la oxidación que ocurre en el anillo de siete carbonos (Figura 2) [131]. Si bien todos estos compuestos han sido aislados de las especies de *Tabernaemontana*, aún no es claro si los cambios que se identifican entre los tres alcaloides ocurren de manera espontánea en la planta o si hay enzimas implicadas [130].

## 1.7. Compuestos tipo Indol

Los compuestos que poseen un núcleo indol en su estructura se encuentran presentes en productos de origen natural, plantas y animales [132]. La procedencia como metabolitos secundarios del aminoácido esencial Triptófano, hace que muchos sean moléculas que participan en diversos procesos biológicos esenciales, tal es el caso del ácido Indol-3-acético que es considerado una fitohormona [133]; la serotonina que es un neurotransmisor fundamental en el funcionamiento del sistema nervioso central en animales bilaterales o la Melatonina una hormona que interviene en el ciclo del sueño y se encuentra presente tanto en animales como plantas y microorganismos [134]. Los compuestos que poseen un indol también han sido un bloque importante para el descubrimiento de fármacos, entre los que se encuentran el Indol-3-carbinol (I3C) y su derivado natural 3,3 diindolimetano (DIM), los cuales han sido objeto de estudio como anticancerígenos y antioxidantes [135, 136]. Otro ejemplo es el alcaloide indólico Ajmalicina, el

cual es un medicamento antihipertensivo que actúa como antagonista del receptor adrenérgico  $\alpha_2$  [137] y de manera similar, la Reserpina otro alcaloide indólico que también se usa para tratar la hipertensión [138]. La Vinblastina es un alcaloide que se ha usado como anticancerígeno, para tratar el sarcoma de Kaposi y linfoma no Hodgkin [139].

En la investigación antiviral el Arbidol es un fármaco desarrollado en Rusia que se encuentra comercialmente disponible desde la década de 1990, posee un indol y es un fármaco altamente activo que se usa para tratar y prevenir el virus de la gripe A y B, el virus sincitial y el SARS [140]. El mecanismo de acción se centra en evitar la entrada del virus a la célula al inhibir la fusión de envoltura viral con la membrana de la célula [141], además de inducir interferón, lo que disminuye la frecuencia de complicaciones asociadas con infecciones virales. El Arbidol demostró también acción inhibitoria sobre la entrada y fusión del virus de la hepatitis C (HCV) en células Huh-7 [142]. La Delavirdina es un inhibidor de la transcriptasa reversa aprobado por la FDA en 1997 como parte de la terapia antirretroviral del VIH-1 [143]. La Atervirdina también se ha perfilado como un inhibidor de la transcriptasa reversa para VIH, demostrando *in vitro* inhibición de la replicación en leucocitos de sangre periférica, sin embargo un estudio en fase I no demostró actividad antirretroviral por sí sola [144]. El Golotimod es un péptido sintético que fue evaluado en monoterapia y en combinación con la Ribavirina para el tratamiento de HCV en un ensayo clínico y se determinó que es seguro y bien tolerado en ambas dosis administradas [145]. MK-8742 es un inhibidor tetracíclico de NS5 a base de Indol, que actualmente se encuentra en ensayos clínicos de fase 2b como parte de un régimen totalmente oral, libre de interferón para el tratamiento de la infección por el HCV [146]. Dado que la proteína NS5 juega un papel crítico en la replicación del flavivirus HCV y sus inhibidores han mostrado resultados favorables *in vitro* en los ensayos para VHC, los inhibidores de NS5 son componentes atractivos para su inclusión en estudios antivirales sobre todo si se administra en combinación con inhibidores de la proteasa NS3/4A como el MK-5172 [147]. TMC647055 es un indol macrocíclico que se ha identificado como inhibidor potente y selectivo del NS5 de VH) [148] y se está evaluando en ensayos clínicos de fase II en combinación con simeprevir [149].

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Productos naturales**

En la actualidad no existe un tratamiento específico para las arbovirosis causadas por ZIKV, DENV o CHIKV, únicamente se limita al manejo de la sintomatología en pacientes que presentan enfermedad febril, los cuales normalmente son fármacos analgésicos o antipiréticos. La Dipirona es un antiinflamatorio no esteroideo que según la Organización Panamericana de la Salud debe suministrarse bajo prescripción médica ya que ha causado ciertas alteraciones hemáticas en pacientes, por lo que se ha retirado del mercado en países como Estados Unidos [150]. Por otro lado, si bien existe una vacuna contra DENV, Dengvaxia® (CYD-TDV), Sanofi-Pasteur, la OMS solo recomienda su uso en paciente que hayan tenido una primo-infección por DENV ya que existe el riesgo de desarrollar dengue grave en personas susceptibles y seronegativos [151]; hasta el momento otros candidatos vacunales se encuentran en distintas fases de desarrollo [152] [153]. Aun no existen vacunas contra ZIKV, en estudio fase I se encuentra la VRC5283 la cual ha mostrado buena respuesta inmune por anticuerpos cuatro semanas después de su aplicación [154] aunque aún se deben comprender mejor la posible reacción cruzada con otros flavivirus que co-circulan como DENV y su impacto en la salud humana. En el caso de CHIKV, al igual que en ZIKV, no hay vacunas aprobadas para uso en seres humanos, si bien desde el 2016 ya registran 16 vacunas candidatas en estudios preclínicos y clínicos, es difícil aún cumplir con requerimientos de fase III, ya que se debe pronosticar un lugar y periodo de alta incidencia, lo cual es un reto [155].

El desarrollo de fármacos basados en compuestos naturales ha atraído una atención creciente debido

que son fuente de compuestos con núcleos químicos que no se han sintetizado antes. Aunque la información aún sigue siendo poca para ZIKV, naturalmente los compuestos derivados de las plantas son una fuente importante para el descubrimiento y el desarrollo de nuevos fármacos antivirales. La Quercetina, un flavonoide presente en una inmensa variedad de frutas y verduras también demostró inhibición y actividad contra las proteínas NS2b-NS3pro del ZIKV [156], lo que la convierte en un importante foco de estudio ya que las proteínas no estructurales representan (como ya se ha citado anteriormente), una función importante en la replicación viral. El polifenol galato de epigallocatequina demostró actividad anti ZIKV [157] y también ha demostrado tener un efecto inhibitorio en las etapas iniciales del ciclo viral de otro flavivirus, al actuar en la entrada del virus de la hepatitis C, donde se presume una interacción de esta molécula con la proteína E [158].

En el caso de DENV numerosos fitoquímicos se informan como compuestos antivirales con gran potencial tal como polisacáridos sulfatados con residuos lineales de galactopiranosilo extraídos de algas rojas comestibles que interfieren en las primeras etapas de la infección del DENV-2 y DENV-3 en células VERO y HepG2 [159]. Otro estudio demostró que polisacáridos del alga *Caulerpa cupressoides*, que son además una potencial herramienta frente a varios virus incluyendo el VIH, tienen actividad antiviral frente DENV-2 en las etapas de la adherencia e internalización de la partícula viral en células C6/36 y VERO [160]. Otros polisacáridos sulfatados aislados de las algas rojas *Gymnogongrus griffithsiae* y *Cryptonemia crenulata*, han demostrado actividad antiviral *in vitro* frente a los cuatro serotipos de DENV, siendo también los principales objetivos de estos compuestos las etapas de adherencia e internalización [161]. La Baicaleína, una flavona que evidenció actividad virucida directa, tuvo efectos en la adherencia del virus y la replicación, particularmente de DENV-2 [162]; la Naringenina y Fisetina ambas de la familia de los flavonoides, demostraron actividad virucida y actividad en etapas tardías de la infección, respectivamente [163].

Los extractos etanólicos de diferentes plantas también han sido fuente de gran interés. En un estudio donde se incluyó el extracto de las hojas de *Vernonia cinérea* y extractos de los tallos de *Tridax procumbens* se detectó un efecto antiviral frente al DENV; en estos extractos se identificaron cerca de 27 fitoconstituyentes siendo el más abundante el ácido gálico y las lactonas sesquiterpénicas, las cuales han mostrado actividad inhibitoria contra las proteínas NS2b y NS3pro, además estos componentes muestran actividad antiviral alta frente al Rhinovirus, Herpes simple tipe-1 y la Parainfluenza [164], el hecho de que tengan propiedades antivirales frente a otro virus pueden dar robustez a los ensayos y una base para la escogencia en futuros estudios. También se ha evaluado el extracto de *Phyllanthus*, el cual posee varios compuestos activos incluyendo el ácido gálico, el geraniol, la siringina y la corilagina, los cuales demostraron una fuerte actividad frente DENV-2 en diferentes puntos del ciclo viral, por lo que ha sido postulado como un potencial agente al inhibir la unión del virus a la célula, la entrada viral, la producción de poliproteínas virales, la replicación del ARN viral, así como el ensamblaje viral y maduración de la infección en células VERO [165]. Los extractos de *Andrographis paniculata* y *Momordica charantia* han evidenciado la capacidad para inhibir especialmente la actividad de DENV-1 en VERO principalmente en las etapas iniciales de la infección, efecto que se atribuye a la presencia de cantidades significativas de ciertos flavonoides como luteolina, kaempferol y quercetina [166]. Los extractos de *Uncaria guinanensis* tuvieron en células Huh-7 efectos antivirales para DENV-2, adicionalmente se detectó inmunomodulación de citocinas y quimiocinas muy probablemente por efectos de un compuesto, el flavonoide kaempferitrina, al cual se le han descrito bondades antiinflamatorias y frente al dolor [167], por lo que la modulación de la respuesta de hospedero también es un punto de interés en la búsqueda de posibles antivirales.

Estudios describen efectos antivirales del Galato de epigallocatequina y la Delfinidina frente a ambos flavivirus, demostrando que el mayor efecto es ejercido en etapas tempranas de la infección, lo que sugiere que interfiere con la unión del virus al receptor de la célula [168]. El producto natural cavinafungina fue evaluado en una serie de ensayos genéticos, proteómicos y bioquímicos frente al

DENV y ZIKV, concluyéndose que es un agente antiviral selectivo a estos dos virus ya que interfiere con una peptidasa de señal asociada al retículo endoplasmático (SPase), su importancia radica en que es en el RE donde la SPase modifica las proteínas virales prM y E para la maduración del virus (común para ZIKV, DENV y en general para flavivirus), interfiriendo finalmente con el ciclo replicativo [169]. Otras estrategias se han enfocado en la inmunomodulación con moléculas que promuevan una respuesta por parte del hospedero, tal es el caso del tratamiento de células humanas con AV-C (1-(2-fluorofenil)-2-(5-isopropil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1,2-dihidrocromeno [2,3-c] pirrol-3,9-diona), una molécula pequeña que activa la respuesta innata y junto con la asociación al interferón tipo I, inhiben fuertemente la replicación de ZIKV y DENV [170].

Existen trabajos con aceites esenciales obtenidos de *Lantana grisebachii* cuya actividad antiviral por inhibición directa (posibles virucidas) se estudió en dos flavivirus de interés médico, el DENV y la Fiebre amarilla [171]. Los aceites esenciales derivados de *Lippia alba* y *Lippia citriodora* demostraron una reducción en la formación de unidades formadoras de placa para los cuatro serotipos de dengue antes de la adherencia del virus en la célula, al parecer causando inactivación directa del virus [172].

Dentro de los compuestos con potencial de inhibir pasos iniciales del ciclo replicativo está la Baicaleína, la cual posee un efecto virucida, es capaz de inhibir la adhesión del CHIKV en células VERO, replicación y síntesis de proteínas [173]. Se ha comprobado que el Galato de epigallocatequina es capaz de inhibir tanto pasos previos como posterior a la replicación de CHIKV en sinergia con Suramina, al interferir con la entrada, replicación y la liberación de partículas virales infecciosas [174]. La Berberina es un alcaloide de origen natural y con el cual se ha demostrado *in vitro* su capacidad inhibitoria en la replicación CHIKV al regular negativamente la activación de MAPK inducida por el virus y reducir notablemente la infección [175]. Una toxina marina aislada de *Trichodesmium erythraeum*, la aplysiatoxina ha demostrado actividad frente al CHIKV en etapas posteriores a la entrada viral [176]. Otro compuesto con potencial de inhibir el genoma viral de CHIKV es la Silimarina, la cual también demostró la reducción tanto la eficiencia de replicación del CHIKV como la regulación negativa de la producción de proteínas virales NSP1, NSsP3 y E2E1 [177]. La Curcumina es capaz de interferir en etapas tempranas de la infección, la cual en estudios *in vitro*, evitó la unión de la envoltura viral con la membrana celular de una manera dependiente de la dosis, además que también ha inhibido a DENV y ZIKV [178].

## 2.2. Células

Para determinar el efecto antiviral *in vitro* se hizo uso de tres líneas celulares. La línea celular VERO establecida a partir de células de riñón del mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) [179] las cuales se han usado durante años en Virología, siendo una línea celular adherente que ha permitido el desarrollo de estudios de replicación viral y ensayos de placas, además las células VERO son deficientes de interferón [180] lo que las hace susceptibles y permisivas a varias infecciones virales y por ende, al estudio y desarrollo de posibles agente antivirales, siendo la primera línea de análisis para muchos modelos virales. Si bien las VERO son fundamentales para ensayos iniciales *in vitro*, fue importante poder evaluar una línea celular epitelial de origen humano, que permitiera comparar los resultados obtenidos en VERO. En este sentido, A549 es una línea epitelial derivada de adenocarcinoma alveolar de pulmón humano [181], al igual que VERO son células adherentes en las cuales se ha demostrado su capacidad para soportar la infección, replicación y liberación de partículas virales infecciosas de ZIKV [182], DENV [183] y se ha informado que a CHIKV se une de manera eficiente a receptores presentes en A549, existiendo una buena correlación entre la eficiencia de la unión viral y la sensibilidad a la infección [184]. Finalmente, fue interesante demostrar el comportamiento de las inhibiciones obtenidas en VERO en una línea humana que además estuvieran relacionadas con un blanco principal de las infecciones, en este caso células de linfoma histiocítico, las cuales se han estudiado ampliamente para caracterizar el comportamiento y la diferenciación de los monocitos [185]. Las U937 aquí usadas son células tratadas con forbol-12-miristato-13-acetato [186] que induce un cambio a fenotipo adherente,

como se ha descrito anteriormente [187]. Las U937 se han usado en ensayos *in vitro* para DENV al demostrar el potencial antiviral de la Cloroquina [188], se ha demostrado infección productiva con ZIKV [189] y de varios linajes de CHIKV [190].

### 2.3. Antecedentes del grupo de investigación

La OMS en 2006 ante el impacto en salud humana de la enfermedad causada por DENV, conformó una agenda en la cual, había puntos enfocados en la búsqueda de fármacos anti-DENV, que pudieran tener un uso profiláctico o terapéutico, los cuales podían ser fármacos licenciados o productos naturales. En ese contexto, la unidad de virosis tropicales del PECET, en ese mismo año, inicia una línea de investigación en antivirales. Inicialmente, se comienza con la evaluación de la Lovastatina como antiviral, cuyos resultados *in vitro*, indicaron que este fármaco afecta el ensamblaje del virus y disminuye significativamente la liberación del mismo [191], además estudios *in vivo* demostraron que este fármaco disminuye significativamente la viremia en ratones AG129 aumentando el tiempo de supervivencia de los mismos [192].

Por otro lado, pero sin dejar las prioridades de la OMS, los resultados obtenidos del proyecto "Estudio químico y actividad citotóxica de especies promisorias pertenecientes al género *Tabebuia* en la Costa Atlántica Colombiana", liderado por el Laboratorio de Investigaciones Fitoquímicas y Farmacológicas de la Universidad de Cartagena, donde se identificaron aquellas plantas utilizadas por habitantes de la región para el tratamiento de síndromes febriles, entre ellos el Dengue [193] abrió el camino en el desarrollo de investigaciones encaminadas al descubrimiento de las bondades de compuestos aislados de plantas con uso en la medicina ancestral de la comunidad del Caribe colombiano. Adicionalmente, se inició un proyecto con financiación de COLCIENCIAS, en el cual se identificaron 32 extractos derivados de la Región Caribe Colombiana con potencial antiviral en diferentes líneas celulares y con varias cepas virales de DENV. Los extractos de la planta *Cassia grandis* y de la planta *Tabernaemontana cymosa* indujeron porcentajes de inhibición viral más altos en los cultivos infectados con la cepa DENV2/NG (cepa asociada a cuadros clínicos de Dengue) que en los cultivos infectados con la cepa DENV2/16681 (cepa asociada a cuadros clínicos de Dengue Severo). Adicionalmente, los extractos derivados de la planta *Cassia grandis* indujeron una inhibición más alta en una línea celular de origen monocítico (U937), mientras que el extracto derivado de la planta *Tabernaemontana cymosa*, indujo porcentajes de inhibición más altos en células VERO [194]. Posteriormente, se desarrolló una investigación en la cual se identificó la Cumarina A y la Cumarina B de *Mammea americana* con actividad promisoriosa frente a la infección por CHIKV y Acetato de Lupeol de *T. cymosa* con inhibiciones significativas de la infección por DENV-2/NG [102].

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los medicamentos antivirales son una necesidad cada vez más creciente en epidemias de rápida propagación. En este sentido, sigue existiendo la necesidad no satisfecha de fortalecer la búsqueda de compuestos con potencial antiviral en aquellas virosis en las cuales no existe un tratamiento específico. Adicionalmente y a pesar de que existen muchas moléculas con un núcleo indol, son limitados los estudios en el área como agentes antivirales y sus posibles beneficios terapéuticos en el tratamiento de enfermedades arbovirales, las cuales han cobrado un especial interés en salud pública durante los últimos años debido a los brotes, re-emergencia e introducción como agentes virales endémicos en ciertas zonas de Latinoamérica [195].

En este sentido, el ZIKV luego de su aparición en Brasil a principios del 2015 y la rápida propagación por el continente en áreas donde se encuentra presente el vector, se asoció a enfermedades congénitas como microcefalia y al aumento de casos del síndrome de Guillain-Barré, que llevó a declarar en 2016 [196] emergencia internacional para la salud pública durante un periodo de 9 meses y sin embargo se

han reportado desde entonces 31.576 casos en 2018 de Zika solo en América [89]. Por su parte, el CHIKV fue el actor principal de una re-emergencia ocurrida en 2005 en el continente Americano y desde entonces el causante de 25.627 casos confirmados aproximadamente, siendo el causante de un marcado compromiso articular que en algunos casos resulta ser crónico [197]. Otra de las arbovirosis de mayor importancia a nivel mundial es la causada por el DENV, el cual es endémico en más de 100 países e infecta cerca de 390 millones de personas cada año, causando una variedad de cuadros clínicos, entre el que destaca el Dengue grave debido al riesgo vital que éste supone al causar un posible choque hipovolémico. Adicionalmente, los tres virus pueden confundirse clínicamente ya que también presentan cuadros similares en la fase aguda de la enfermedad.

Con base al aumento de casos a nivel mundial por parte del ZIKV, CHIKV y DENV y la falta de opciones terapéuticas para estas virosis, se hace necesario la identificación de moléculas que puedan ser usadas como posibles fármacos antivirales, cuyo mecanismo de acción pueda inhibir alguna o varias de las etapas dentro del ciclo replicativo viral sin tener efecto tóxico sobre las células del hospedero. En concordancia con el potencial que nuestro país posee sobre la gran variedad de flora y el conocimiento de la misma con usos medicinales, urgen los estudios que incluyan evaluar productos naturales en la búsqueda de nuevos agentes antivirales que sean seguros, eficaces y económicos, de esta manera promover su posible uso en los países endémicos que usualmente están en vía de desarrollo.

#### 4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es posible identificar efecto inhibitorio de alcaloides indólicos derivados de *T. cymosa* contra ZIKV, CHIKV y DENV?

#### 5. HIPÓTESIS

**Hipótesis nula:** los alcaloides indólicos aislados de *T. cymosa* no son capaces de inhibir la infección por ZIKV, CHIKV y DENV *in vitro*.

**Hipótesis alterna:** los alcaloides indólicos aislados de *T. cymosa* son capaces de inhibir la infección por ZIKV, CHIKV y DENV *in vitro*.

#### 6. OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la actividad *in vitro* e interacciones *in silico* de tres alcaloides indólicos aislados de *T. cymosa* recolectada en la Región Caribe colombiana frente la infección por ZIKV, CHIKV y DENV.

#### 7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Evaluar la toxicidad de los compuestos sobre células VERO, U937 y A549.
2. Evaluar el efecto antiviral de los compuestos sobre la infección por ZIKV, CHIKV, DENV-2 mediante la estrategia antiviral combinada.
3. Determinar el posible paso del ciclo replicativo que está siendo afectado por los alcaloides indólicos en células mediante estrategias antivirales individuales
4. Evaluar la actividad antiviral de los compuestos el efecto en POST-tratamiento sobre replicación del genoma viral y síntesis de proteína viral.
5. Determinar la afinidad de interacción de los compuestos alcaloides indólicos con una proteína estructural y una no estructural de los tres modelos virales por medio de acomplamiento molecular
6. Evaluar la estabilidad conformacional del compuesto con mejor efecto virucida y mejor energía de unión con la proteína de envoltura de DENV, mediante dinámica molecular.

## 8. ENFOQUE METODOLÓGICO

Para el enfoque metodológico *in vitro* se sigue el flujo de la **Figura 1**.

Para evaluar la toxicidad de alcaloides indólicos en las líneas celulares VERO, U937 y A549 se cultivaron las líneas celulares de mamífero (9.1) y se trataron con Voacangina, Voacangina-OH y Rupicolina con el fin de hacer el ensayo de viabilidad (9.5).

Para determinar el efecto antiviral de alcaloides indólicos mediante tamizaje antiviral se obtuvieron los stocks virales de ZIKV, CHIKV y las dos cepas de DENV (9.2), siguiendo las indicaciones de la estrategia tamizaje antiviral (10.1). Se determinaron las partículas virales infecciosas por el ensayo en placa (15.6) de sobrenadantes.

Para establecer el efecto antiviral de tres alcaloides indólicos en diferentes pasos del ciclo replicativo de los virus en la línea celular VERO se realizó tratamiento a las células antes de la infección (10.2), durante la infección (10.3) y después de la infección (10.4). Los sobrenadantes colectados se procesaron por la técnica de plaqueo (11.1) y las monocapas post-tratadas se sometieron a RT-qPCR (11.2). Las diferencias en la inhibición de partículas virales infecciosas y de copias genómicas fue determinado por un análisis estadístico (11.4)

Para “Comparar el efecto antiviral de tres alcaloides indólicos que dieron promisorios en VERO en dos líneas de origen humano U937 y A549” se realizó tratamiento a las células antes de la infección (10.2) y después de la infección (10.4). Los sobrenadantes colectados se procesaron por la técnica de plaqueo (11.1) y las monocapas se sometieron a RT-qPCR (11.2). Las diferencias en la inhibición de partículas virales infecciosas y de copias genómicas fue determinado por un análisis estadístico (11.4)

Para determinar el efecto sobre la replicación del genoma viral y la síntesis de proteína de los compuestos promisorios de Post-tratamiento (10.4), se colectaron las monocapas y se procesaron RT-qPCR (11.2) y se cuantificó proteína viral por técnica de CELL-ELISA (11.3)

Para evaluar la interacción de los compuestos con una proteína estructural y una no estructural se realizó acoplamiento molecular (12.3). Además, se realizó dinámica molecular para conocer la estabilidad de un complejo según se describe en la metodología (12.4)

## 9. MÉTODOS

Para propósitos prácticos todos los resultados se muestran en porcentaje de infección asumiendo el 100% de infección un control de células no tratado pero infectado con el virus evaluado. El presente trabajo se desarrolló con la aprobación del MINAMBIENTE Contrato 130 de 2016 RGE0176 y la financiación de Colciencias.

### 9.1. Mantenimiento de las células

**VERO/U937/A549:** Se cultivó la línea celular derivada de mamífero VERO, que fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC®) CCL-81™ y dos líneas de origen humano, U937 adherentes y A549 cultivadas con Dulbecco Modified Eagles Minimal (DMEM) suplementado con 10% con suero fetal bovino (SFB) suplementado con 0,25 µg/mL de Anfotericina B ( GIBCO), 100 µg/mL de Estreptomicina (GIBCO), 100 U/mL de Penicilina (GIBCO). Las células fueron incubadas en atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%, 37°C y humedad relativa, a no ser que se especifique algo diferente. Una vez alcanzaron confluencia, el pasaje de las células fue realizado con tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) al 0,25%. Se adicionó 500 µL de tripsina a botella de 25cm<sup>2</sup> y luego de máximo 10 minutos (min) a 37° C,

se adicionó 1500 µL de DMEM 10%SFB para detener la acción de la tripsina. El contenido se adicionó a tubo falcón estéril de 15 mL y se centrifugó 1800 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante para eliminar los residuos de tripsina y se resuspendió el botón celular en 1 mL de DMEM 10% SFB. Se realizó conteo de células para las siembras requeridas. **C6/36:** Se cultivó la línea celular derivada de larvas de mosquitos *Ae. albopictus* que fueron donadas por Donadas por la Dra. Raquel Ocazonez, cultivadas con medio Leibovitz (L-15) suplementado con 10% con SFB, 20 mM HEPES y suplementado con 0,25 µg/mL de Anfotericina B (GIBCO), 100 µg/mL de Estreptomicina (GIBCO), 100 U/mL de Penicilina (GIBCO). Las células fueron incubadas a 28° C sin requerimiento de CO<sub>2</sub>. Una vez alcanzaron confluencia, el pasaje de las células fue realizado por desprendimiento mecánico con ayuda de un raspador. El contenido se adicionó a tubo estéril de 15 mL y se centrifugó 1800 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado celular en 1 mL de medio. Se realizó conteo de células para las siembras requeridas.

## 9.2. Virus

**Stock trabajo ZIKV:** Se obtuvo el aislamiento clínico de ZIKV/Acol (Anexo 1), con el cual se inoculó 1 mL junto con 1 mL L-15 al 2% de SFB sobre monocapas de C6/36 con un 90% de confluencia en botella de 75 cm<sup>2</sup>, durante 2 horas. Luego del tiempo de incubación, se adicionó 13 mL de medio L-15 al 2% de SFB y se llevó nuevamente a incubación durante 7 días o hasta observar la formación de sincitios. Se recolectó el contenido de la botella y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min a 4° C. El sobrenadante se recolectó en un tubo con 30% de SFB y se alicuotó en viales de 1,5 mL. Los stocks se almacenaron a -80° C hasta su uso.

**Stock trabajo CHIKV:** El aislamiento clínico CHIKV/ACol, el cual fue donado por el PECET, (Universidad de Antioquia), y que pertenece al linaje asiático. Se usaron células VERO con una confluencia de aproximadamente 95% en botellas con área de 75 cm<sup>2</sup> con filtro. Las células fueron inoculadas con 1 mL del stock de uso del virus junto con 1 mL de medio DMEM 2% SFB y llevadas a incubación a 37° C durante 2 horas con 5% CO<sub>2</sub>. Luego de este tiempo se adicionaron 13 mL de DMEM suplementado con 2% de SFB y se llevaron a incubación nuevamente. Entre 3 y 4 días post-infección (dpi) se recolectó el contenido de la botella y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min a 4° C. El sobrenadante se recolectó en un tubo con 30% de SFB y se alicuotó en viales de de 1.5 mL. Los stocks se almacenaron a -80° C hasta su uso.

**Stock trabajo DENV:** Las cepas de referencia DENV-2/NG y DENV-2/16681 (aisladas de un paciente con Dengue, y Dengue Grave, respectivamente) fueron donadas amablemente por el Doctor Jorge Emilio Osorio (Department of Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin, Wisconsin-Estados Unidos) y se produjeron en células C6/36 para los diferentes ensayos. Se usaron células con una confluencia de aproximadamente 90% en botellas con área de 25 cm<sup>2</sup> sin filtro. Las células fueron inoculadas con 1 mL del stock de uso de cada virus y llevadas a incubación a 37° C durante 2 horas. Luego de este tiempo se adicionaron 4 mL de L-15 al 2% de SFB y se llevó la botella a incubación a 28° C sin presencia de CO<sub>2</sub>. Entre 3 y 4 dpi se recolecta el contenido de la botella promoviendo el desprendimiento celular, el contenido se adicionó a tubo falcon estéril y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min a 4° C. El sobrenadante se recolectó en un tubo con 30% de SFB y se alicuotó en viales de 1,5 mL. Los stocks se almacenaron a -80° C hasta su uso.

## 9.3. Compuestos

El Laboratorio de Investigaciones Fitoquímicas y Farmacológicas de la Universidad de Cartagena (LIFFUC) (Cartagena, Colombia) fue el encargado de realizar el aislamiento, purificación e identificación de los compuestos Voacangina, Voacangina hidroxindolenina (Voacangina-OH) y Rupicolina obtenidos de *T. cymosa*. Las estructuras se muestran en la Figura 2.

Para los diferentes ensayos se realizó un stock madre de cada compuesto. Para el caso de la Voacangina, 2 mg se diluyeron con 300  $\mu\text{L}$  de Dimetilsulfóxido (DMSO) y 200  $\mu\text{L}$  de etanol para una concentración final de 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Por su parte, 1mg de Voacangina-OH y un 1mg Rupicolina se diluyeron en 1000  $\mu\text{L}$  de etanol, ambos a una concentración final de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Teniendo en cuenta el peso molecular de cada compuesto (368,477 g/mol para Voacangina y 384,476 g/mol para Voacangina-OH y Rupicolina), se trabajó con su equivalente en  $\mu\text{M}$ .

#### 9.4. Controles positivos de inhibición

En el presente trabajo se usó la Heparina como control positivo de inhibición en la estrategia de Pre-tratamiento para las cepas de DENV-2 evaluadas ya que este compuesto fue el primer polisacárido que demostró efectividad para inhibir la replicación de DENV-2 en VERO, BHK y células hepáticas humanas [33] [198] al unirse al receptor Heparán Sulfato y bloquear la entrada del virus a la célula [199]. Otro compuesto polisulfatado, la Suramina fue usado como control positivo de inhibición en la estrategia de Trans-tratamiento para DENV y en pre-tratamiento y trans-tratamiento para ZIKV y CHIKV/Acol, basados en el descubrimiento que Suramina es capaz de inhibir significativamente la infección por ZIKV en las células VERO al unirse a la proteína de envoltura y a la NS3 [200], también demostrando su unión al dominio III de la envoltura DENV y a la NS3 [201, 202], representando para ambos flavivirus una inhibición incluso de múltiples pasos del ciclo replicativo. Además, en el caso de CHIKV la Suramina interfirió con la unión del virus *in vitro*, además se demostró *in silico* que es capaz de interactuar con el heterodímero E1/E2 [203]. Debido a los mecanismos descritos en múltiples pasos del ciclo replicativo, la Suramina también se usó en tamizaje antiviral con inhibiciones significativas para los cuatro virus evaluados en células VERO. En el caso de la estrategia de post-tratamiento se eligió Ribavirina como control positivo de inhibición, un análogo de nucleósido que ha demostrado inhibir la replicación *In vitro* de ZIKV [204], DENV-2 [205] y CHIKV [206]. Cabe mencionar que al comparar los resultados de los compuestos obtenidos en pre-tratamiento para CHIKV/Acol en A549, la Suramina no inhibió de manera significativa las partículas virales infecciosas en este modelo viral, lo que sí ocurrió con la Heparina demostrando que los posibles mecanismos antivirales también dependen en gran medida de la línea celular usada.

#### 9.5. Ensayo de viabilidad

La técnica de MTT (Sigma-Aldrich), mide la viabilidad celular basada en la reducción metabólica de la sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2H)-bromuro de tetrazol (tetrazolio) realizado por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, lo cual lleva a la formación de un compuesto coloreado de color azul (formazán). A mayor capacidad metabólica, mayor viabilidad y por ende mayor producción de formazán [207]. Fueron sembradas 30000 células VERO por pozo con DMEM 2% SFB, en placa de 96 pozos. A las 24 horas posteriores a la siembra, se adicionaron concentraciones seriadas de cada compuesto que van desde 8,4  $\mu\text{M}$  hasta 271,4  $\mu\text{M}$  para Voacangina y de 8,1  $\mu\text{M}$  hasta 260,1  $\mu\text{M}$  para Voacangina-OH y Rupicolina, diluidas DMEM 2% SFB. Las placas se incubaron durante 48 horas, luego de este tiempo se retiró el medio y se realizaron dos lavados con PBS 1X y luego se adicionó 50  $\mu\text{L}$  de MTT/pozo a una concentración de 0.5 mg/mL. Se protegió la placa de la luz y se llevó a incubación 37° C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 horas. Una vez pasado el tiempo, se adicionó 100  $\mu\text{L}$  de DMSO. Se dejó incubando durante 15 min a temperatura ambiente. Se leyó la placa en un espectrofotómetro a Densidad Óptica (DO) [208] de 450 nm en un equipo Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific), con agitación de 20 segundos (s) antes de la lectura. En todos los casos se obtuvo la DO de controles sin compuestos a las mismas condiciones de incubación que los pozos experimentales que representan el 100% de viabilidad. Cada experimento fue realizado en dos unidades experimentales independientes, con tres replicas cada una (n:6).

#### 9.6. Análisis estadístico:

La normalidad de los datos se determinó usando la prueba Shapiro Wilk. Las diferencias estadísticamente significativas se identificaron usando una prueba paramétrica *t*-Student (datos con distribución normal) o la prueba no paramétrica U de Mann Whitney (datos con distribución no normal), considerando para todos los casos diferencias estadísticamente significativas un valor *p* menor a 0.05 ( $p < 0.05$ ).

## **10. ESTRATEGIAS ANTIVIRALES *IN VITRO***

### **10.1. Estrategia antiviral combinada**

El objetivo fue determinar si algún alcaloide indólico poseía un efecto antiviral general sobre el ciclo replicativo de DENV-2/NG, DENV-2/16681, CHIKV/Acol y ZIKV/Acol, sin discernir en cuál etapa específica se presenta el efecto. Para ello, se sembraron  $3 \times 10^4$  células VERO por pozo en una placa de 96 pozos con DMEM al 2% SFB y se incubaron a 37° C con 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Luego del tiempo de incubación, se retiró el medio con ayuda de bomba peristáltica y se adicionaron los compuestos en concentraciones no citotóxicas sobre las monocapas, y se llevaron a incubación durante 24 horas más; este paso corresponde a la estrategia pre-tratamiento o antes de la infección. Al día siguiente, se realizó una mezcla 1:1 del compuesto a la concentración de uso con el virus seleccionado a una multiplicidad de infección de 1 (MOI 1), para un volumen de 50 µL en total por cada pozo, y se incubó por 1 hora a temperatura de refrigeración (2 – 8°C). Luego de la incubación, en la misma unidad experimental, se retiró el sobrenadante y se adicionó la mezcla sobre las monocapas para llevarlas a incubación durante 2 horas a 37° C con 5% CO<sub>2</sub>; este paso representa el trans-tratamiento y evalúa el posible efecto virucida que pueda tener el compuesto sobre la partícula viral infecciosa. Luego de 2 horas de infección, se retiró el inóculo y se adicionó una nueva preparación de los compuestos a la misma concentración de uso en los pasos anteriores, y se incubó durante 24 horas a 37° C con 5% CO<sub>2</sub>; este paso representa el post-tratamiento y evalúa la capacidad del compuesto para interferir en pasos posteriores a la entrada del virus. Luego del tiempo de incubación se recolectaron los sobrenadantes y se almacenaron a -80° C hasta la cuantificación de partículas virales infecciosas por la técnica de titulación por plaqueo. En cada unidad experimental se evaluaron controles sin compuesto (CSC) como control positivo de infección, que corresponde a pozos con las mismas condiciones de incubación e infectados con el virus a MOI 1 sin presencia de ningún compuesto. Adicionalmente se usó un control positivo de inhibición bajo las mismas condiciones experimentales de los alcaloides indólicos, la Suramina (Sigma Aldrich ®), compuesto reportado previamente como inhibidor de DENV, ZIKV y CHIKV [200, 202, 203]. Las diferentes condiciones tuvieron tres réplicas y dos unidades experimentales (n:6). La estrategia antiviral combinada permite concluir si el compuesto tiene algún efecto antiviral, sin contribuir en el esclarecimiento del paso del ciclo replicativo específico que pudiera estar siendo afectado. Para ellos es necesario realizar las estrategias antivirales individuales.

### **10.2. Pre-tratamiento**

En esta estrategia de tratamiento, se evalúa la efectividad del compuesto sobre las células antes de estar en contacto con el inóculo viral, es decir una posible asociación a receptores lo que podría crear un impedimento estérico con la glicoproteína de envoltura del virus, o modificaciones a nivel celular que posiblemente inhiban la internalización u otros pasos del ciclo replicativo viral. Se sembraron  $6 \times 10^4$  células U937 y  $8 \times 10^4$  células VERO y A549 en placa de 48 pozos, con DMEM al 2% SFB, se incubó en atmósfera al 5% CO<sub>2</sub> a 37°C durante 24 horas. Luego del tiempo de incubación, se retiró el sobrenadante con ayuda de la bomba peristáltica. Luego se adicionó el compuesto a una concentración no citotóxica y posteriormente se incubó la placa nuevamente por 48 horas en atmósfera al 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Posterior al tiempo de incubación con el tratamiento, se retiró el sobrenadante de los pozos y se adicionó el virus a una MOI 1, luego se incubó la placa a 37°C en atmósfera al 5% CO<sub>2</sub> durante dos horas. Luego se retiró el inóculo viral y nuevamente se incubó la placa a 37°C en atmósfera al 5% CO<sub>2</sub> durante 48 horas. A las

48 horas, se recolectaron los sobrenadantes y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta cuantificación de partículas virales infecciosas por titulación.

### **10.3. Trans-tratamiento**

Se sembraron  $6 \times 10^4$  células VERO por pozo en placa de 48 pozos, con DMEM al 2% SFB, se incubaron en atmósfera al 5%  $\text{CO}_2$  a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Al día siguiente se realizó una mezcla por partes iguales de inóculo viral a una MOI de 1 y de los compuestos a la concentración no citotóxica (1:1). Esta mezcla se incubó por una hora a temperatura de refrigeración ( $2 - 8^{\circ}\text{C}$ ). Se retiró el medio de las células y se adicionó la mezcla en un volumen de  $100\ \mu\text{L}$  por pozo y se llevó a incubación por dos horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se retiró el inóculo viral y se adicionó medio DMEM al 2% SFB fresco. Se incubó nuevamente a  $37^{\circ}\text{C}$  en atmósfera al 5%  $\text{CO}_2$  durante 48 horas. Luego se recolectaron los sobrenadantes y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento, por técnica de titulación en placa para partícula viral infecciosa.

### **10.4. Post-tratamiento**

El objetivo de esta estrategia individual es evaluar el efecto antiviral de los compuestos en los pasos posteriores a la internalización del virus en la célula (procesos que pueden incluir traducción, replicación, ensamblaje, maduración y liberación (REF)). Se sembraron  $6 \times 10^4$  células U937 y  $8 \times 10^4$  células VERO y A549 en placa de 48 pozos, con DMEM al 2% SFB, se incubaron en atmósfera al 5%  $\text{CO}_2$  a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Luego, se retiró el medio de las células y se adicionó el inóculo viral a MOI 1, y se llevó a incubación durante dos horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en atmósfera al 5%  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, se retiró el inóculo viral y se adicionó cada compuesto a concentraciones no citotóxicas de uso y se llevó nuevamente a incubación por 48 horas en atmósfera al 5%  $\text{CO}_2$  a  $37^{\circ}\text{C}$ . Tras las 48 horas de incubación, se recolectaron los sobrenadantes y monocapas y almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento, por RT-qPCR para determinar copias genómicas en monocapas y técnica de titulación en placa para partícula viral infecciosa en sobrenadante.

### **10.5. Análisis estadístico**

La normalidad de los datos se determinó usando la prueba Shapiro Wilk. Las diferencias estadísticamente significativas se identificaron usando una prueba paramétrica *t*-Student (datos con distribución normal) o la prueba no paramétrica U de MannWhitney (datos con distribución no normal), considerando para todos los casos diferencias estadísticamente significativas con un valor *p* menor a 0.05 ( $p < 0.05$ ).

## **11. CUANTIFICACIÓN VIRAL**

### **11.1. Titulación**

Para cuantificar las partículas virales infecciosas se realizó titulación viral por la técnica de plaqueo. Se sembraron células VERO en placas de 24 pozos para la titulación de ZIKV/Col y CHIKV/Col,  $1,2 \times 10^5$  y  $1,8 \times 10^5$  células por pozo, respectivamente. Para la titulación de DENV-2/NG y DENV-2/16681, se sembraron  $8 \times 10^4$  células VERO en placa de 48 pozos. La siembra se realizó con DMEM 2% de SFB. Luego de 24 horas de incubación, se realizaron diluciones seriadas en base 10 de los sobrenadantes obtenidos del tamizaje y las estrategias de tratamiento individuales. Se adicionó  $200\ \mu\text{L}$  de cada dilución sobre las monocapas de la placa de 24 pozos y  $100\ \mu\text{L}$ , en la placa de 48 pozos, y se llevaron a incubación durante 2 horas. Luego de este tiempo, se removió el inóculo viral con ayuda de bomba peristáltica y se adicionó 1 mL de carboximetilcelulosa (CMC) (Sigma-Aldrich) al 3%, mezclado en partes iguales con medio DMEM 2X suplementado con SFB 4%, para obtener una concentración final de

CMC/DMEM 1.5%/1X SFB al 2%. Luego, se incubaron nuevamente a 37°C en atmósfera al 5% CO<sub>2</sub>, 7 días para ZIKV/Col, 3 días para CHIKV/Acol, y 12 días para DENV-2/NG y DENV-2/16681. Luego del tiempo de incubación, se retiró el medio semisólido y se lavaron 2 veces los residuos de CMC con PBS1X. Posteriormente, se adicionó paraformaldehído [209] (Sigma-Aldrich®) al 4% preparado en PBS1X, 400 µL/pozo y 200 µL/pozo, para las placas de 24 y 48 pozos, respectivamente, y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Finalmente, se retiró el PFA y se adicionó Cristal violeta por 10 min. Se retiró el colorante y luego se lavó la placa con agua corriente. Se secaron las placas a temperatura ambiente, para posteriormente contar el número de placas por pozo y determinar las unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL).

## 11.2. PCR en tiempo real (RT-qPCR)

Se realizó extracción del ARN viral de monocapas recolectadas en el post-tratamiento con el kit Zymo Quick-RNA Viral R1035, de acuerdo a las indicaciones del fabricante y se cuantificó el ARN a 260 nm en NanoDrop One ® de Thermo Scientific ®. El DNA copia (cDNA) se obtuvo haciendo uso del kit M-MLV Reverse Transcriptase PROMEGA ® siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez obtenido el cDNA, se almacenó a -20° C hasta su uso.

Para la RT-qPCR se usó el kit PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific Amplification ®). El Protocolo usado en el quipo QuantStudio design para CHIKV y ZIKV fue: Un ciclo de 50°C por 2 min y 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 s y 60°C por 1 min [210]. El protocolo para DENV fue 95°C por 5 min, 35 ciclos (95°C por 30 s, 55°C por 45 s, 72 °C por 45 s) con una extensión final a 72°C por 10 min.

Los cebadores utilizados para CHIKV amplifican un fragmento de 125 pb de la NSP4 [211]

- 6856F 5' TCACTCCCTGTTGGACTTGATAGA 3'
- 6981c 5' TTGACGAACAGAGTTAGGAACATACC 3'

Los cebadores de ZIKV amplifican un fragmento de 76 pb de la proteína E [55]

- 1086F 5'-CCGCTGCCCAACACAAG-3'
- 1162c 5'-CCACTAAYGTTCTTTTGCAGACAT-3';

Los cebadores usados para DENV-2 amplifican una región de 119 pb de la región C/prM [212]

- mD1-F-5'-TCA ATA TGC TGA AAC GCG AGA GAA ACC G-3'
- mTS2-F-5'-CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG TTT-3'

Se almacenaron los amplificados a -20° C. Los resultados se analizaron en el program QuantStudio design & analysis software.

Se realizó cuantificación absoluta de copias genómicas con los resultados obtenido de la RT-qPCR, para lo cual se construyeron plásmidos recombinantes de los virus CHIKV y ZIKV utilizando el kit CloneJET PCR Cloning, que amplificaron los mismos fragmentos de los cebadores previamente descritos. Los plásmidos usados para DENV-2 se obtuvieron previamente [212]. Se realizan diluciones seriadas en base 10 desde 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-8</sup>. Los coeficientes de correlación de las curvas fueron 0,987 para el plásmido con el fragmento de CHIKV; 0,996 para ZIKV, y 0.993, para DENV-2.

## 11.3. Cuantificación de proteína viral intracelular

La determinación de la cantidad de proteína viral se realizó con el ensayo del Cell-ELISA descrito previamente [191]. Para el proceso se realizó la siembra en placa de 96 pozos de 3x10<sup>4</sup> células VERO o A549 por pozo y de 2x10<sup>4</sup> células U937 por pozo. A las 24 horas posteriores a la siembra se infectaron las monocapas a MOI 1 con CHIKV/Acol y ZIKV/Col. Luego de 2 horas de incubación se retiró el inóculo viral y se adicionaron los diferentes tratamientos que demostraron una inhibición significativa en etapas posteriores a la infección viral. El lavado con PBS 1X y la fijación con PFA 4% de las monocapas por 30

min a temperatura ambiente, se realizó 24 hpi para CHIKV/ACol y 48 hpi para ZIKV/Col. Luego de la incubación con PFA se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se permeabilizaron las monocapas con 0.1 de Triton X-100 durante 30 min. Posterior a este paso, se inactivaron las peroxidasas endógenas con 0.3 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 10% metanol diluido en PBS incubando 30 min más. El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó con 10% de SFB diluido en PBS para incubar durante 30 min a temperatura ambiente. Se adicionaron los anticuerpos primarios de ratón anti-ZIKV y anti-CHIKV de Thermo Fisher Scientific ® diluidos en Buffer 5% de SFB, y se incubaron durante toda la noche a temperatura de refrigeración. Al día siguiente, se lavaron las monocapas y se adicionó anticuerpo secundario anti-ratón IgG acoplado a peroxidasa de BioRad y se incubó por 30 min. Se realizó un último lavado de las monocapas y se adicionó el sustrato TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina). Se realizó lectura de las absorbancias a 450 nm y 620 nm en el lector de ELISA Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific). Posterior a la lectura, los datos fueron normalizados con la concentración de proteína total de cada pozo, que se determinó por ensayo de Bradford. Se realizaron dos experimentos independientes con 3 repeticiones para cada ensayo (n = 6).

#### 11.4. Análisis estadístico:

La normalidad de los datos se determinó usando la prueba Shapiro Wilk. Las diferencias estadísticamente significativas se identificaron usando una prueba paramétrica *t*-Student (datos con distribución normal) o la prueba no paramétrica U de Mann Whitney (datos con distribución no normal), considerando para todos los casos diferencias estadísticamente significativas con un valor p menor a 0.05 (p<0.05).

## 12. ESTRATEGIAS PARA LAS EVALUACIONES IN SILICO

### 12.1. Selección de la proteína diana

De cada agente viral se descargaron estructuras tridimensionales en la base de datos Protein Data Bank (PDB) de una proteína estructural y una no estructural cuya resolución fuera menor a 2.5 Å.

- **Proteína estructural:** para DENV se seleccionó el dominio III de la envoltura que pertenece al serotipo 2 bajo el código PDB 3UZV [213]. Para ZIKV, el dominio II de dimerización de envoltura con el código PDB 5JHM de la cepa asiática de linaje SZ01 de ZIKV [214]. En el caso de CHIKV se seleccionó la glicoproteína de envoltura E2 codificada en PDB como 3N44 [215]
- **Proteína no estructural:** Se seleccionó el dominio catalítico de la polimerasa de DENV-3 con el código PDB 2J7U ya que este dominio polimerasa es uno de los más conservados e importantes en el proceso de replicación del genoma viral [27] y de la polimerasa de ZIKV de la cepa MR/766 con el código PDB 5U04 [216]. Para CHIKV se seleccionó el dominio hidrolasa de la NSP2 de la cepa africana S27 con el código PDB 3TKR [217].

Las estructuras se prepararon con el software Python Molecular Viewer (PMV). Se eliminaron las moléculas de agua del sistema, se agregaron los hidrógenos polares (para favorecer posibles puentes de hidrógeno) y calcular las cargas Gasteiger-Marsili y minimizar de esta manera la energía del sistema. La estructura minimizada se guardó como un archivo PDBQT para los experimentos de acoplamiento molecular.

### 12.2. Selección del ligando

Se accedió a la base de datos de PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) para obtener las estructuras correspondientes a los tres alcaloides indólicos. Voacangina con el código 10361692, la voacangina-OH con el código 328232 y Rupicolina con el código 101593056. Se le otorgó flexibilidad al

ligando con la herramienta PMV que determina las torsiones del ligando. El archivo se guardó como PDBQT para los experimentos de acoplamiento.

### 12.3. Acoplamiento molecular

Para estudiar las interacciones de las proteínas dianas con los ligandos se utilizó el software AutoDock Vina ® [218]. Se determinó el mejor sitio de unión o punto caliente en la superficie de la proteína diana con la herramienta en línea PeptiMap (<https://peptimap.cluspro.org/>) (Tabla 1 y 2). Con base a los sitios predichos, se definió una caja con dimensiones X-Y-Z igual a 30 y una exhaustividad de 10. Se eligieron las mejores energías libres de unión en términos de Kcal/mol que cumplieran con el criterio de aceptación entre 0 y -16. Adicionalmente, se analizaron las interacciones intermoleculares (puentes de hidrógeno e interacciones hidrófobas) en los esquemas de dos dimensiones a partir del software LigPlot (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LIGPLOT/>).

### 12.4. Dinámica molecular

Para evaluar la estabilidad en el tiempo (10 ns) se eligió un complejo que tuviera efecto inhibitorio sobre la partícula viral infecciosa (virucida) y la mejor energía de unión en AutoDock Vina ® en la evaluación con la proteína de E. La dinámica molecular se realizó en una caja de agua usando el software NAMD [219] para lo cual se minimizó el complejo, se estableció las condiciones de borde de caja y se usó un ensamblaje NVT (número de partículas, el volumen y la constante T de 310K) Los resultados obtenidos incluyen evaluación de las trayectorias resultantes y gráfica de distancias durante el tiempo evaluado.

### 12.5. Secuenciación cepas de DENV-2

Se amplificó fragmentos de envoltura de ambas cepas, DENV-2/NG y DENV-2/16681, usando los cebadores reportados previamente [220] según las instrucciones del kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific). El ciclo usado fue de 53°C 30 min, 94°C 2 min, 40 ciclos (94°C 30 s, 50°C 45 s, 68°C 2 min) y 68°C 5 min. Se envía cDNA obtenido a MacroGen Inc. (Seoul, Korea) para secuenciación por el método de Sanger. Las secuencias obtenidas fueron ensambladas y editadas usando el software MEGA X y se subieron en la plataforma Dengue Virus Typing Tool, la cual está diseñada para realizar BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) e identificar las cepas de DENV-2 a partir de la secuencia de nucleótidos. Usando otras dos cepas de referencia obtenidas de la base de datos de nucleótidos de NCBI, las secuencias se alinearon en MEGA y por el método de Clustal W y se obtuvieron 1308 nucleótidos que corresponden 435 aminoácidos de las cepas a identificar y las cepas de referencia.

## 13. RESULTADOS

### 13.1. Viabilidad celular.

La Voacangina arrojó una viabilidad de 77,5 % en células VERO a concentraciones inferiores del 17,1 µM, la cual decreció a 34,9% a la máxima concentración evaluada de 271,4 µM, siendo la concentración 33,9 µM estadísticamente significativa frente al control de células no tratado (valor  $p < 0.05$ ). La viabilidad que se obtuvo con la Voacangina-OH fue superior a 82,3% en concentraciones iguales o menor a 16,4 µM y de 35,2% en la concentración más alta usada para el ensayo de 260,1 µM. Las células VERO tuvieron una viabilidad del 92,4% en presencia de 16,4 µM de Rupicolina, la cual disminuyó hasta el 40,6% a la concentración de 260,1 µM. Para los dos últimos alcaloides la concentración 32,5 µM fue estadísticamente significativa frente al control de células no tratado (valor  $p < 0.05$ ) (Figura 3).

Se eligieron las concentraciones de trabajo cuya viabilidad fuera cercana o superior al 80% sobre células VERO y que no representara diferencias estadísticas frente al control no tratado; para el caso de la

Voacangina se eligió por 17,1  $\mu\text{M}$  y para Voacangina-OH y Rupicolina de 16,4  $\mu\text{M}$ . Debido a la limitante en la cantidad de compuesto, solo fue posible evaluar las concentraciones de uso elegidas sobre células U937 y A549, las cuales tuvieron viabilidades superiores del 80% en todos los casos (datos no mostrados). Los controles positivos de inhibición (Suramina, Heparina y Ribavirina) y los solventes no fueron tóxicos (datos no mostrados).

### **13.2. Estrategia antiviral combinada**

Se determinaron porcentajes de infección de partículas virales infecciosas a partir de sobrenadantes obtenidos mediante la estrategia de tamizaje antiviral. En presencia de Voacangina se obtuvo porcentaje de infección para ZIKV/Col de 10,5%, para CHIKV/Col de 20,3%, para DENV-2/NG de 2,8% y para DENV-2/16681 de 3,8 (Figura 4). Las inhibiciones fueron estadísticamente significativas con un valor  $p < 0.05$

Por su parte, la Voacangina-OH fue capaz de disminuir mediante tamizaje las partículas infecciosas al presentar porcentajes de infección para ZIKV/Acol de 0%, para CHIKV/Acol de 7,6%, para DENV-2/NG de 5,6% y para DENV-2/16681 de 11,5% con respecto a cultivos sin tratamiento, pero infectados con cada uno de los virus que representan el 100% de infección (Figura 4).

Finalmente, se obtuvieron porcentajes de infección de Rupicolina para ZIKV/Acol de 5,9%, para CHIKV/Acol de 9,5%, para DENV-2/NG de 2,8% y para DENV-2/16681 de 1,2% con respecto a cultivos sin tratamiento, pero infectados con cada uno de los virus que representan el 100% de infección (Figura 4). Las inhibiciones fueron estadísticamente significativas con un valor  $p < 0.05$

El control positivo de inhibición usado en la estrategia antiviral combinada fue Suramina, con la cual se obtuvieron porcentajes de infección de 0% para los virus evaluados (Figura 4).

### **13.3. Pre-tratamiento en células VERO**

Se obtuvo un porcentaje de infección por parte Voacangina para ZIKV/Col en un 13,8% y para CHIKV/Col en un 23,1% en un en etapas iniciales del ciclo replicativo. El porcentaje de infección para DENV-2/NG fue del 99,6% y para DENV-2/16681 fue del 134,5% (Figura 5).

Los porcentajes de infección obtenidos en presencia de Voacangina-OH para ZIKV/Col, CHIKV/Col y DENV-2/NG fueron de 10,9%, 8,2% y 16,4%, respectivamente. Contrario a lo anterior, en el caso de la cepa DEN-2/16681 se obtuvo un porcentaje de infección superior al 100% (157%)(Figura 5).

Se obtuvo un porcentaje de infección por parte de la Rupicolina para ZIKV/Col de 119%, para CHIKV/Col de 107,5% y para DENV-2/16681 de 115,9%. En el caso de DENV-2/NG hubo un porcentaje de infección del 29% (Figura 5).

El control positivo de inhibición Suramina disminuyó las partículas virales infecciosas de ZIKV/Col en un 90,6% y de CHIKV/Col en un 95%; el control de Heparina usado para DENV-2/NG y DENV-2/16681 inhibió en un 56% y 55%, respectivamente (Figura 5).

### **13.4. Pre-tratamiento en células U937**

Los compuestos con inhibición de la producción de partículas virales sobre células VERO estadísticamente significativa en Pre-tratamiento se evaluaron en U937 y A549 para saber si este efecto se mantiene sobre líneas celulares de origen humano.

En la línea celular U937, la Voacangina obtuvo porcentajes de infección para ZIKV/Col de 0%, mientras que la infección de CHIKV/Col fue de 83,7%. La Voacangina-OH arrojó porcentajes de infección para ZIKV/Col y CHIKV/Col en un 5,1% y 4,2% respectivamente. El mismo alcaloide no disminuyó las partículas virales infecciosas de DENV-2/NG para el cual hubo un porcentaje de infección del 108,5%.

No hubo disminución en la infección de DENV-2/NG por parte de la Rupicolina (84,3%) (Figura 6). Los controles positivos de inhibición Heparina tuvo porcentajes de infección para DENV-2/NG de un 7,2% y Suramina de un 27% y 51% para ZIKV/Col y CHIKV/Col respectivamente (Figura 6).

### **13.5. Pre-tratamiento en células A549**

En el caso de la línea celular A549 se determinó un porcentaje de infección de la Voacangina para ZIKV/Col en un 15,2%. Por otro lado, el mismo compuesto tuvo un porcentaje de infección para CHIKV/Col de 102,2%. La Voacangina-OH tuvo un porcentaje de infección para ZIKV/Col de un 1,8%, y de manera similar al compuesto anterior, no presentó inhibición significativa para CHIKV/Col ya que se obtuvo un porcentaje de infección de 95,8%. En el caso de DENV-2/NG se obtuvo un porcentaje de infección del 114,3 con la Voacangina-OH.

Por su parte la Rupicolina tuvo un porcentaje de infección de la cepa DENV-2 evaluada de un 40,1%. El control positivo de inhibición Suramina tuvo un porcentaje de infección para ZIKV/Col de 18,8%. Heparina tuvo porcentajes de infección para DENV-2/NG de 27,9% y para CHIKV/Col de 24,6% (Figura 7).

### **13.6. Trans-tratamiento en células VERO**

El alcaloide indólico Voacangina tuvo porcentajes de infección para ZIKV/Col de 115,2%, para CHIKV/Col de 82,6%, para DENV-2/16681 de 73,7%, mientras que tuvo un posible efecto virucida sobre DENV-2/NG al obtenerse un porcentaje de infección de 11,2%. La Voacangina-OH tuvo un porcentaje de infección para ZIKV/Col en un 7,6% sin embargo, no tuvo porcentajes de infección estadísticamente significativos para CHIKV/Col al infectar en un 112,3%, DENV-2/NG en un 80,3% y DENV-2/16681 en un 74% (Figura 8).

El control positivo de inhibición Suramina tuvo porcentajes de infección estadísticamente significativos de ZIKV/Col (4,6%), CHIKV/Col (25,4%), DENV-2/NG (28%) y DENV-2/16681 (8,4%) (Figura 8).

### **13.7. Post-tratamiento en células VERO**

En presencia de la Voacangina se obtuvo porcentaje de infección para ZIKV/Acol de 19,2%, el cual fue estadísticamente significativo frente a un control de células sin compuesto que representa el 100% de infección con un valor  $p < 0.05$ ; para CHIKV/Acol de un 94,8%, para DENV-2/NG de 111,1% y para DENV-2/16681 de 107,6% %. Al igual que con el alcaloide anterior, la Voacangina-OH tuvo porcentaje de infección para ZIKV/Acol un porcentaje de infección de 11,6% siendo estadísticamente significativo frente a un control de células sin compuesto que representa el 100% de infección con un valor  $p < 0.05$ ; para CHIKV/Acol de 98,2%, para DENV-2/NG de 113,8% y DENV-2/16681 de 93,4%. La Rupicolina tuvo porcentajes de infección para ZIKV/Acol de 82,6%, para CHIKV/Acol de 9% con el cual tuvo diferencias estadísticamente significativas frente a un control de células sin compuesto que representa el 100% de infección con un valor  $p < 0.05$ , para DENV-2/NG de 117,9% y DENV-2/16681 de 94,5%.

El control positivo de inhibición usado fue Ribavirina, la cual tuvo porcentajes de infección estadísticamente significativos para ZIKV/Acol (0%), CHIKV/Acol (0,5%), DENV-2/NG (31,3%) y DENV-2/16681 (16,5%) con un valor  $p < 0.05$  (Figura 9)

### **13.8. Post-tratamiento en células U937 y A549**

Se obtuvo un 0% de infección de ZIKV/Col al realizar el post-tratamiento en monocapas de U937 con Voacangina y Voacangina-OH. La Rupicolina no fue capaz de inhibir significativamente la infección de CHIKV/Col cuyo porcentaje fue de 88,9%. El control positivo de inhibición Ribavirina tuvo porcentajes de infección para ZIKV/Col y CHIKV/Col en un 27,2% y un 52,5% respectivamente (Figura 13).

En la línea células A549 el porcentaje de infección para ZIKV/Col fue del 0% por parte de la Voacangina

y la Voacangina-OH en monocapas post-tratadas. Por su parte, se obtuvo un porcentaje de infección para CHIKV/Col de un 63% por la Rupicolina. El control positivo de inhibición Ribavirina tuvo porcentajes de infección para ZIKV/Acol de un 38,4% y para CHIKV/Acol de 43% (Figura 11).

### 13.9. Copias genómicas en monocapas post-tratadas

Para saber si el efecto inhibitorio obtenido para ZIKV/Col con Voacangina (80,7 %) y Voacangina-OH (88,3 %), y de CHIKV/Col con Rupicolina (90,9 %) en la estrategia de post-tratamiento en células VERO está relacionada con el proceso de replicación del genoma viral, se procesaron las monocapas para determinar las copias genómicas intracelulares. Se obtuvo acumulación del número de copias genómicas de CHIKV/Col en un 234,0 % mediante el tratamiento con Rupicolina; mientras que para ZIKV/Col se obtuvieron porcentajes de infección del 115,9 % y 67,3 % cuando las células se post-trataron con la Voacangina y la Voacangina-OH, respectivamente. El control positivo de inhibición Ribavirina disminuyó las copias genómicas de CHIKV/Col (94,8 %) y ZIKV/Col (96 %) (Figura 12).

Se obtuvo en U937 un 3,2% y en A549 un 1,8% de copias genómicas de ZIKV/Col en presencia de Voacangina. El control positivo de inhibición Ribavirina tuvo 43,6% en U937 de copias genómicas y 16,1% en A549 con significancia estadística (Figura 13).

### 13.10. Proteína viral en monocapas post-tratadas

Se identificó la inhibición de la infección por ZIKV/Col en el ensayo de Post-tratamiento con dos de los alcaloides evaluados y en tres líneas celulares diferentes, por tanto, se determinó si la síntesis de proteína estaba siendo afectada. Se encontró que los porcentajes de infección relacionados con la síntesis de proteína fueron del 0% en células VERO y U937 para Voacangina y Voacangina-OH. En el caso de las células A549 se determinaron porcentajes de infección de 0% con Voacangina y 6,6% para Voacangina-OH. El porcentaje de infección en relación a la proteína de CHIKV/Col en presencia del alcaloide Rupicolina fue de 97,5% en VERO. En presencia de la Ribavirina se obtuvieron porcentajes de infección para ZIKV/Acol de 0% en VERO y U937 y 10% en A549; para CHIKV/Acol se obtuvieron porcentajes de infección de 24% en VERO (figura 14).

### 13.11. Resultados de las evaluaciones *In silico*

#### 13.11.1. Acoplamiento molecular proteína estructural.

Al predecir la interacción entre el dominio III de la proteína de envoltura de DENV (PDB: 3UZV) con los alcaloides indólicos se obtuvieron energías libres de unión entre -5.1 y -6.0 Kcal/mol. La Voacangina tuvo una energía de unión de -6.0 Kcal/mol con la presencia de dos puentes de hidrogeno (con Phe337) (Figura 15), la Voacangina-OH de -5.4 Kcal/mol con dos puentes de hidrogeno (Lys334 y Asn355) (Figura 15) y Rupicolina de -5.1 Kcal/mol con un puente de hidrogeno (Phe337) (Figura 15). Todos los puentes de hidrógeno tuvieron una distancia mayor a 3 Å (Tabla 1 y Figura 15). Las energías libres de unión entre el dominio II de la proteína de envoltura de ZIKV (PDB: 5JHM) fueron similares, siendo de -5.4 Kcal/mol para Voacangina con interacciones exclusivamente hidrofóbicas (Figura 16), de -5.5 Kcal/mol para Voacangina-OH con un puente de hidrogeno (Thr366) (Figura 16), y de -5.5 Kcal/mol para Rupicolina con la formación de un puente de hidrogeno (Lys373) (Figura 16). Tras el acoplamiento molecular de los compuestos con la proteína E2 de CHIKV (PDB: 3N44) se obtuvo energías de unión entre -6.6 y -6.9 Kcal/mol. La interacción con la Voacangina tuvo una energía libre de unión de -6.8 Kcal/mol con un puente de hidrogeno (Asn72), con la Voacangina-OH de -6.9 Kcal/mol con dos puentes de hidrogeno (Leu16 y His29), y la Rupicolina de -6.6 Kcal/mol con un puente de hidrogeno (His29) (Figura 17). El control seleccionado Suramina, se acopló con cada una de las proteínas estructurales virales mencionadas, y se obtuvo energías libres de unión de -7.8 Kcal/mol, -8.8 Kcal/mol y -8.0 Kcal/mol para

DENV, ZIKV y CHIKV, respectivamente (Tabla 1) (Figuras 15, 16 y 17).

### 13.11.2. Acoplamiento molecular proteína no estructural.

Para la evaluación *in silico* del posible acoplamiento molecular con proteínas no estructurales virales, se escogió para los flavivirus la NS5 y para el alfavirus NSP2, como fue descrito previamente. Las energías de unión obtenidas con las proteínas no estructurales en todos los casos fueron mayores a las obtenidas con las estructurales, oscilando entre -6.0 y -7.4 Kcal/mol. Para el caso de la proteína NS5 de DENV (PDB: 3TRK) las energías fueron de -7.4 Kcal/mol con Voacangina con la formación de tres puentes de hidrogeno (Asn609, His798 y Cys709), de -7 Kcal/mol y -7.4 Kcal/mol con Voacangina-OH y Rupicolina, respectivamente, ambas con la formación de un puente de hidrogeno con Arg729 (Figura 18). Para la polimerasa NS5 de ZIKV (PDB: 5U04) las energías de unión fueron de -6.4, -7.1 y -6.8 Kcal/mol, para Voacangina, Voacangina-OH y Rupicolina, respectivamente (Figura 19). En el caso de Voacangina no hubo formación de puentes de hidrógeno y solo interacciones hidrofóbicas, mientras Voacangina-OH y Rupicolina, tuvieron tres puentes de hidrogeno (Arg623, Gly320 y Asp665; y Ile797, Ser712 y Trp797; respectivamente). Para la NSP2 de CHIKV (PDB: 3TRK) las energías de unión estuvieron entre -6.0 y -7.0 Kcal/mol. El único compuesto con formación de puentes de hidrógeno fue la Voacangina-OH, con 4 puentes con los aminoácidos uno con Tyr1079, dos con Ser1048, y uno con Gln1241, la energía de unión obtenida fue de -6.7 Kcal/mol. Los otros dos compuestos, Voacangina y Rupicolina, tuvieron energías de unión de -7.0 y -6.0 Kcal/mol, respectivamente (Figura 20) (Tabla 2).

### 13.11.3. Dinámica molecular

Se realizó dinámica molecular entre el mejor complejo de interacción de DENV con la proteína de envoltura. El sistema fue de 945 moléculas aproximadamente y el análisis incluyó la distancia entre el ligando y la proteína diana durante el tiempo evaluado (10ns) la cual oscilo entre 1.5 Å y 2.5 Å. (1 Å). Para que el complejo se considere biológicamente posible, la distancia debe ser menor a 1.2 Å (Figura 19)

### 13.11. 4. Resultados secuenciación

Teniendo en cuenta los resultados diferenciales obtenidos para DENV-2/NG y DENV-2/16681 en las estrategias individuales, se secuenciaron las proteínas de envoltura de ambos virus. Se encontró un porcentaje de identidad del 99.69% con la cepa Nueva Guinea C (1944) (ID Genbank: AB609589), la cual pertenece al genotipo Asia II y del 99,93 % con la cepa DENV-2/16681 aislada en Tailandia (2007) (ID Genbank: NC001474) perteneciente al genotipo Asia I, ambas secuencias tuvieron una cobertura del 100%.

Luego del alineamiento de 1308 nucleótidos entre ambas cepas se identificaron 40 transiciones y 3 transversiones para un total de 43 cambios nucleotídicos. Para conocer la relevancia de estos cambios a nivel aminoacídico, se analizaron los 435 aminoácidos correspondientes a la secuencia nucleotídica y se identificaron dos cambios sinónimos (Thr120Arg y Ser478Thr) y cuatro cambios no sinónimos (Ser112Gly, Ile124Asn, Lys126Glu y Ala454Thr), tres de éstos ultimo cambios indican diferencias en la polaridad de los aminoácidos de la cepa DENV-2/NG a DENV-2/16681 y otro una diferencia en la carga de la cadena lateral. Cabe destacar que los cambios en la posición 112, 124, 126 y 454 fueron exclusivos de la cepa nuestra DENV-2/NG (Figura 15).

## 14. ANÁLISIS, DISCUSIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Según reportes del Instituto Nacional de Salud a la semana epidemiológica a semana epidemiológica 13 de 2020 se han notificado 118 casos de CHIKV, 105 casos de enfermedad por ZIKV y 1. 890 casos

probables de dengue [221], haciendo de estos arbovirus los más prevalentes del país y con mayor impacto en la Salud Pública [223]. Las estrategias implementadas hasta el momento para el control de estas arbovirosis han sido insuficientes [224], y hasta el momento solo puede ser tratada la sintomatología presentada tras la infección, pues no hay medicamentos antivirales con indicación específica para tratarlos [225] [226] [227]. En este sentido, en el presente trabajo fueron evaluados tres compuestos de tipo alcaloide con núcleo indol debido a su efecto biológico previamente reportado (Sección 1.7), por lo que la actividad antiviral *in vitro* de estos compuestos en los arbovirus DENV, ZIKV y CHIKV pudiera ser bastante prometedora. Se definió, que un compuesto tiene potencial antiviral, si disminuye la cuantificación de partículas virales infecciosas, el genoma viral o la síntesis de proteínas virales, a través de los resultados obtenidos en al menos, una de las estrategias experimentales usadas [163].

En este sentido, los compuestos de tipo indol, pueden imitar estructuras peptídicas, especialmente aquellas que contengan el aminoácido triptófano del cual deriva, y se pueden unir de forma reversible a ciertas enzimas [228], en el presente trabajo se evaluaron tres alcaloides indólicos y para los diferentes ensayos antivirales fue utilizada una única concentración no citotóxica de cada compuesto (figura 3), siendo este aspecto un limitante metodológico en trabajos de bio-prospección donde la disponibilidad del material vegetal y por ende de los compuestos derivados es poca [229]. Ha sido descrito previamente que a concentraciones menores de 50µM, alcaloides indólicos no generan una citotoxicidad significativa en una línea celular de fibroblastos de primates no humanos [148], lo cual es concordante con los resultados obtenidos en células VERO, a las concentraciones de uso seleccionadas (Figura 3). Así mismo, se ha descrito que tampoco generan citotoxicidad en líneas celulares humanas [142, 148], similar a lo obtenido en U937 y A549 (Datos no mostrados). Por otra parte, a concentraciones mayores, se ha descrito citotoxicidad, al igual que lo evidenciado en este estudio (Figura 3), tanto así que, compuestos con núcleo indol han sido utilizados en la terapia antineoplásica [230].

La primera estrategia utilizada para la evaluación antiviral fue estrategia combinada, el cual se realizó con cada compuesto individual para uno de los cuatro virus evaluados, en la cual todos los alcaloides indólicos evaluados tuvieron inhibiciones significativas (Figura 4). Se ha descrito previamente que un mismo compuesto como la atovacuona [231], un derivado de quinolonas [232], y las cumarinas A y B [102] pueden tener tanto actividad antiviral para un flavivirus y como para un alfavivirus, lo cual es biológicamente relevante debido a que, DENV, ZIKV y CHIKV son transmitidos por el mismo vector [233], se ha reportado su co-circulación en las mismas áreas [210] y presentan sintomatología similar al momento de la consulta [234]. Si bien el tamizaje antiviral es una estrategia que indica si el compuesto tiene un efecto inhibitorio de manera general, no contribuye al esclarecimiento de un posible mecanismo antiviral y tampoco es útil en un contexto clínico en el cual lo mayoría de los pacientes consultan cuando ya se encuentran enfermos.

De acuerdo con lo anterior para dilucidar el posible mecanismo de acción antiviral fueron evaluadas las estrategias de tratamiento *in vitro* (pre, trans y post) de manera individual con todos los compuestos, contra todos los virus en células VERO; los compuestos con inhibición significativa en pre y post-tratamiento fueron evaluadas en células humanas (U937 y A549) (Figura 1).

En relación con los resultados obtenidos con DENV-2/16681, a pesar de obtener actividad en la estrategia antiviral combinada, ningún alcaloide inhibió de manera significativa en las estrategias individuales evaluadas (Figura 5, 8 y 9), sugiriendo que para esta cepa el efecto antiviral se debe a la presencia constante de los compuestos. Esto puede relacionarse con los resultados obtenidos con otro compuesto derivado del triptófano, la melatonina, contra DENV2/16681, donde al evaluar solo en Pre y Post-tratamiento, es decir, sin presencia durante la infección, tampoco se evidenció actividad antiviral [235].

Luego, para la cepa DENV-2/NG, además del tamizaje, se obtuvo actividad antiviral en pre-tratamiento con dos de los compuestos en células VERO (Voacangina-OH y Rupicolina, figura 5), dicha actividad solo se mantuvo con la Rupicolina en la línea celular humana de fibroblastos (Figura 7), más no en la de monocitos (Figura 6). Esta actividad anti-flavivirus dependiente de línea celular ha sido descrita para el compuesto indólico Isatina sobre la infección por West Nile Virus (WNV) [236]. Ahora bien, al evaluar la Voacangina, no hubo actividad pre-tratamiento como con sus análogos estructurales, pero sí se evidenció efecto virucida (Figura 8).

En un modelo de infección con el virus Coriomeningitis linfocítica, un virus envuelto, se ha demostrado que una sola modificación en la secuencia de aminoácidos en la glicoproteína de envoltura puede provocar cambios en el establecimiento de la infección [237]. Tras la secuenciación de un fragmento del Gen E de DENV-2 de ambas cepas utilizadas, se evidenció cambios no sinónimos (tabla 3), lo cual pueda explicar los diferentes efectos entre las cepas a pesar de los tratamientos con los mismos compuestos. Este tipo de cambios aminoacídicos en diferentes cepas de DENV-2 ha sido abordado previamente en evaluaciones *in silico*, donde se determinó que cambios en un solo aminoácido en la proteína de envoltura entre DENV-2/NG y DENV-2/16681 pudiera estar relacionado con la patogénesis [208], lo que cual es concordante con las diferencias en la asociación epidemiológica de los reportes de casos de infección por DENV-2/NG con Dengue [238], y DENV-2/16681 con Dengue grave [239]. Por tanto, estudios *in silico* a futuro, donde sean evaluados los cambios en estructura y funcionalidad de las cepas, podrían dilucidar el motivo de las diferencias en la respuesta antiviral.

Considerando todos estos resultados, y que DENV-2 puede usar la ruta endocítica no clásica independiente de clatrina y/o caveola como mecanismo de internalización en fibroblastos [240], se podría sugerir que, en los compuestos evaluados el posible mecanismo de acción antiviral contra DENV-2, se basa en la inhibición de etapas tempranas de la infección del virus, sea interactuando con componentes celulares (Figura 5 y 7), o con la glicoproteína viral de envoltura (Figura 8). La inhibición de la entrada viral por este tipo de compuestos con núcleo indol, como el arbidol, ha sido descrita previamente en VHC, demostrando la inhibición de la fusión de la membranas posterior a la internalización [241], lo que refuerza la hipótesis planteada. Estudios de proteómica han demostrado diferencias en la expresión de proteínas en células VERO [242] y en células de origen humano U937 [243] tras la infección con las cepas de DENV-2 evaluadas en el presente estudio. Estos cambios pueden modificar vías de señalización celular que pudieran estar relacionadas con el ciclo replicativo viral. Adicionalmente, Evans y colaboradores han descrito este tipo de compuestos como “andamios privilegiados” ya que tienen el potencial de tener diferentes mecanismos de acción al actuar como posibles ligandos y unirse a receptores celulares y modificar posiblemente vías de señalización intracelular ya sea de forma positiva o negativa [244].

Por otra parte, la melatonina, también derivada del triptófano al igual que los compuestos evaluados, ha demostrado reducir la permeabilidad vascular e inhibir la fuga plasmática [245]. Se ha demostrado que la lovastatina, puede tener diferentes mecanismos de control contra la infección por DENV-2, tanto antiviral *in vitro* [191], como inmunomoduladora *in vivo* [192]. Por lo cual estudios a futuro *in vivo* de estos compuestos podrían indicar posibles efectos benéficos frente a la inmunopatología por DENV. Por tanto, con los resultados obtenidos hasta el momento, el posible uso de estos compuestos podría plantearse únicamente como un tratamiento profiláctico, hasta las evaluaciones *in vivo* a futuro.

CHIKV es otro de los arbovirus de importancia en la salud pública en Colombia que ha sido evaluado en el presente estudio. Previamente se ha determinado el efecto de la Voacangina sobre CHIKV [102]. Este reporte previo, no encontró efecto inhibitorio de las partículas virales infecciosas de CHIKV/Acol cuando las células son expuestas al compuesto por 24 horas. Sin embargo, en el presente trabajo se encontró que la Voacangina y la Voacangina-OH, son capaces de disminuir significativamente la infección por CHIKV/Acol exclusivamente en pasos iniciales del ciclo replicativo (Figura 5), cuando las células son expuestas no por 24 horas, sino por 48 horas previas a la infección viral, lo que sugiere que el efecto

antiviral, al menos de la Voacangina es dependiente del tiempo de exposición. Dado que se ha descrito que el tiempo de pre-exposición de los fibroblastos a estímulos como citoquinas en un modelo de VSV es dependiente del tiempo [246], que en compuestos como la lovastatina con DENV-2 [191], el tiempo de recolección de los sobrenadantes para la cuantificación del título viral y evaluación de la actividad antiviral fue crucial, y que en los modelos de Virus de la estomatitis vesicular (VSV), la rivabirina [247] y en CHIKV, el favipiravir [248], disminuyeron los títulos virales mejor a las 48 horas que a las 24 horas, la realización de una curva de crecimiento viral en presencia y ausencia del compuesto a futuro podrán dilucidar el motivo de este cambio de actividad de CHIKV con Voacangina.

Los resultados anti-CHIKV exclusivos de la estrategia pre-tratamiento solo fueron obtenidos con Voacangina y Voacangina-OH, más no con Rupicolina (Figura 5). La presencia del anillo de 7 carbonos que está presente en la estructura de la Voacangina y la Voacangina-OH podrían actuar en este caso, como el farmacóforo responsable de la actividad antiviral, dado que la Rupicolina no posee este anillo (Figura 5). Ante los resultados descritos y también teniendo en cuenta que la infección de CHIKV depende de la presencia de receptores celulares que medien su internalización [99], se pudiera plantear como posible mecanismo de acción, la inhibición en el proceso de adherencia o fusión de membranas, lo que indicaría que los compuestos pueden actuar como antagonistas de un receptor celular y bloquear la interacción con la proteína E de CHIKV. Este es un mecanismo antiviral ya conocido que se ha desarrollado en el modelo viral de VIH con el uso de pequeñas moléculas, como BMS663068 [249] y Maraviroc [246] que ocupan una región específica dentro del bolsillo de unión del receptor celular, o como el caso de la enfuvirtida, péptido sintético que se une a gp41, inhibiendo la fusión de membranas [250]. Teniendo en cuenta lo anterior, se debe considerar que la expresión de proteínas de membrana puede ser diferente en cada tipo de célula [251], motivo por el cual puede que estos compuestos no replicaran su actividad antiviral en A549 (Figura 7), y solo Voacangina-OH en U937 (Figura 6), lo que hace que su actividad sea dependiente de línea celular y por tanto soportaría esta hipótesis. Evaluaciones metabolómicas y transcriptómicas comparativas entre las líneas celulares ante la infección por CHIKV, y los tratamientos evaluados podrán dilucidar mejor el motivo de estas diferencias.

En cuanto a la estrategia de post-tratamiento en CHIKV/Acol, el alcaloide indólico Voacangina fue probado previamente sin demostrar actividad antiviral [102], lo cual fue confirmado en el presente estudio. Por otro lado, el tercer alcaloide indólico de este estudio, la Rupicolina, fue capaz de reducir las partículas virales infecciosas de CHIKV/Acol en células VERO en pasos posteriores a la entrada viral (Figura 9), más no en las otras líneas celulares (Figuras 10 y 11). La dependencia de línea celular para la respuesta anti-CHIKV de compuestos como ribavirina y favipiravir, ha sido probada previamente [248], lo cual pudiera indicar modificaciones a nivel celular relacionadas con el ciclo replicativo del virus, más aun cuando se ha descrito que los arbovirus pueden manipular el metabolismo celular [252], el perfil de expresión de proteínas [253], y por tanto, los procesos celulares como por ejemplo apoptosis y autofagia para favorecer su replicación [254].

Ha sido identificada la importancia de múltiples vías de señalización que pueden afectar el estrés celular y la supervivencia como la vía de señalización de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) [255], las vías UPR [256] y por tanto la activación de procesos como la apoptosis [257] y la autofagia [258] ante la infección por CHIKV. Por ejemplo, se ha demostrado que CHIKV induce la fosforilación de p38 y JNK, y aunque aún no es claro el objetivo específico, se sabe que es importante para la infección de este virus [259]. En un estudio previo, se demostró que el alcaloide Berberina es capaz de reducir la activación de MAPK, usada por CHIKV para conferir un estado de supervivencia a las células y mantener un ciclo de infección productivo [175]. Podría plantearse que la presencia del alcaloide Rupicolina esté alterando vías de señalización que afecten los procesos celulares implicados en el ciclo replicativo viral. Dos de los procesos principales posteriores a la internalización de la partícula asociados a una infección productiva son la replicación del genoma y la traducción de proteínas virales [67, 100]. Células VERO infectadas por CHIKV/Acol y posteriormente tratadas con Rupicolina acumularon RNA viral (Figura 12) y

no inhibieron la producción de proteína viral E (Figura 14), por lo que se sugiere que el efecto de la Rupicolina se encuentra en pasos posteriores a la replicación del genoma viral y la traducción de proteínas virales, como el ensamblaje, maduración o liberación, más aun, cuando este tipo de mecanismos ha sido previamente reportado en otro modelo de arbovirus [191].

El último arbovirus evaluado en el presente estudio fue ZIKV/Acol, el cual, tras su emergencia en las Américas ha generado complicaciones graves a largo plazo, con un particular impacto en la salud pública de la región (sección 1.2 *Manifestaciones clínicas y patogénesis de ZIKV*).

Los tres alcaloides evaluados, inhibieron significativamente la infección por ZIKV/Acol en el tamizaje (Figura 4), sin embargo, la Rupicolina fue el único alcaloide que no tuvo actividad antiviral en las estrategias individuales (Figuras 5, 8 y 9), similar al resultado obtenido con este mismo compuesto contra otro de los flavivirus evaluados en el presente estudio, DENV-2/16681. En relación con los otros dos alcaloides, Voacangina y Voacangina-OH, demostraron una actividad antiviral independiente de la línea celular en la estrategia pre-tratamiento (Figura 5, 6 y 7), que fue también evidenciada en post-tratamiento (Figura 9, 10 y 11), tal como ha sido descrito en este virus con la cloroquina [260]. Así mismo, se ha demostrado que la actividad anti-ZIKV puede generarse tanto en pasos previos como posteriores a la infección viral con un mismo compuesto, como es el caso de la suramina [261].

Se ha descrito que la producción de partículas virales infecciosas de ZIKV depende en parte de procesos que toman lugar en el RE, como la replicación, la traducción de proteínas virales y el ensamblaje de la partícula [37] [262], por tanto, así como en CHIKV/Acol, fueron evaluadas las copias genómicas y la cuantificación de la proteína viral para tratar de dilucidar si alguno de estos dos aspectos se encontraban alterados.

La inhibición del ARN viral fue dependiente de línea celular. En las líneas celulares de origen humano, U937 y A549 (Figura 13), hubo inhibición del genoma, la cual no fue evidenciada en células VERO. Teniendo en cuenta que VERO es una línea celular que no produce INF-alfa, componente fundamental en la respuesta antiviral innata, podría ser este el motivo de la diferencia encontrada. El INF se produce en respuesta a la presencia e identificación de ARN viral dentro de la célula, a través de la activación de Genes Estimulados por INF (ISGs), como PKR, 2'-5' oligoadenilatosintetasas y RNasa L, entre otros [263], este último con actividad RNAasa podría degradar el ARN del virus [264]. Se ha demostrado que, compuestos tipo indol son capaces de activar el INF tipo I [265]. Ante estos planteamientos se sugiere que, uno de los posibles mecanismos de Voacangina y Voacangina-OH por los cuales se genera la inhibición del genoma viral en U937 y A549, se encuentre relacionado con la activación de las vías de INF. Estudios a futuro de modulación de la respuesta de INF por parte de estos compuestos podrían esclarecer la hipótesis.

Contrario a la cuantificación de genoma viral, en presencia de Voacangina y Voacangina-OH, la cuantificación de la proteína viral de ZIKV/Acol demostró inhibición significativa (Figura 14), además fue independiente de la línea celular. La inhibición en diferentes líneas celulares ha sido evidenciada en otro estudio en células infectadas con ZIKV y tratadas con cloroquina por la técnica de inmunofluorescencia [260]. Así mismo, el alcaloide Hemanthamina aislado de *Amaryllidaceae* es capaz de inhibir la síntesis de proteínas al interferir con la formación de enlaces peptídicos, demostrando que los compuestos con presencia de un indol pueden formar interacciones de apilamiento  $\pi$  con las bases de nucleótidos [266]. En este sentido, el alcaloide Omacetaxine mepesuccinate aislado de la planta *Cephalotaxus harringtonii* está aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) desde 2012 para el tratamiento de la leucemia mieloide crónicas [267] inhibiendo también la formación de enlaces peptídicos en el complejo de iniciación. La disminución de proteína viral obtenida en el presente trabajo podría indicar que procesos de traducción estarían alterados.

Adicional a la actividad antiviral en pre y pos-tratamiento de Voacangina-OH, también este compuesto

tuvo un posible efecto virucida para ZIKV/Acol (Figura 8), por lo que un tratamiento con esta molécula resulta prometedor dada su inhibición por múltiples mecanismos de acción.

Con la finalidad de contrastar los resultados *in vitro* mencionados, y en búsqueda de reforzar los mecanismos de acción discutidos, por último, se realizó la evaluación de la actividad *in silico* de los tres alcaloides indólicos del estudio con una proteína estructural y una no estructural de cada uno de los tres virus. El uso de herramientas bio-computacionales, como el acoplamiento molecular se ha convertido en un soporte cada vez más importante no solo para el descubrimiento de fármacos [268], sino también para modelar la interacción entre una molécula y una proteína a nivel atómico, permitiendo caracterizar el comportamiento en referencia a la posición y la orientación del ligando en el bolsillo de interacción y la evaluación de la afinidad de unión [269], dilucidando posibles mecanismos de acción.

La proteína estructural E es fundamental en la entrada de un virus a la célula anfitriona [270]. El dominio III de la proteína E de DENV es imprescindible en la interacción con receptores celulares como Heparán Sulfato [33], Laminina LAMR1 [31] y DC-SIGN [271], por lo cual fue la proteína seleccionada para el acoplamiento. En los resultados obtenidos, la Voacangina obtuvo la mejor energía libre de unión de los alcaloides evaluados (Tabla 1), lo cual pudiera correlacionarse con el posible efecto virucida de este compuesto encontrado en la estrategia trans-tratamiento contra DENV-2/NG (Figura 8). A pesar de la predicción de formación de puentes de hidrógeno en este complejo, para que la interacción sea biológicamente factible, se ha descrito que la distancia debe ser menor a 3Å [272], y en este caso, todas fueron mayores, por tanto, posiblemente las interacciones hidrofóbicas sean las más importantes en la estabilización de esta unión (Figura 15). La estabilidad en el tiempo de este complejo fue probada por dinámica molecular (Figura 21), reforzando aún más la hipótesis planteada de interacción del compuesto con el virus, ya que la oscilación del complejo no superó 1,2 Å [273]. Dentro de las interacciones estructuralmente relevantes modeladas *in silico*, se puede destacar las definidas con el aminoácido fenilalanina, el cual se ubica preferiblemente al interior del bolsillos hidrófobos de interacción de las proteínas por ser un aminoácido no polar, y que, al tener una cadena lateral aromática puede formar enlaces  $\pi$ - $\pi$  [274], mejorando la unión del compuesto.

Contrario a lo observado con la Voacangina, la Voacangina-OH y la Rupicolina, a pesar de tener energías de unión favorables con la proteína E de DENV, fueron mayores y no se obtuvo una posible correlación con su actividad *in vitro* (Figura 8). Por su parte, la glicoproteína de E2 de CHIKV es responsable de las interacciones con receptores celulares [94] y adicionalmente, debido a su papel como determinante antigénico mayor, ha sido propuesta como un candidato vacunal promisorio [275]. A pesar de obtener con esta proteína viral las mejores energías de unión, ninguno de los alcaloides tuvo actividad en trans-tratamiento (figura 8). Esto es relevante, dado que a pesar de la amplia utilización de las herramientas bio-computacionales en los tamizajes antivirales *in silico* [276], no siempre energías de unión favorables se correlacionarán con un posible efecto antiviral virucida.

En este orden de ideas, también fue evaluado el dominio II de la proteína E de ZIKV. Así como fue descrito en la interacción de la proteína E de DENV con Voacangina, la interacción más favorable fue ZIKV y Voacangina-OH, y también tuvo un posible efecto virucida *in vitro* (Tabla 1 y Figura 8). Contrario a lo descrito con DENV, el puente de hidrógeno formado entre ZIKV y Voacangina-OH tendría una distancia menor a 3Å, lo que aumenta la probabilidad de que la interacción sea biológicamente factible [272].

En ambos flavivirus evaluados, Rupicolina no tuvo actividad antiviral en trans-tratamiento. De los tres alcaloides como fue mencionado previamente, es el único que no tiene el anillo de 7 carbonos presente en la Voacangina y Voacangina-OH, lo que pudiera plantear la hipótesis de que, la posible actividad virucida de estos compuestos esté relacionado con dicha estructura, y que además, estaría relacionada explícitamente con la actividad anti-flavivirus, dado que se pudo correlacionar las energías de unión

obtenidas con la actividad anti-DENV y anti-ZIKV, más no con actividad anti-CHIKV en trans-tratamiento.

En cuanto a las proteínas no estructurales para los flavivirus se seleccionó el dominio polimerasa de NS5, y para el alfavirus, el dominio hidrolasa la proteína NSP2, fundamentales en el ciclo replicativo de cada virus [277]. A pesar de que las energías libres de unión fueron favorables para NS5 DENV, ninguno de los compuestos tuvo una actividad significativa en pasos posteriores a la entrada viral en ninguna de las cepas de DENV evaluadas.

En el caso de CHIKV, las mejores energías de unión obtenidas con los compuestos Voacangina y Voacangina-OH no se correlacionaron con la actividad *in vitro* en post-tratamiento, dado que la Rupicolina con la energía de unión mayor, fue el único alcaloide activo en esta estrategia (Tabla 2 y Figura 9). A pesar de esto no hubo inhibición de las copias genómicas, ni de la proteína viral de CHIKV, por lo cual otros posibles procesos pudieran ser afectados (Figura 12 y 14). Estudios *in silico* a futuro con otras proteínas podrán complementar el posible mecanismo de acción de la Rupicolina en etapas posteriores a la internalización de la partícula.

Finalmente, todos los resultados *in silico* obtenidos para la polimerasa NS5 de ZIKV fueron interacciones favorables. Contrario a lo evidenciado en CHIKV, con Voacangina y Voacangina-OH, hubo correlación entre la energía de unión obtenida y la actividad post-tratamiento, más no con la Rupicolina (Tabla 2 y figuras 9, 10 y 11). A pesar de esto, no se encontró una correlación funcional de esta evaluación *in silico*, pues no hubo disminución de copias genómicas en células VERO (Figura 12), pero si en otras líneas celulares (Figura 13). Al verificar la interacción *in silico* directa con el sitio activo del cristal de polimerasa, se pudo evidenciar que mientras el control de inhibición ribavirina tenía contacto directo con este sitio, los dos alcaloides no, (datos no mostrados). Estos resultados soportan la teoría previamente planteada en la cual uno de los posibles mecanismos anti-ZIKV de Voacangina y Voacangina-OH pueda relacionarse con procesos celulares. Por otra parte, la disminución de la proteína viral, pudiera relacionarse con la actividad de los compuestos tipo indol sobre otra de las proteínas virales, tal como la proteasa NS3, dado que en el modelo de HCV, la NS3 ha sido utilizada como un blanco terapéutico en la búsqueda de inhibidores de tipo indol por medio de simulaciones computacionales (acoplamiento molecular y modelación de farmacóforos) [278]. Por lo cual evaluaciones *in silico* con esta proteína viral y otras, pudiera ser fundamental para complementar el posible mecanismo de acción de los alcaloides Voacangina y Voacangina-OH contra ZIKV.

En conclusión, si bien las estrategias *in silico* son útiles para predecir interacciones entre proteínas y ligandos [279], se hace necesario estudios *in vitro* que acompañen estas observaciones y soporten las conclusiones en un contexto experimental, para hacer una correlación entre las estrategias y otorgar de este modo un significado biológico al posible mecanismo antiviral [280].

## 15. CONCLUSIÓN GENERAL

Los alcaloides indólicos evaluados en el presente estudio demostraron un potencial antiviral contra DENV-2/NG, DENV-2/16681, ZIKV y CHIKV al ser capaz de inhibir las partículas virales infecciosas mediante tamizaje antiviral. Voacangina inhibió pasos iniciales del ciclo replicativo CHIKV en la línea celular VERO, tuvo un posible efecto virucida frente a la cepa DENV-2/NG en la misma línea celular, además inhibió a ZIKV en las tres líneas celulares tanto en pasos previos como posteriores a la replicación viral. Voacangina-OH fue capaz de disminuir la infección por ZIKV en múltiples pasos del ciclo replicativo y ser independiente de la línea celular evaluada, mientras que el mismo alcaloide inhibió a CHIKV y DENV-2/NG en pre-tratamiento sobre VERO. Por su parte, Rupicolina fue capaz de inhibir en post-tratamiento a CHIKV en células VERO y a DENV-2/NG en etapas iniciales del ciclo replicativo en VERO y A549.

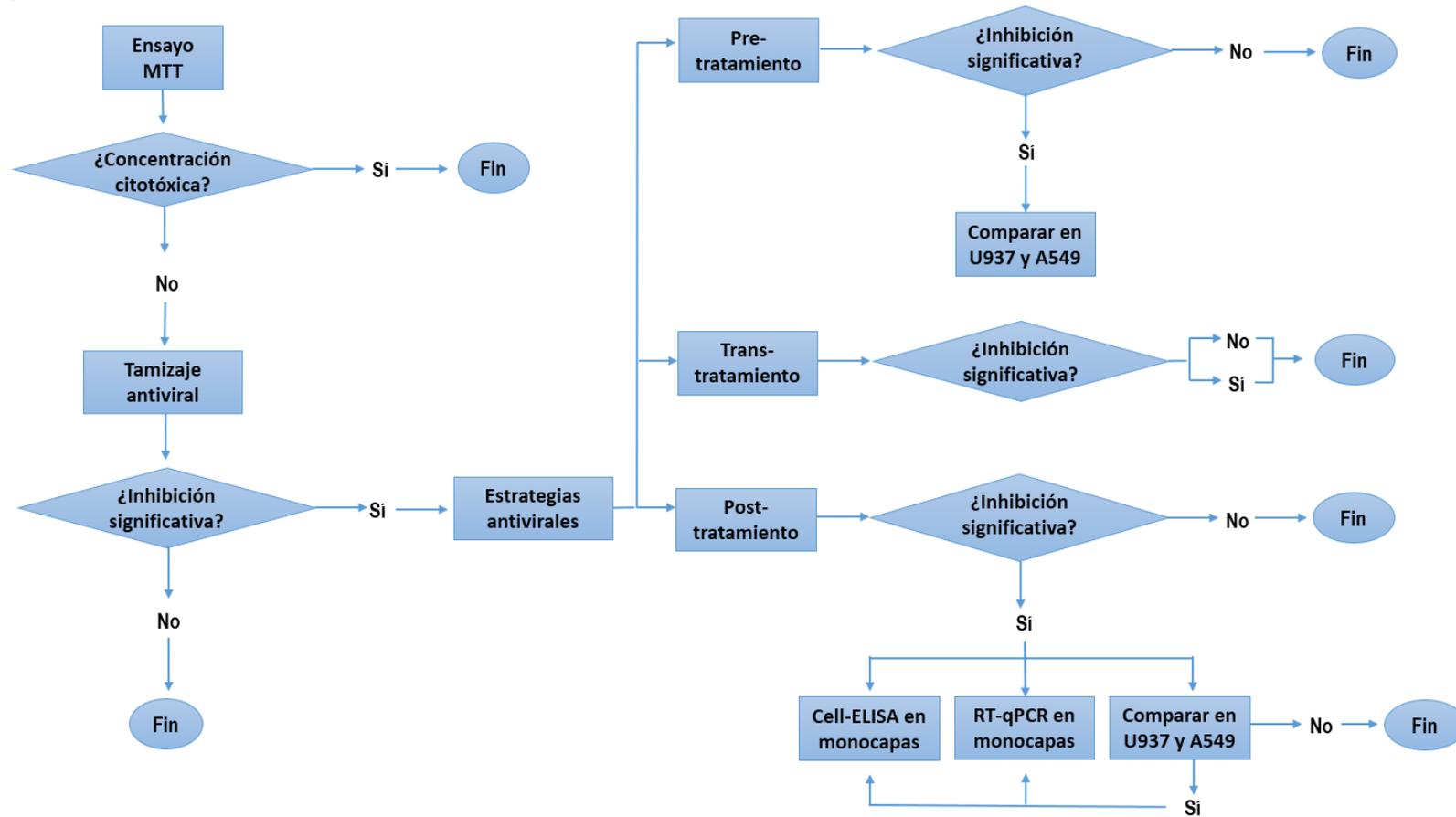
### Conclusiones específicas

- Se validó la hipótesis alterna al determinar el potencial antiviral de Voacangina, Voacangina-OH y Rupicolina mediante la estrategia antiviral combinada contra la infección de ZIKV, CHIKV y DENV.
- Se identificó como candidato antiviral a la Voacangina al inhibir pasos previos y posteriores de la replicación viral de ZIKV en diferentes líneas celulares, pasos previos a la replicación de CHIKV en VERO y al tener un posible efecto virucida sobre DENV.
- Se identificó a la Voacangina-OH como candidato antiviral al inhibir significativamente la infección por ZIKV en múltiples pasos del ciclo replicativo y en diferentes líneas celulares, a CHIKV en pasos previos en VERO y U937, y a DENV en pasos previo en VERO.
- Rupicolina inhibió significativamente la infección de DENV en Pre-tratamiento en VERO y A549, además de disminuir la infección de CHIKV en Post-tratamiento en VERO.
- Los diferentes controles positivos de inhibición tuvieron inhibiciones significativas en cada una de las estrategias antivirales que se estudiaron en el presente trabajo, validando a su vez los resultados obtenidos.
- Las estrategias *in silico* son útiles en el estudio de antivirales al identificar energías libres de unión favorables y predecir interacciones entre los ligandos y las proteínas blanco.

## 16. PERSPECTIVAS

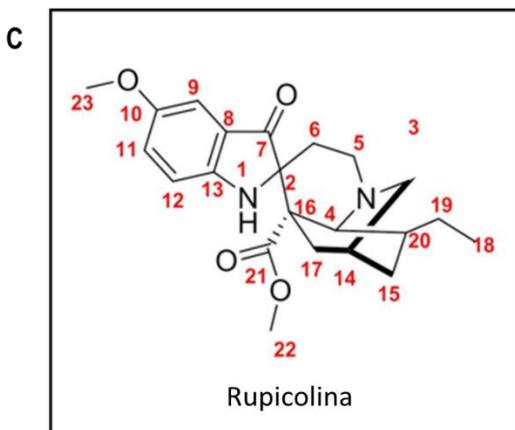
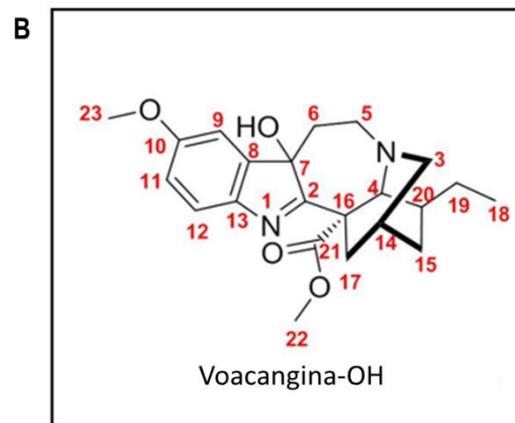
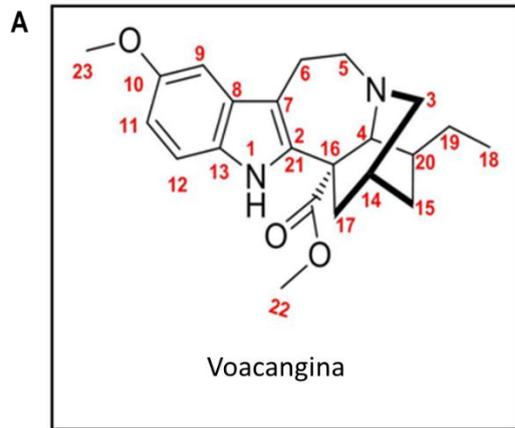
- Estudios en metabolómica que permitan dilucidar las posibles rutas metabólicas que se alteran en presencia de cada uno de los compuestos en condiciones de infección con los virus aquí evaluados.
- El uso de líneas celulares de origen neuronal como SH-SY5Y que pueda determinar el potencial antiviral *in vitro* de los alcaloides que presentaron resultados promisorios para la infección por ZIKV.
- Evaluar la concentración efectiva 50 y la concentración citotóxica 50 en varias líneas celulares y determinar de este modo el índice de selectividad.
- Realizar un tamizaje antiviral en las diferentes líneas celulares (U937 y A549)
- Evaluar *in silico* todas las proteínas virales de cada uno de los virus evaluados para poder correlacionar el posible mecanismo antiviral obtenido *in vitro*.
- Realizar ensayos *in vivo* para llevar a fases clínicas de las moléculas evaluadas como posible agente antiviral.

## 17. FIGURAS



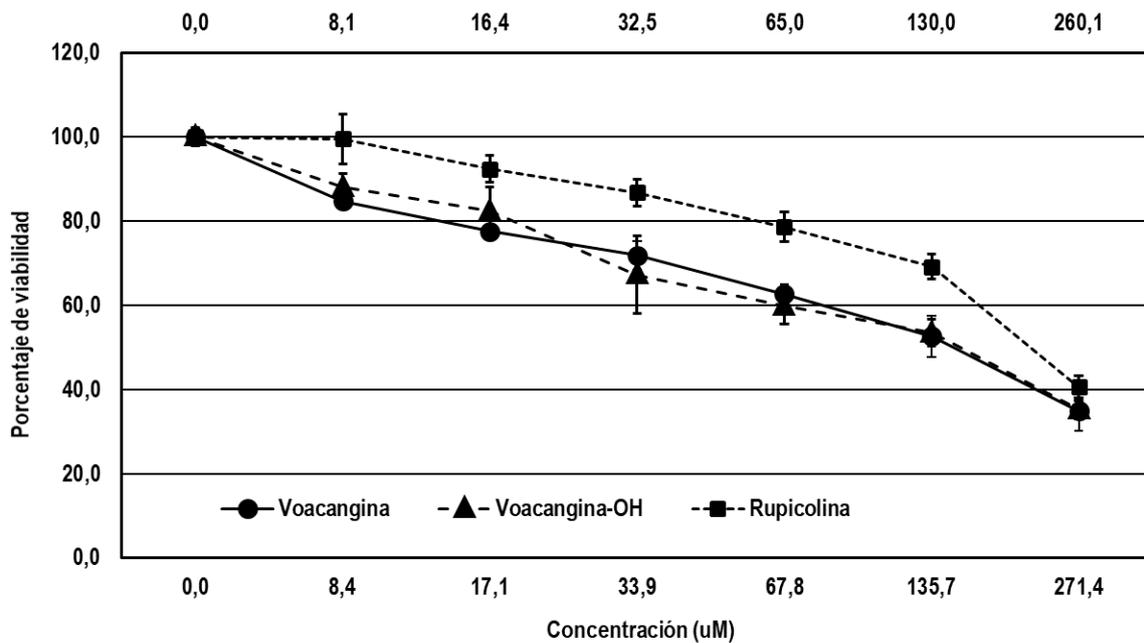
**Figura 1. Flujo grama metodológico.**

A partir de concentraciones no citotóxicas se realiza el tamizaje antiviral en células VERO y las inhibiciones significativas se evaluaron a través de las estrategias antivirales de Pre-tratamiento en células VERO, cuyos resultados de inhibiciones significativas se comparan con dos líneas de origen humano; Trans-tratamiento para determinar el posible efecto virucida; Post-tratamiento en células VERO, cuyos resultados de inhibiciones significativas se comparan con dos líneas de origen humano, además de determinar inhibiciones de copias genómicas o proteína viral.



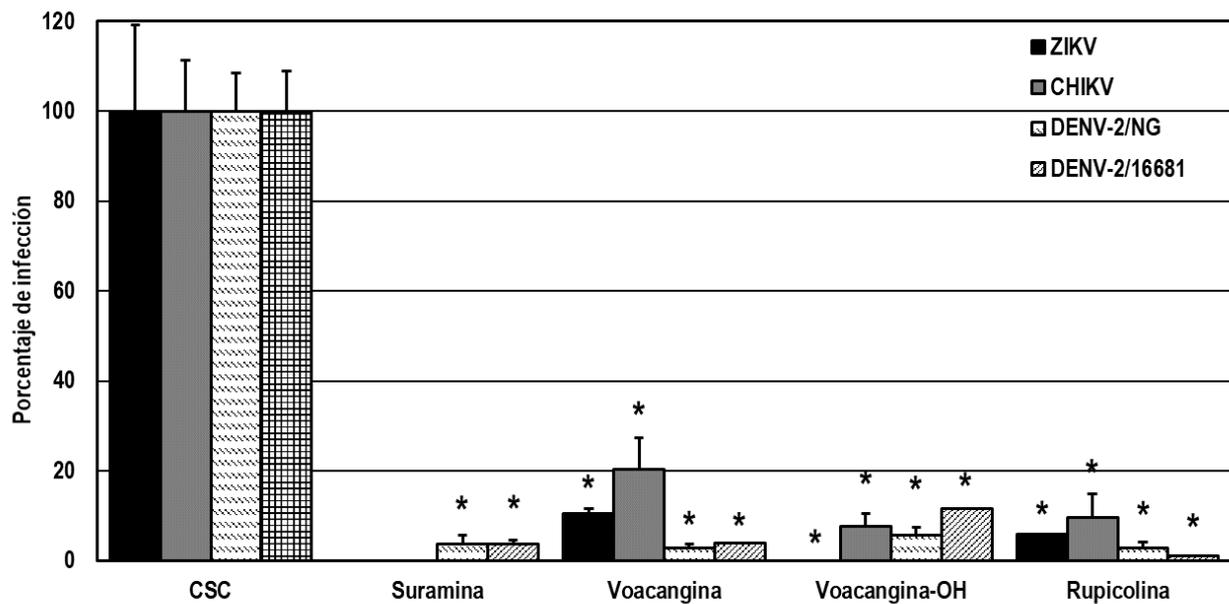
**Figura 2. Estructura química de los alcaloides indólicos.**

A. Estructura de Voacangina. B. Estructura de Voacangina Hidroxi-indolenina (Voacangina-OH). C. Estructura de Rupicolina



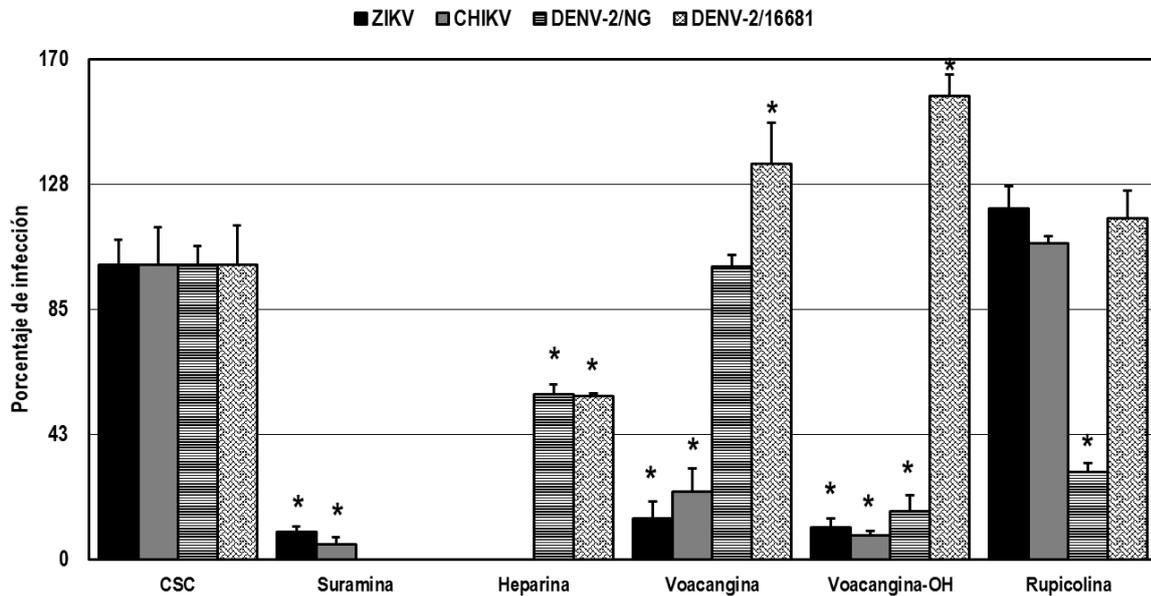
**Figura 3. Evaluación de la toxicidad en células VERO**

Se evalúan en concentraciones desde 8,4  $\mu\text{M}$  hasta 271,4  $\mu\text{M}$  para Voacangina y desde 8,1  $\mu\text{M}$  hasta 260,1  $\mu\text{M}$  para Voacangina-OH y Rupicolina. Se obtienen viabilidades dependientes de concentración en todos los casos.



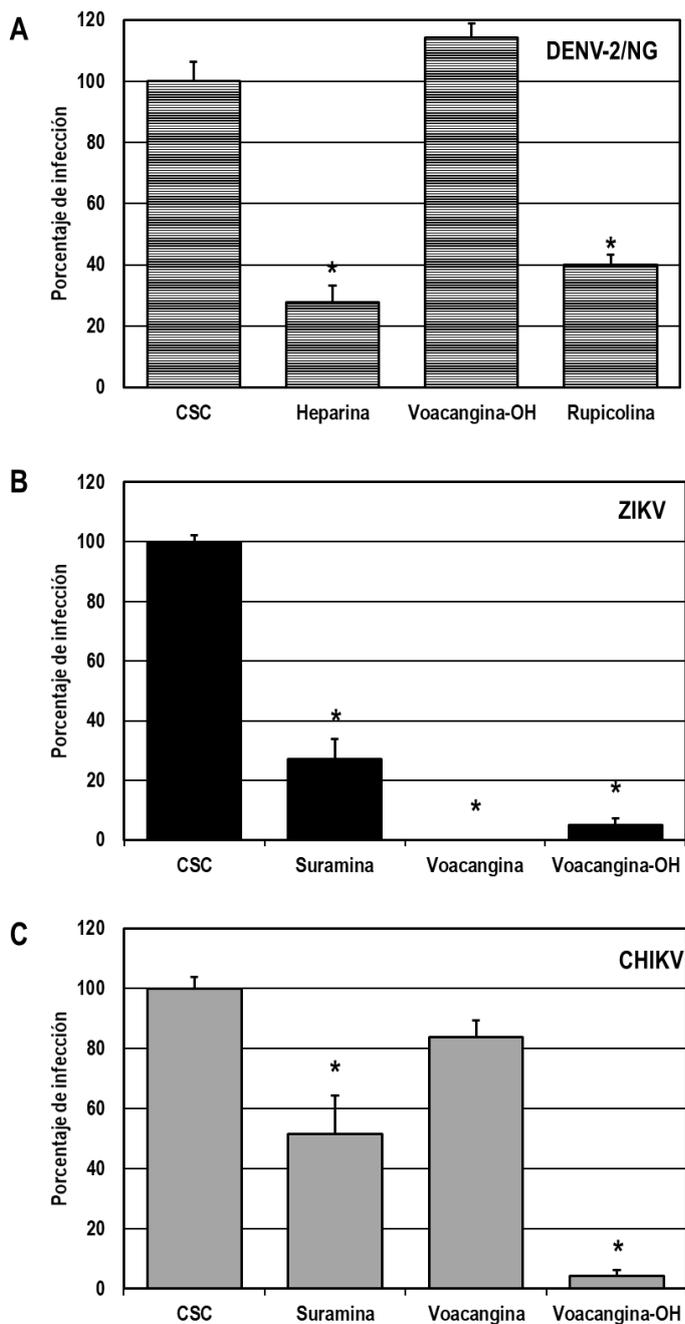
**Figura 4: Tamizaje antiviral de alcaloides indólicos.**

Inhibiciones significativas de ZIKV, CHIKV, DENV-2/NG y DENV-2/16681 en presencia de Voacangina, Voacangina-OH y Rupicolina a MOI 1 en células VERO respecto al control sin compuesto (CSC) ( $p < 0.05$ ;  $t$ -Student).



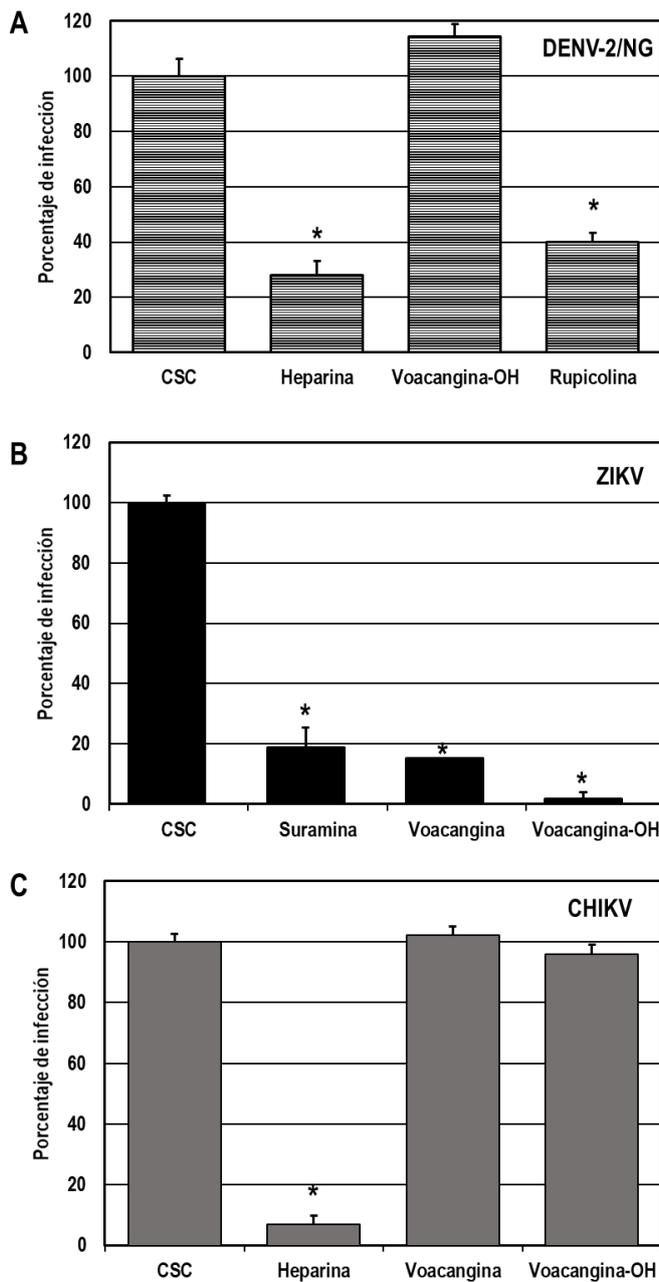
**Figura 5. Estrategia Pre-tratamiento en células VERO.**

Porcentajes de infección obtenidos por técnica de plaqueo a partir de sobrenadantes de células VERO Pre-tratadas con tres alcaloides indólicos para la infección por ZIKV, CHIKV, DENV-2/NG y DENV-2/1668 a MOI 1. La Suramina fue utilizada como control positivo de inhibición para ZIKV y CHIKV y la Heparina para las cepas de DENV-2. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin compuesto (CSC) ( $p < 0.05$ ; *t*-Student).



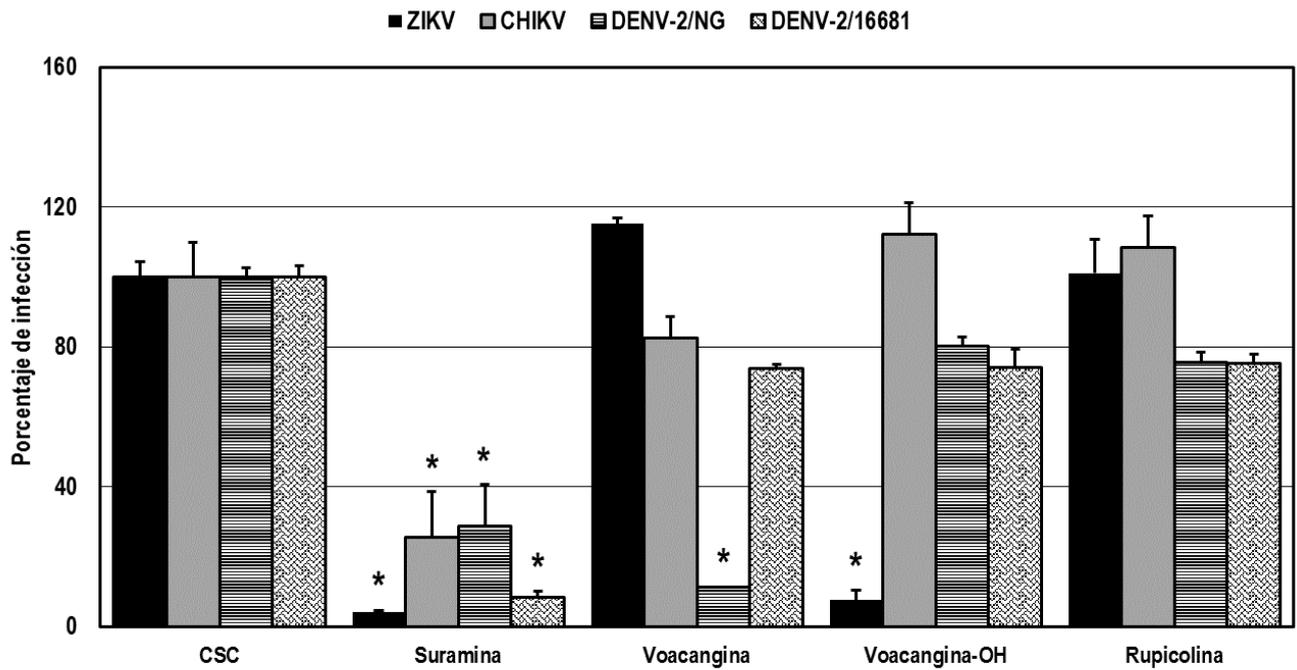
**Figura 6. Estrategia Pre-tratamiento en células U937.**

**A.** resultados de DENV-2/NG con porcentajes de infección por encima del 80% en U937. **B:** porcentajes de infección para ZIKV por parte de la Voacangina y Voacangina-OH en U937. **C:** porcentajes de infección de CHIKV en presencia de la Voacangina-OH en U937. Para el caso de DENV-2/NG el control positivo de inhibición fue Heparina y para ZIKV y CHIKV fue Suramina. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin compuesto (CSC) ( $p < 0.05$ ; *t*-Student).



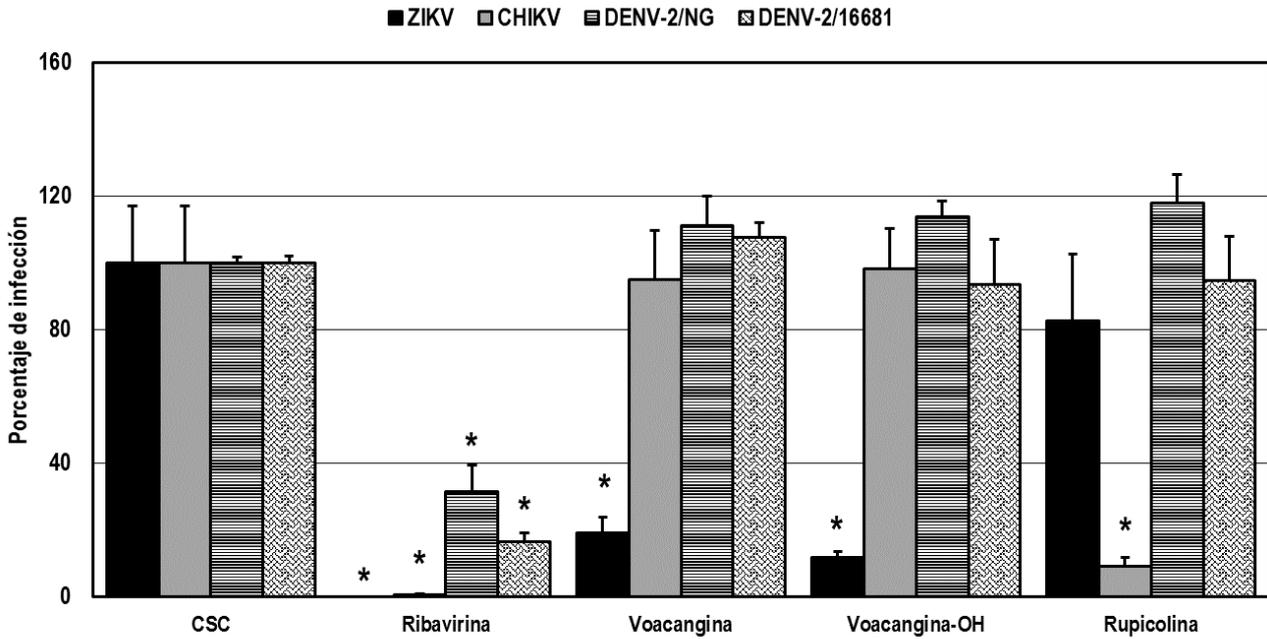
**Figura 7. Estrategia Pre-tratamiento en células A549.**

**A:** porcentaje de infección de DENV-2/NG en presencia de Voacangina-OH y Rupicolina en A549 **B:** porcentaje de infección de ZIKV en presencia de, la Voacangina y Voacangina-OH en A549 **C:** Porcentajes de infección de CHIKV en presencia de Voacangina y Voacangina-OH en A549. Para el caso de DENV-2/NG y CHIKV el control positivo de inhibición fue Heparina y para ZIKV fue Suramina. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin compuesto (CSC) ( $p < 0.05$ ; *t*-Student).



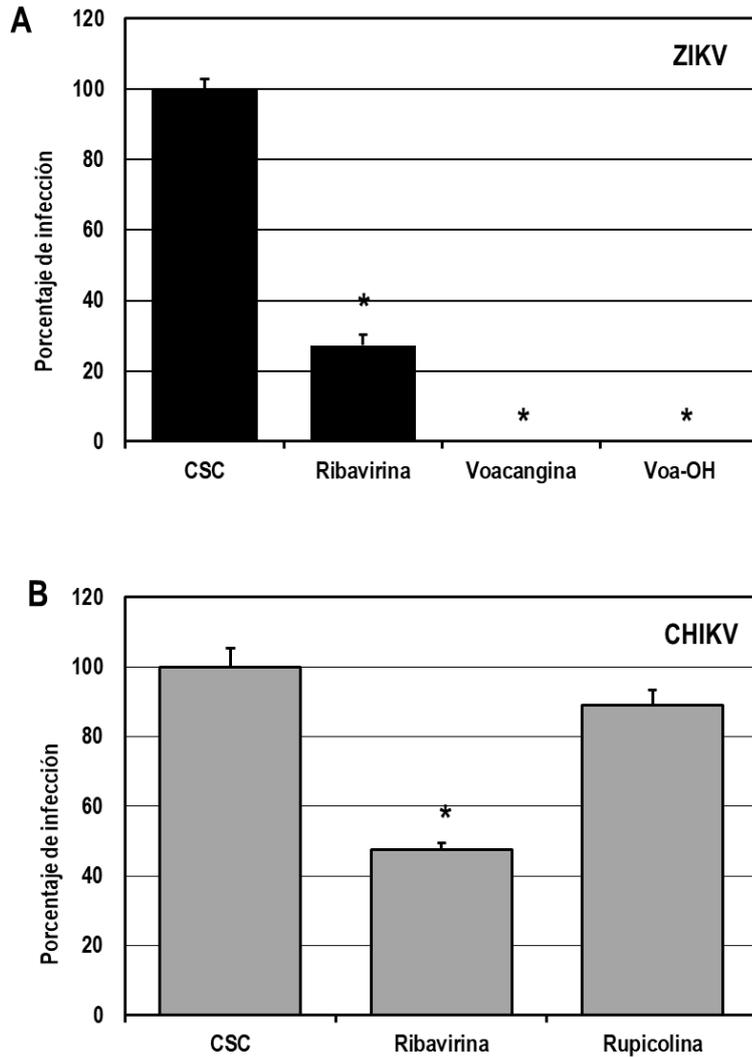
**Figura 8. Estrategia de Trans-tratamiento en células VERO.**

Porcentajes de infección obtenidos por técnica de plaqueo a partir de sobrenadantes de células VERO Trans-tratadas con cinco alcaloides indólicos para la infección por ZIKV, CHIKV, DENV-2/NG y DENV-2/1668 a MOI 1. La Suramina fue utilizada como control positivo de inhibición para los cuatro virus evaluados. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin compuesto (CSC) ( $p < 0.05$ ; *t*-Student).



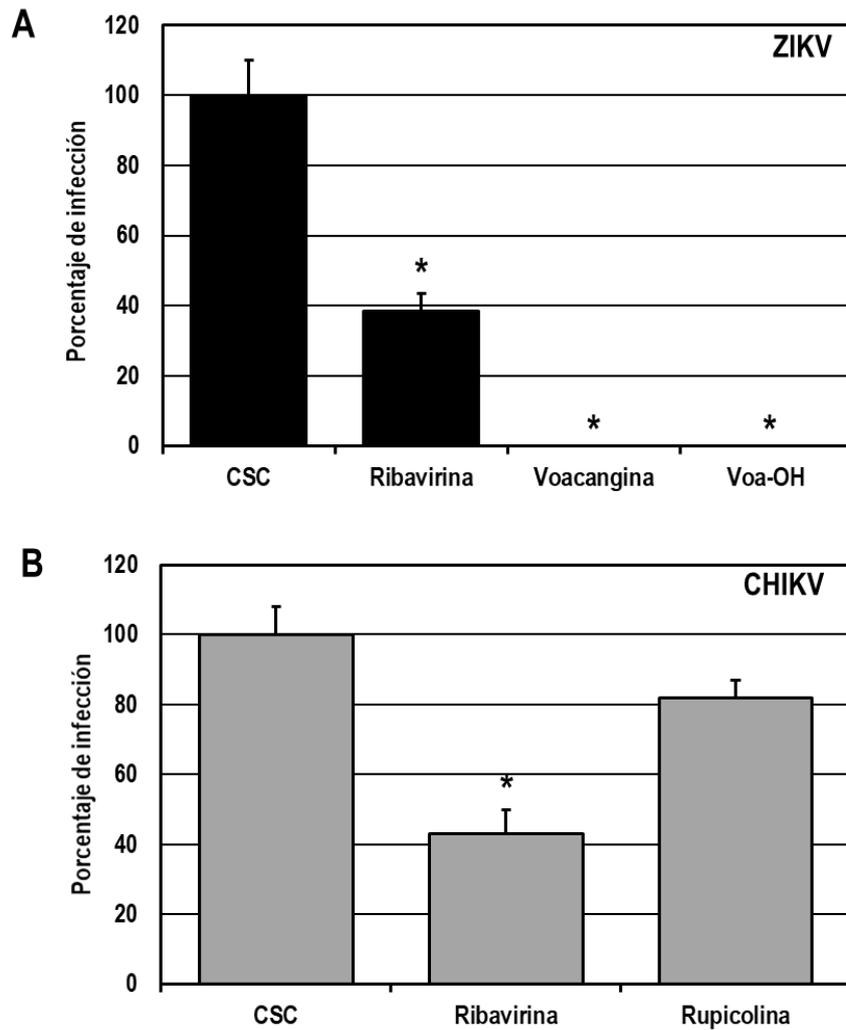
**Figura 9. Estrategia de Post-tratamiento en células VERO.**

Porcentajes de infección obtenidos por técnica de plaqueo a partir de sobrenadantes de células VERO Post-tratadas con cinco alcaloides indólicos para la infección por ZIKV, CHIKV, DENV-2/NG y DENV-2/1668 a MOI 1. La Ribavirina fue utilizada como control positivo de inhibición para los cuatro virus evaluados. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin compuesto (CSC) ( $p < 0.05$ ; *t*-Student).



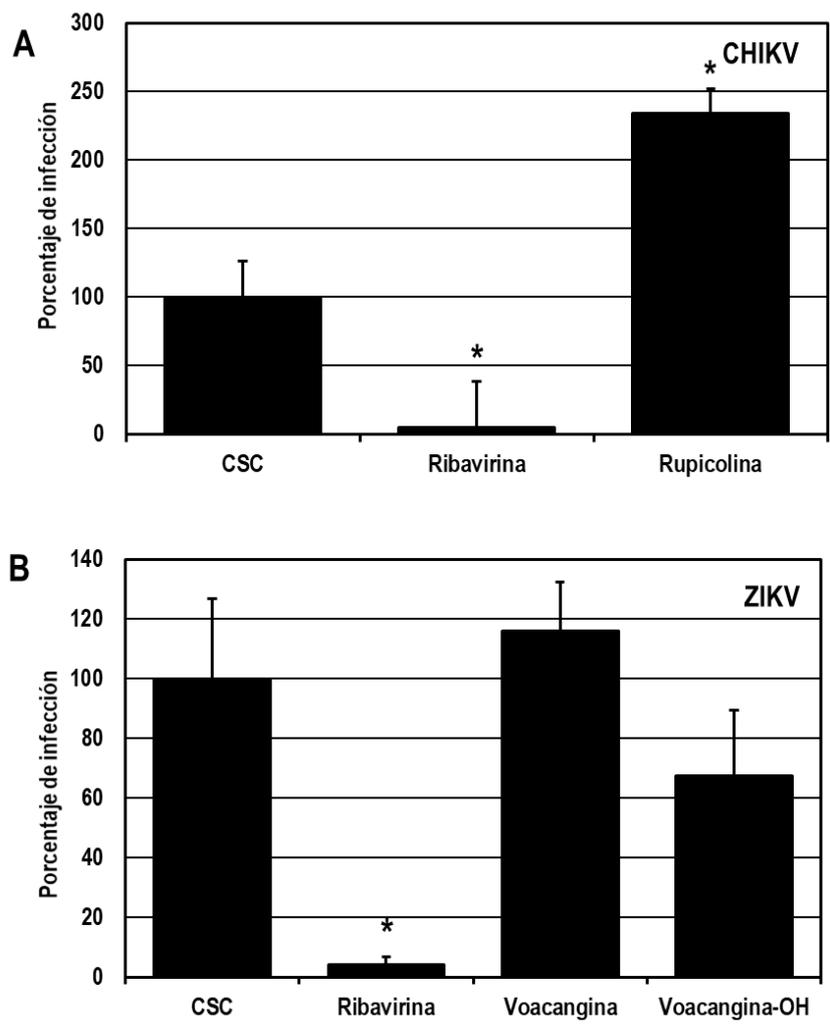
**Figura 10. Estrategia Post-tratamiento en células U937.**

**A:** porcentaje de infección de ZIKV por Voacangina y Voacangina-OH, **B:** porcentaje de infección de CHIKV por Rupicolina. En todos los casos el control positivo de inhibición fue la Ribavirina. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin compuesto (CSC) ( $p < 0.05$ ; *t*-Student).



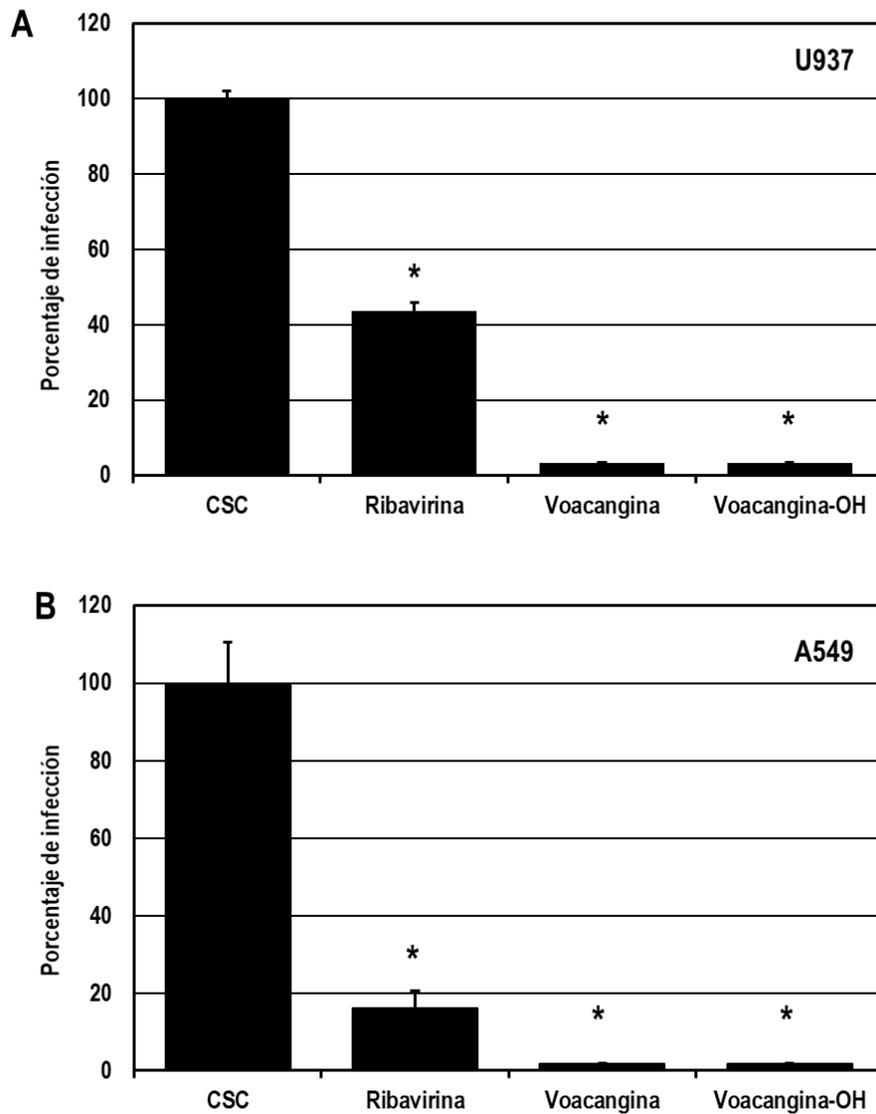
**Figura 11. Estrategia Post-tratamiento en células A549.**

**A:** porcentaje de infección de ZIKV en presencia de Voacangina y Voacangina-OH. **B:** porcentaje de infección de CHIKV en presencia de Rupicolina. En todos los casos el control positivo de inhibición fue la Ribavirina. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin compuesto (CSC) ( $p < 0.05$ ; *t*-Student).



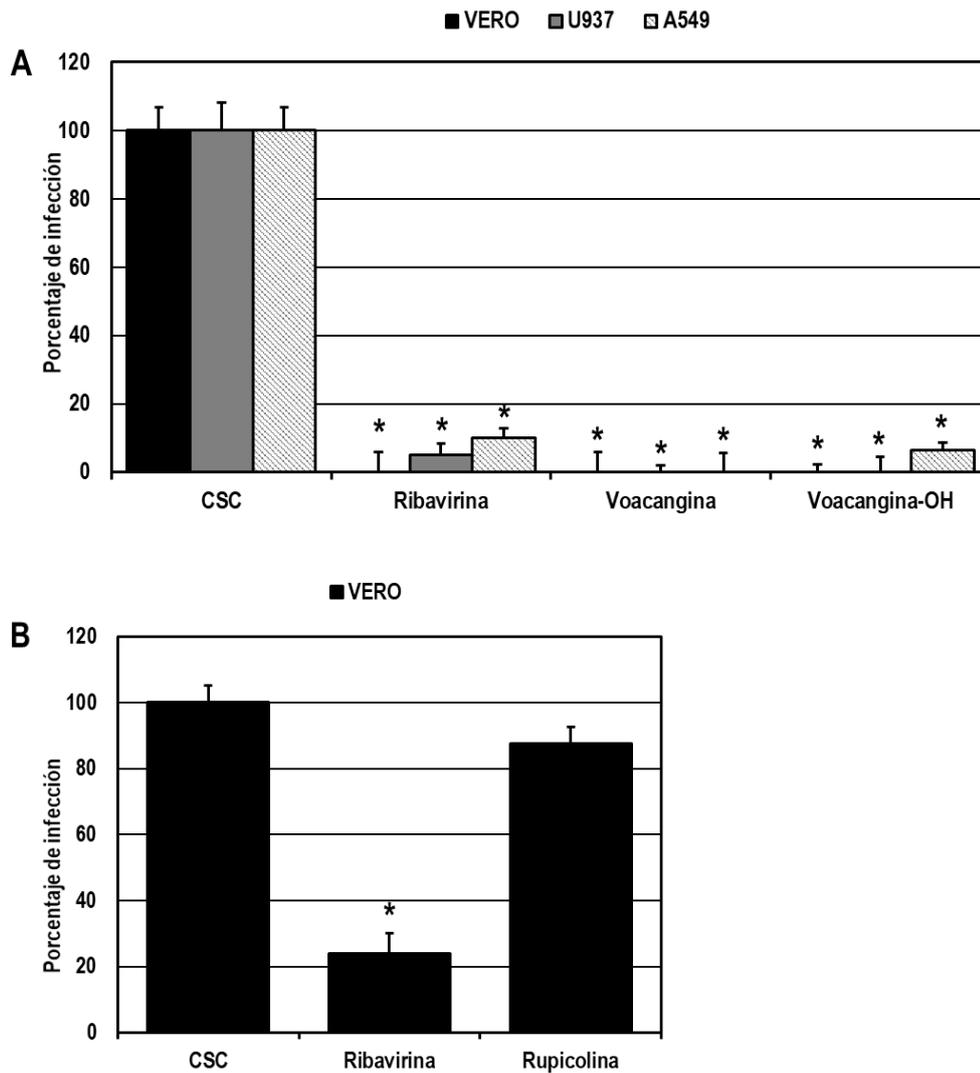
**Figura 12. Copias genómicas intracelulares en células VERO.**

**A:** acumulación del genoma viral de CHIKV en células VERO al ser post-tratadas con Rupicolina. **B:** Voacangina y Voacangina-OH no disminuyen de manera significativa el genoma viral de ZIKV en células VERO. En todos los casos el control positivo de inhibición fue la Ribavirina. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin compuesto (CSC) ( $p < 0.05$ ; *t*-Student).



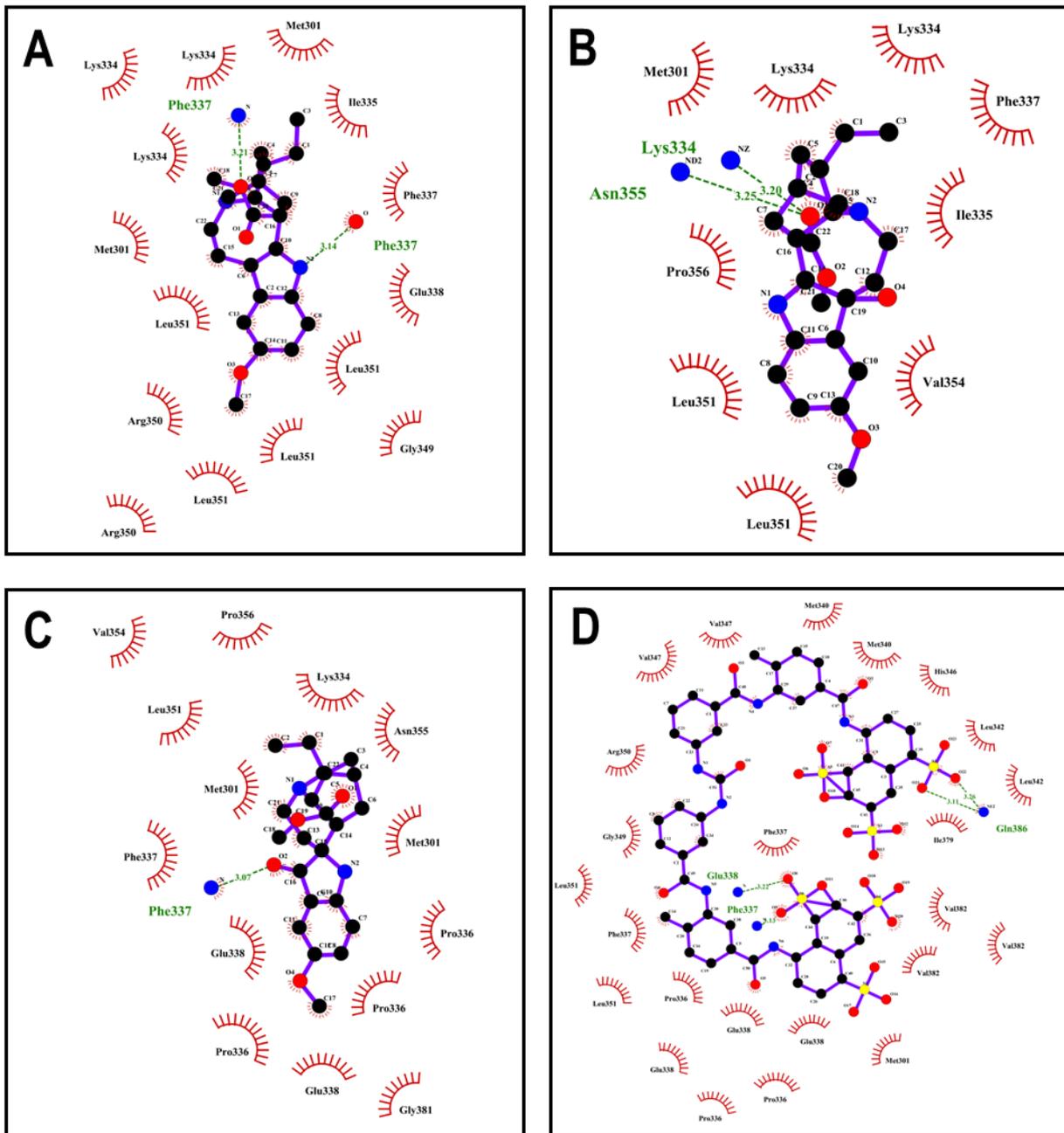
**Figura 13. Copias genómicas intracelulares de ZIKV en células U937 y A549.**

**A:** Disminución de copias genómicas en presencia de Voacangina y Voacangina-OH en células U937. **B:** reducción de copias genómicas en A549 en presencia de Voacangina y Voacangina-OH. En todos los casos el control positivo de inhibición fue la Ribavirina. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin compuesto (CSC) ( $p < 0.05$ ; *t*-Student).



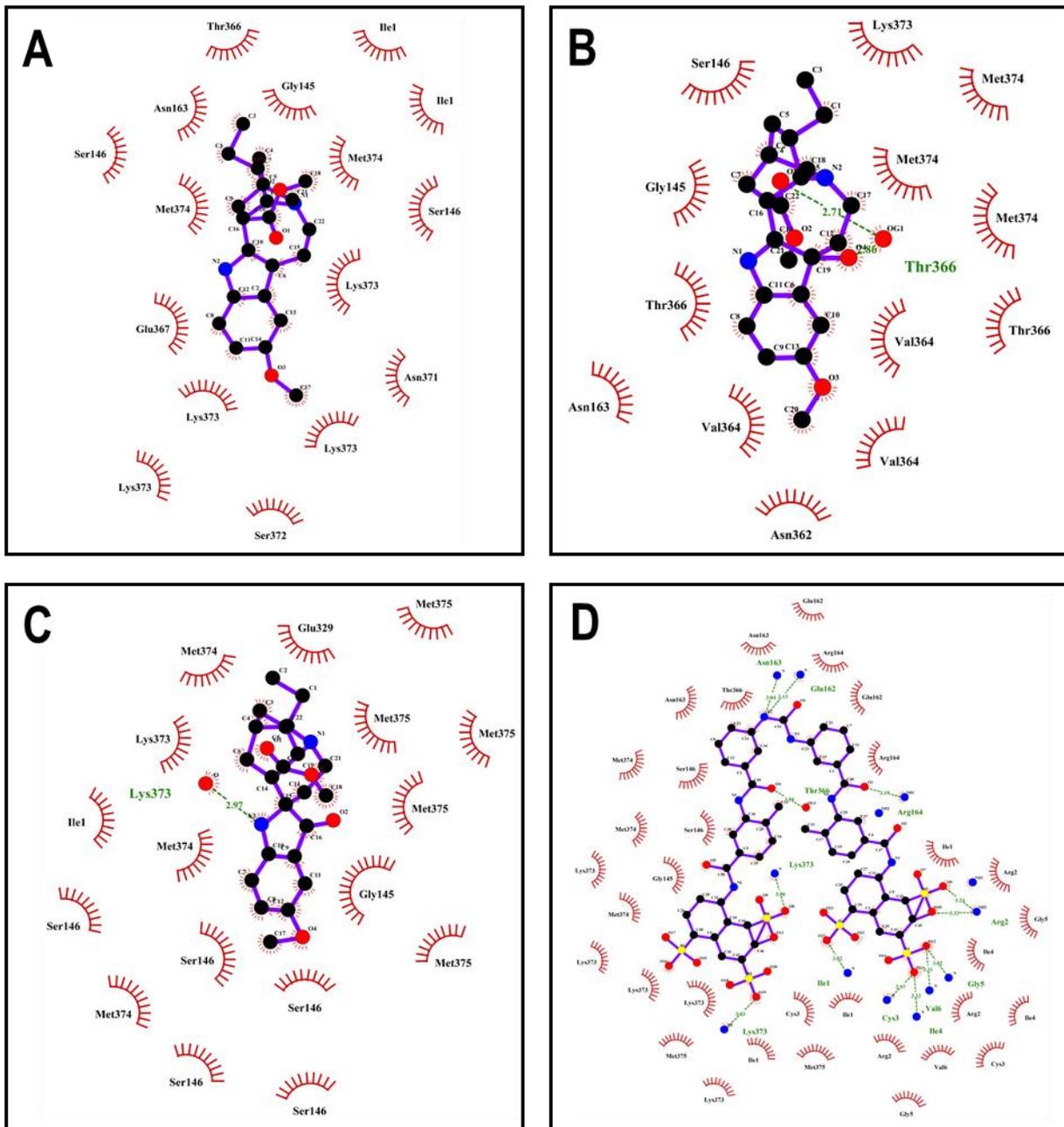
**Figura 14. Cell-ELISA en monocapas post-tratadas.**

**A.** porcentaje de infección de ZIKV en tres líneas celulares determinado por ensayo de Cell-ELISA en monocapas post-tratadas. Se obtuvo porcentajes de infección bajos y estadísticamente significativos frente a un control no tratado en VERO, U937 y A549. **B:** porcentaje de infección de CHIKV en dos líneas celulares determinado por ensayo de Cell-ELISA en monocapas post-tratadas. No se obtuvieron diferencias significativas frente a un control no tratado en VERO, y A549. En todos los casos Ribavirina fue usado como control positivo de inhibición ( $p < 0.05$ ;  $t$ -Student).



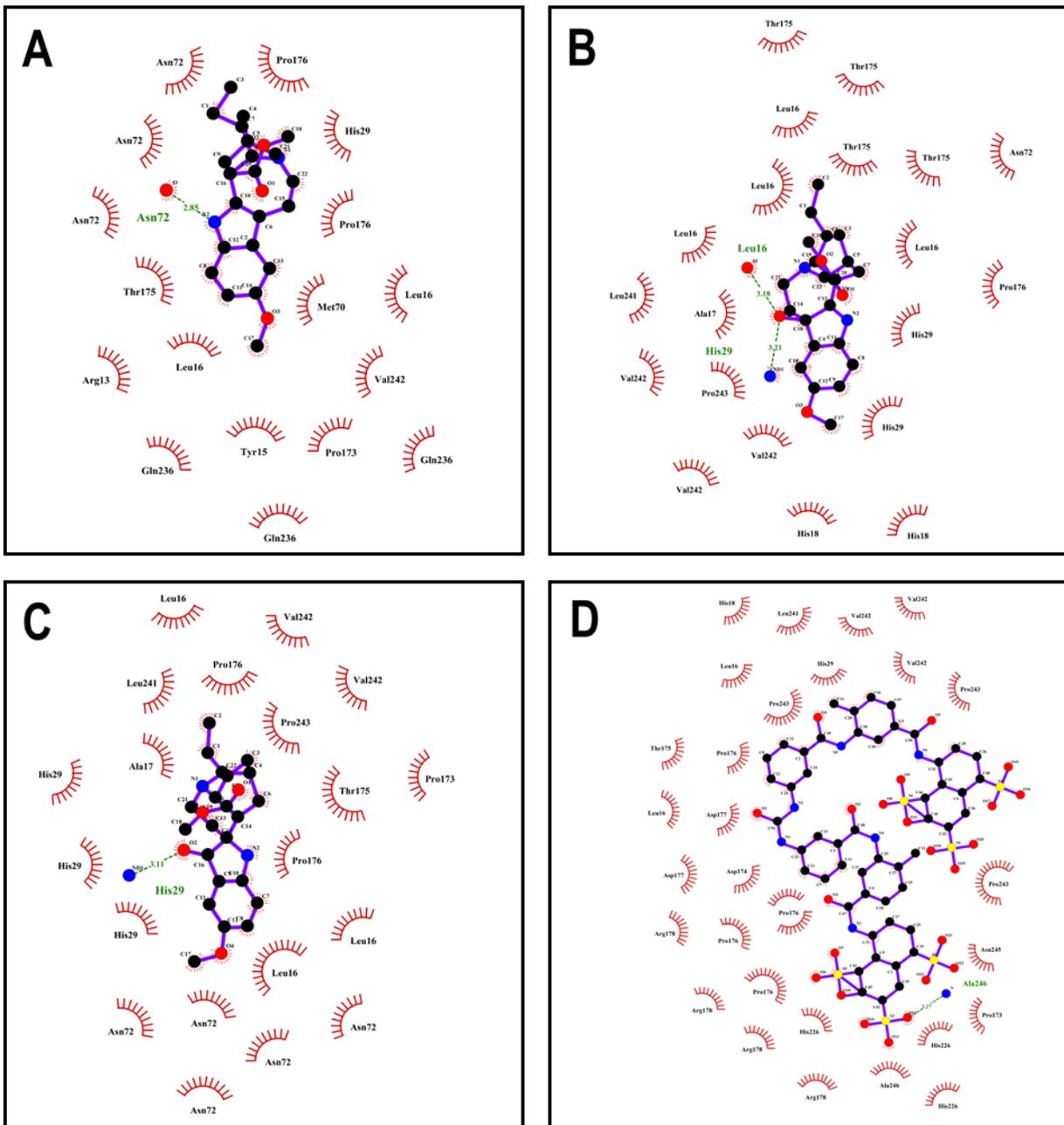
**Figura 15 Complejo de interacción ligando y proteína diana con LigPlot.**

**A.** Ligando Voacangina en interacción con los aminoácidos del bolsillo de la proteína E de DENV. **B.** Ligando Voacangina-OH en interacción con los aminoácidos del bolsillo de la proteína E de DENV. **C.** Ligando Rupicolina en interacción con los aminoácidos del bolsillo de la proteína E de DENV. **D.** Ligando Suramina en interacción con los aminoácidos del bolsillo de la proteína E de DENV



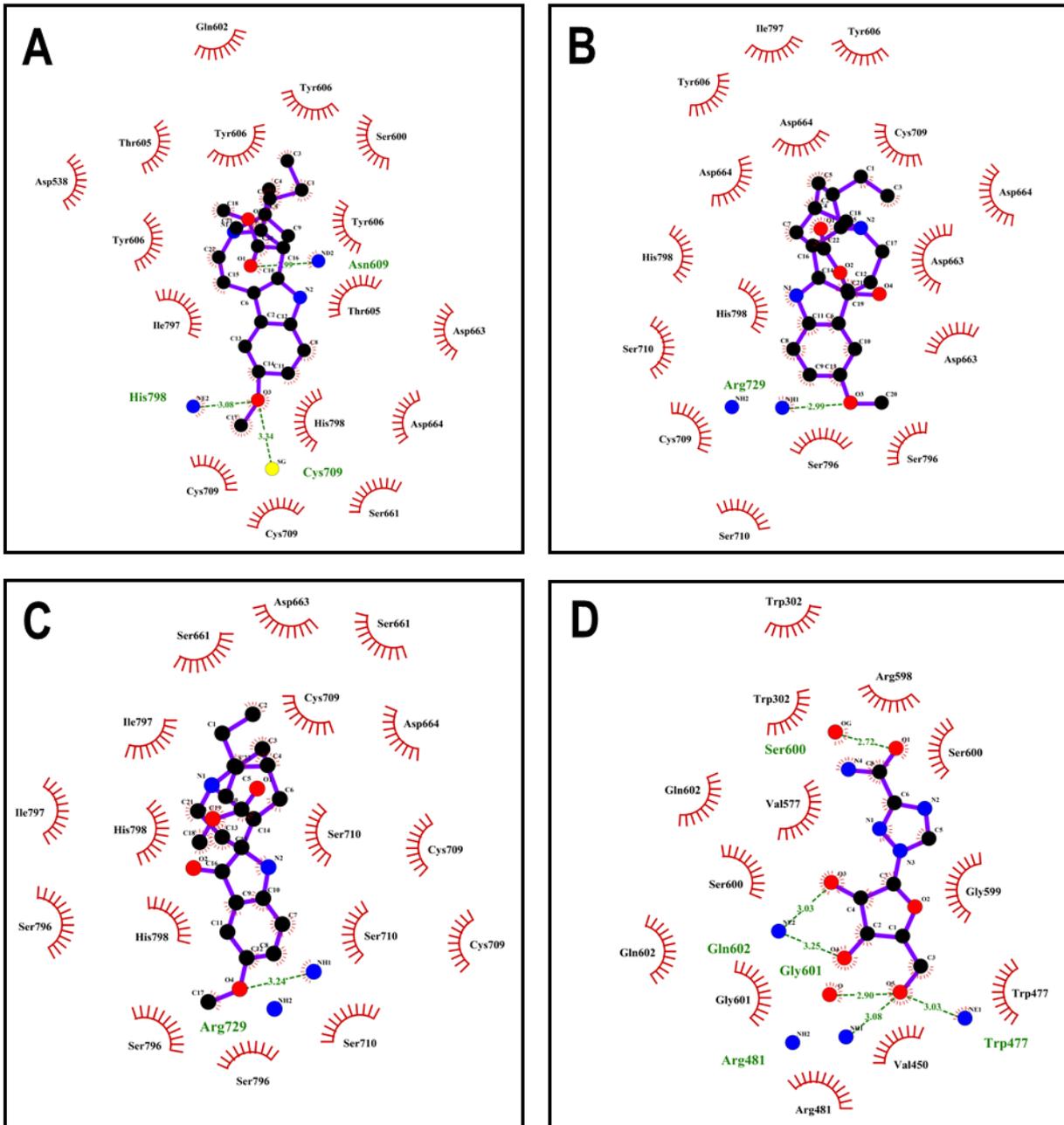
**Figura 16 Complejo de interacción ligando y proteína diana con LigPlot.**

**A.** Ligando Voacangina en interacción con los aminoácidos del bolsillo de la proteína E de ZIKV. **B.** Ligando Voacangina-OH en interacción con los aminoácidos del bolsillo de la proteína E de ZIKV. **C.** Ligando Rupicolina en interacción con los aminoácidos del bolsillo de la proteína E de ZIKV. **D.** Ligando Suramina en interacción con los aminoácidos del bolsillo de la proteína E de ZIKV



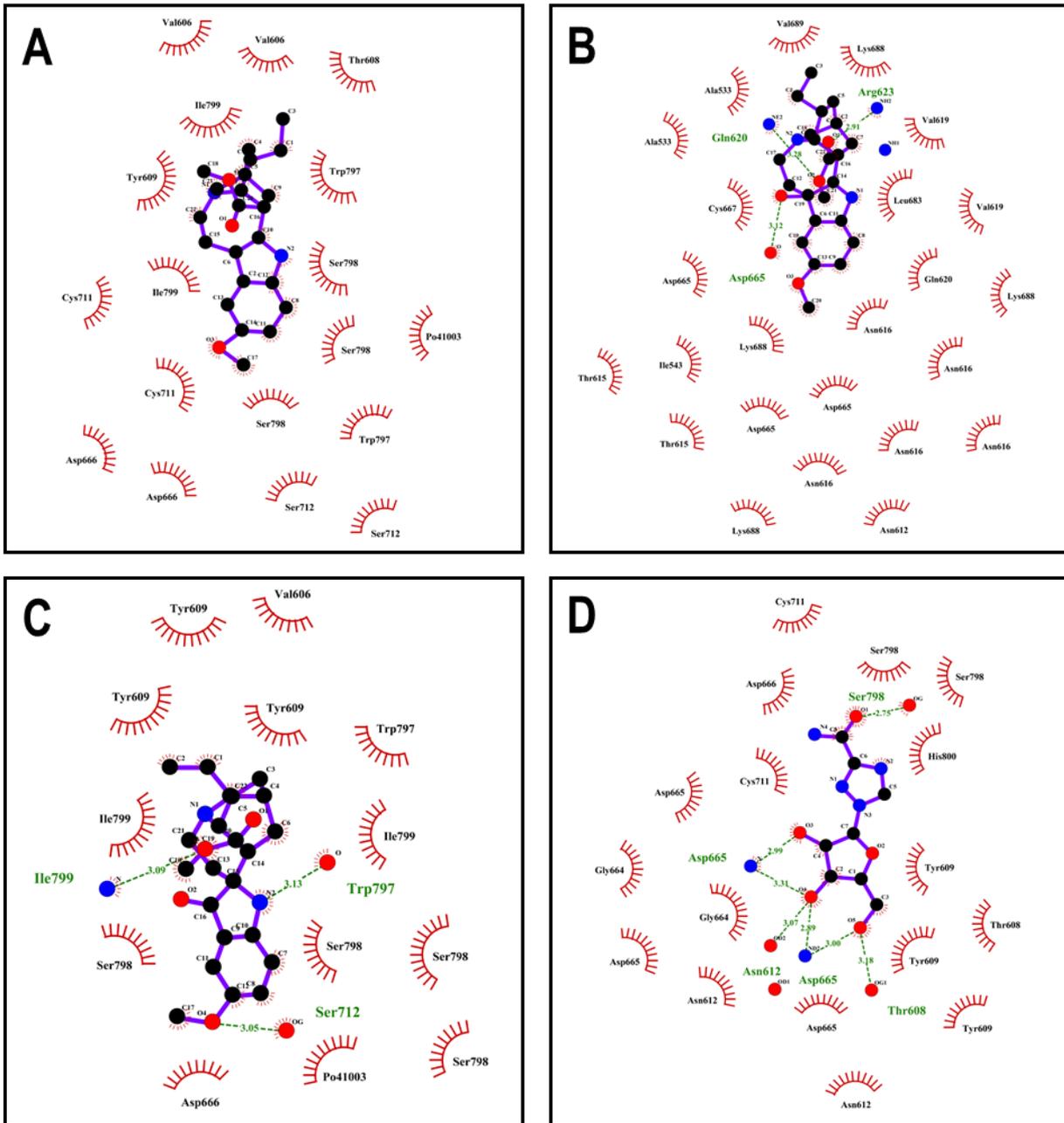
**Figura 17 Complejo de interacción ligando y proteína diana con LigPlot.**

**A.** Ligando Voacangina en interacción con los aminoácidos del bolsillo de la proteína E de CHIKV. **B.** Ligando Voacangina-OH en interacción con los aminoácidos del bolsillo de la proteína E de CHIKV. **C.** Ligando Rupicolina en interacción con los aminoácidos del bolsillo de la proteína E de CHIKV. **D.** Ligando Suramina en interacción con los aminoácidos del bolsillo de la proteína E de CHIKV



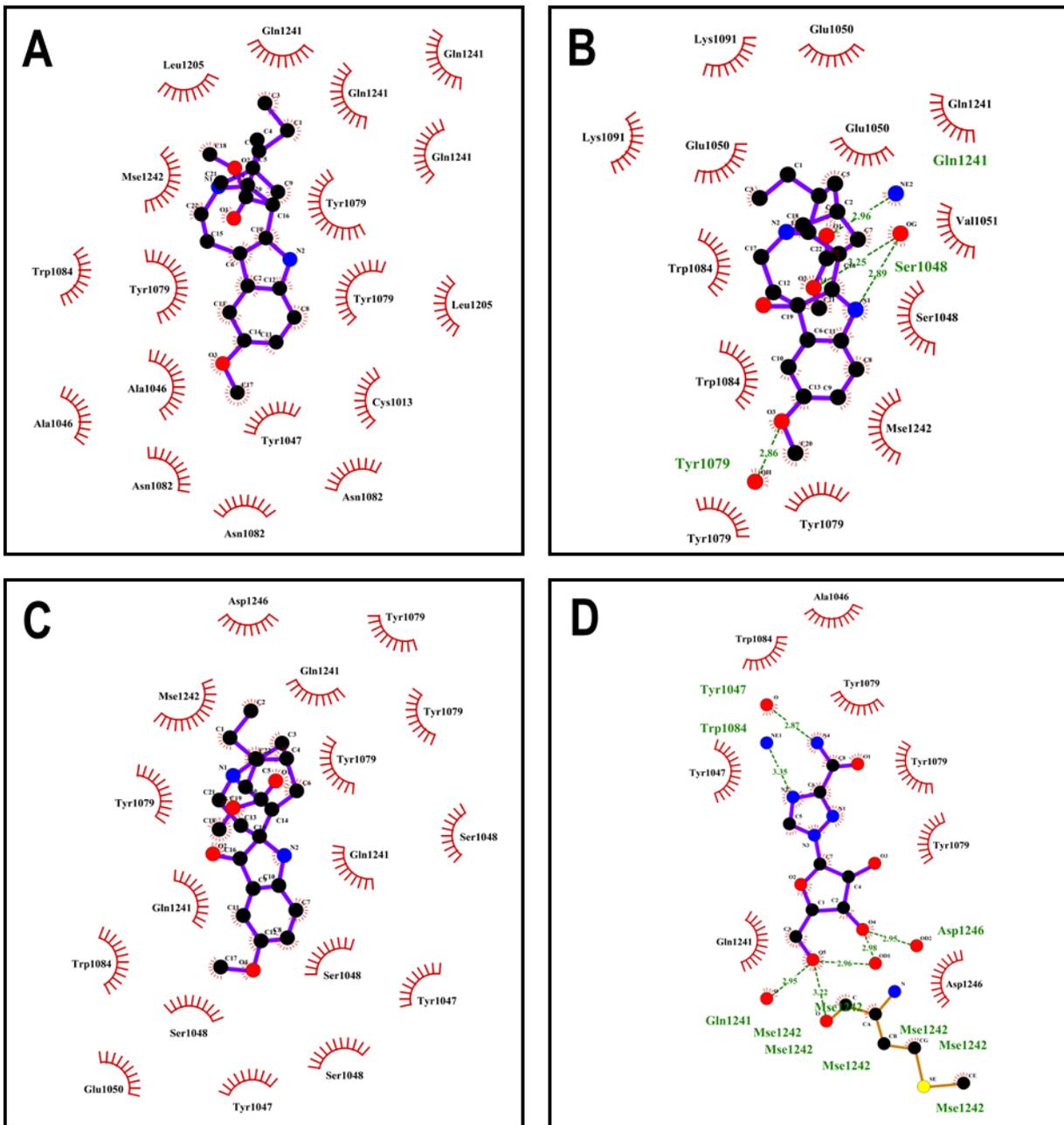
**Figura 18 Complejo de interacción ligando y proteína diana con LigPlot.**

**A.** Ligando Voacangina en interacción con los aminoácidos del bolsillo de la proteína NS5 de DENV. **B.** Ligando Voacangina-OH en interacción con los aminoácidos del bolsillo de la proteína NS5 de DENV. **C.** Ligando Rupicolina en interacción con los aminoácidos del bolsillo de la proteína NS5 de DENV. **D.** Ligando Ribavirina en interacción con los aminoácidos del bolsillo de la proteína NS5 de DENV



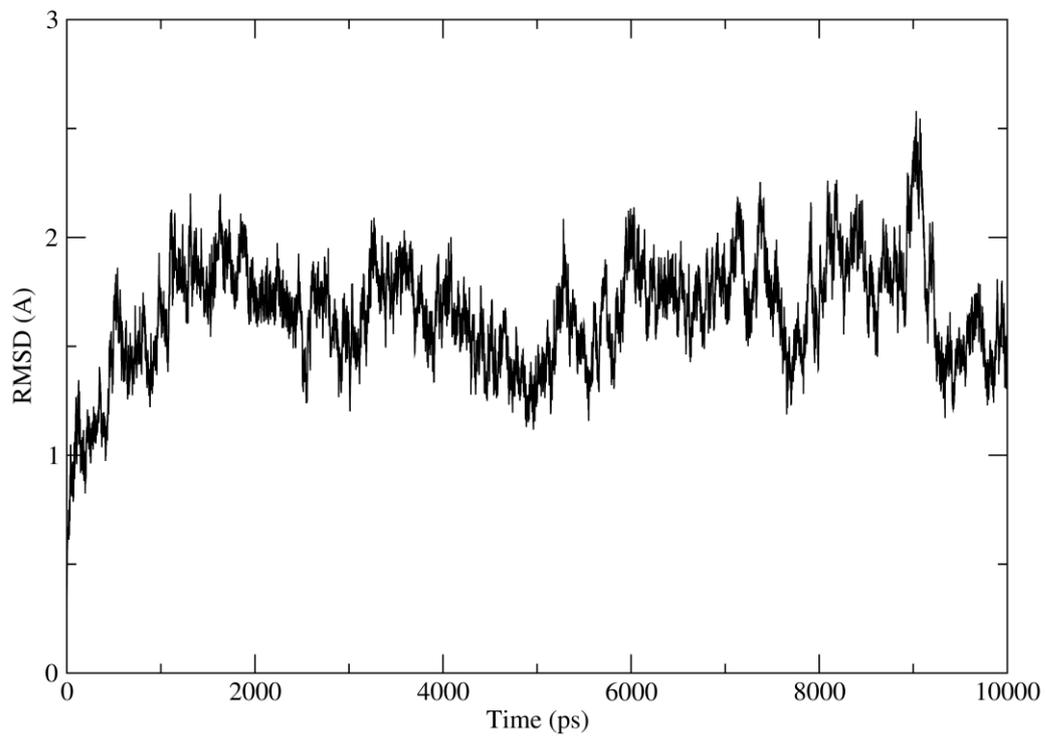
**Figura 19 Complejo de interacción ligando y proteína diana con LigPlot.**

**A.** Ligando Voacangina en interacción con los aminoácidos del bolsillo de la proteína NS5 de ZIKV. **B.** Ligando Voacangina-OH en interacción con los aminoácidos del bolsillo de la proteína NS5 de ZIKV. **C.** Ligando Rupicolina en interacción con los aminoácidos del bolsillo de la proteína NS5 de ZIKV. **D.** Ligando Ribavirina en interacción con los aminoácidos del bolsillo de la proteína NS5 de ZIKV



**Figura 20** Complejo de interacción ligando y proteína diana con LigPlot.

**A.** Ligando Voacangina en interacción con los aminoácidos del bolsillo de la proteína NSP2 de CHIKV.  
**B.** Ligando Voacangina-OH en interacción con los aminoácidos del bolsillo de la proteína NSP2 de CHIKV.  
**C.** Ligando Rupicolina en interacción con los aminoácidos del bolsillo de la proteína NSP2 de CHIKV.  
**D.** Ligando Ribavirina en interacción con los aminoácidos del bolsillo de la proteína NSP2 de CHIKV



**Figura 21: Dinámica molecular del complejo de DENV y la proteína de envoltura.**

La desviación de la media cuadrática (RMSD) entre los carbonos alfa del ligando y la proteína diana no supera los 1.2 Å durante 10 picosegundos.

## 18. TABLAS

**Tabla 1. Acoplamiento molecular con proteína estructural.**

Se indican la energía libre de unión obtenida por AutoDockVina, la cantidad de puentes de hidrógenos que se predicen, los átomos involucrados en los mismos, la distancia del puente y los puntos calientes definido en PeptiMap.

Resultado acoplamiento molecular					Información de la proteína diana					
Ligando	Kcal/mol	Puentes H	Átomos en Puentes H	Distancia Å	Proteína blanco	Código PBD	Cadena	Sitio de unión (Basado en PeptiMap)	Dominio	Resolución Å
<b>Envoltura DENV</b>										
Voacangina	-6,0	2	Phe337 (x2)	(3,21-3,14)	Envoltura	3UZV	A	Met301, Lys334, Ile335, Pro336, Phe337, Glu338, Leu351, Val354, Asn355, Pro356	III	2,1
Voacangina-OH	-5,4	2	Lys334-Asn355	3,20-3,25						
Rupicolina	-5,1	1	Phe337	3,07						
Suramina	-7,8	4	Phe337-Glu338-Gln386 (x2)	3,13-3,22-(3,11-3,26)						
<b>Envoltura ZIKV</b>										
Voacangina	-5,4	0	N/A	N/A	Envoltura	5JHM	A	Pro39, Thr40, Val143, His144, Gly145, Ser146, Phe183, Leu300, Thr360, Ala361, Asn362, Pro363, Val364, Met374	II	2
Voacangina-OH	-5,5	1	Thr366	2,71						
Rupicolina	-5,5	1	Lys373	2,97						
Suramina	-8,8	13	Ile1, Arg2 (x2), Gly5, Glu162, Asn163, Lys373 (x2)-Thr366-Arg164-Ile4-Cys3-Val6	3,02-(3,24-3,33)3,02-3,13-3,04-(3,06-3,03)-3,04-3,19-3,32-2,97-3,31						
<b>Envoltura CHIKV</b>										
Voacangina	-6,8	1	Asn72	2,85	Envoltura	3N44	B	Arg13, Tyr15, Leu16, Ala17, His18, His29, Met70, Pro173, Asp174, Thr175, Gln236, Leu241, Val242, Pro243	E2	2,3
Voacangina-OH	-6,9	2	Leu16-His29	3,18-3,21						
Rupicolina	-6,6	1	His29	3,11						
Suramina	-8	1	Ala246	3,27						

**Tabla 2. Acoplamiento molecular con proteína no estructural.**

Se indican la energía libre de unión obtenida por AutoDockVina, la cantidad de puentes de hidrógenos que se predicen, los átomos involucrados en los mismos, la distancia del puente y los puntos calientes definido en PeptiMap.

Resultado acoplamiento molecular					Información de la proteína diana					
Ligando	Kcal/mol	Puentes H	Átomos en Puentes H	Distancia Å	Proteína blanco	Código PBD	Cadena	Sitio de unión (Basado en PeptiMap)	Dominio	Resolución Å
<b>NS5 DENV</b>										
Voacangina	-7,4	3	Asn609-His798-Cys709	2,99-3,08-3,34	RdRp	2J7U	A	Arg279, Trp302, Ser317, Met340, Gly508, Glu509, Gly510, Leu511, His512, Ala799	Dominio catalítico	1,8
Voacangina-OH	-7	1	Arg729	2,99						
Rupicolina	-7,4	1	Arg729	3,24						
Ribavirina	-6,1	6	Ser600-Gln602 (x2)-Gly601-Arg481-Trp477	2,72-(3,03-3,25)-2,90-3,08-3,03						
<b>NS5 ZIKV</b>										
Voacangina	-6,4	0	N/A	N/A	RdRp	5U04	A	Arg542, Ile543, Asn612, Thr615, Asn616, Val619, Gln620, Gly664, Asp665, Leu683, Lys688	Polimerasa	1,9
Voacangina-OH	-7,1	3	Arg623-Gln620-Asp665	2,91-3,28-3,12						
Rupicolina	-6,8	3	Ile797, -Ser712-Trp797	3,09-3,05-3,13						
Ribavirina	-5,9	7	Asn612-Asp665(x4)-Thr608-Ser798	3,07 (3,00-2,89-3,31-2,99)-3,18-2,75						
<b>NSP2 CHIKV</b>										
Voacangina	-7,0	0	N/A	N/A	NSP2	3TRK	A	Asn1011, Cys1013, Trp1014, Ala1046, Tyr1047, Ser1048, Pro1049, Glu1050, Val1051, Asn1054, Leu1065, Val1077, Tyr1079, Asn1082, His1083, Trp1084, Lys1091, Glu1204, Leu1205	Hidrolasa	2,3
Voacangina-OH	-6,7	4	Tyr1079-Ser1048(x2)-Gln1241	2,86-(2,89-3,25)-2,96						
Rupicolina	-6	0								
Ribavirina	-6	7	Tyr1047-Trp1084-Asp1246(x3)-Gln1241-Mse1242	2,87-3,35-(2,95-2,98-2,96)-2,98-3,22						

**Tabla 3. Cambios aminoácídicos en el gen de la envoltura de las cepas DENV-2/NG y DENV-2/16681.**

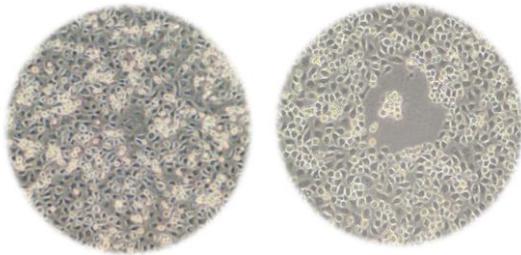
El alineamiento obtenido en MEGA de los fragmentos del gen de la envoltura para las DENV-2/NG indicada como muestra 1 y DENV-2/16681 indicada como muestra 2, y dos secuencias de referencia de ambas cepas obtenidas en la base de datos de nucleótidos de NCBI GenBank, muestra 6 cambios aminoacídicos.

	<b>Secuencia alineadas fragmento de envoltura</b>					
	<b>112</b>	<b>120</b>	<b>124</b>	<b>126</b>	<b>454</b>	<b>478</b>
DENV-2 New Guinea C (AB609589)	G	T	N	E	T	S
DENV-2/NG (Muestra 1)	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>S</u>
DENV-2 16681 (NC001474)	G	R	N	E	T	T
DENV-2/16681 (Muestra 2)	<u>G</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	<u>E</u>	<u>I</u>	<u>I</u>

## 19. ANEXO

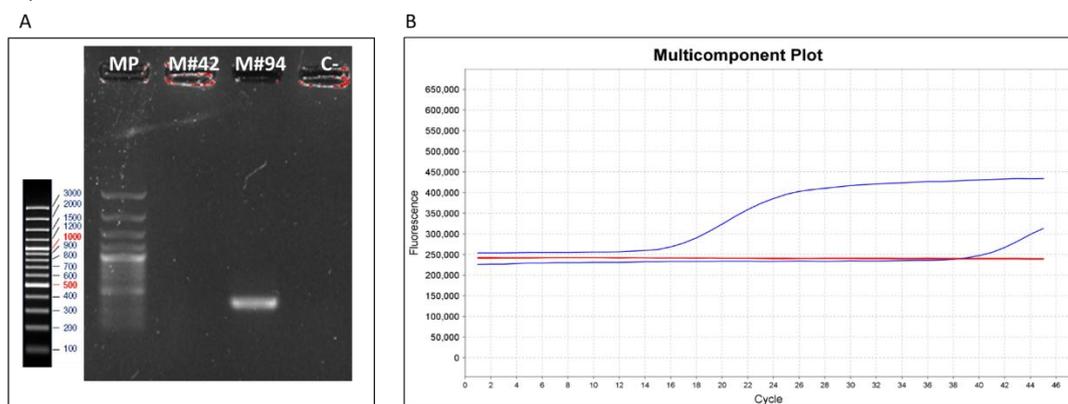
### 19.1. Aislamiento de ZIKV/Col a partir de suero de paciente del Norte de Santander.

Se inoculó 200  $\mu$ L de suero de paciente masculino identificado como #94 con 800  $\mu$ L de L-15 2% SFB sobre una monocapa de C6/36 con confluencia del 80% en placa de 6 pozos. Se realizaron comparaciones diarias de la muestra inoculada con el control negativo de inoculación para identificar cambios morfológicos en las células, indicativo de la presencia del posible agente viral. Se observó formación de sincitios a partir del 5 dpi, el cual es el efecto citopático característico del aislado sobre esta línea celular (Figura 22).



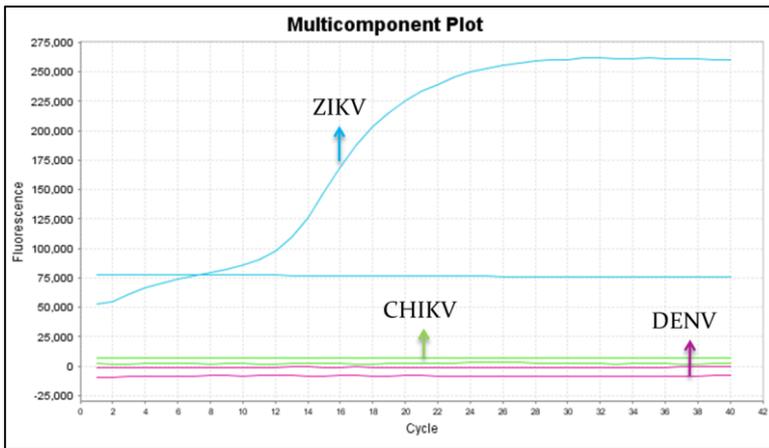
**Figura 22. Efecto citopático de ZIKV-Acol:** a la izquierda el control negativo de inoculación al 7 dpi, a la derecha células infectadas con el suero del paciente #94 al 7 dpi.

Se recolectó el sobrenadante promoviendo la lisis celular por congelación-descongelación tres veces. Se centrifugó el contenido a 2000rpm por 10 min a 4° C y se almacenó el sobrenadante a -80. Luego se hicieron pruebas moleculares para identificar por PCR convencional utilizando los primers ZIKVF9027-ZIKVR9197c [281] que flanquean un fragmento de envoltura de 367 pb y RT-qPCR usando los primers 1086 y 1162c [55] con sonda 1107-FAM que se dirigen a una región de la proteína de la envoltura (FIG 23).



**Figura 23. Pruebas molecular stock de trabajo ZIKV-Acol:** **A.** Gel electroforético con presencia de banda Muestra # 94 de 367 pb junto con el Marcador de peso molecular (MP). **B** amplificación por Taq-Man de la Muestra # 94.

Se realiza el descarte de co-infecciones con otros arbovirus (CHIKV y DENV) (FIG 24)



**Figura 24 RT-qPCR para descarte de co-infecciones de ZIKV-Acol.** Ausencia de amplificación de CHIKV y DENV en la Muestra #94

## 20. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CDC. *National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases*. 2014; Available from: <https://www.cdc.gov/ncezid/dvbd/about.html>.
2. OMS, *Enfermedad por el virus de Zika*. 2016.
3. Delgado, M.J.P., et al., *Imported dengue hemorrhagic fever, Europe*. *Emerging infectious diseases*, 2008. **14**(8): p. 1329.
4. Guzmán, M., *Dengue y fiebre hemorrágica del dengue: un problema de salud mundial*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 2008.
5. Vences-Velázquez, G., et al., *EFICACIA DE UNA INTERVENCIÓN EDUCATIVA EN ESCOLARES DE 4to Y 5to GRADO DE NIVEL PRIMARIA DE QUECHULTENANGO, GUERRERO, COMO ESTRATEGIA PARA EL CONTROL DE Aedes aegypti (DIPTERA: CULICIDAE)*. 2015.
6. Ndi, M.Z., et al., *The effect of Wolbachia on dengue outbreaks when dengue is repeatedly introduced*. *Theoretical Population Biology*, 2016. **111**: p. 9-15.
7. Padilla, J.C., D.P. Rojas, and R.S. Gómez, *Dengue en Colombia: epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia*. 2012: Guías de Impresión Ltda.
8. Tapia-Conyer, R., M. Betancourt-Cravioto, and J. Mendez-Galvan, *Dengue: an escalating public health problem in Latin America*. *Paediatrics and international child health*, 2012. **32**(sup1): p. 14-17.
9. Gubler, D.J., *Aedes aegypti and Aedes aegypti-borne disease control in the 1990s: top down or bottom up*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 1989. **40**(6): p. 571-578.
10. OMS, *Plan continental de ampliación e intensificación del combate al Aedes aegypti*. 1997.
11. Istúriz, R.E., D.J. Gubler, and J.B. del Castillo, *Dengue and dengue hemorrhagic fever in Latin America and the Caribbean*. *Infectious Disease Clinics*, 2000. **14**(1): p. 121-140.
12. San Martín, J.L., et al., *The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2010. **82**(1): p. 128-135.
13. Shepard, D.S., et al., *Economic impact of dengue illness in the Americas*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2011. **84**(2): p. 200-207.
14. Perera, R. and R.J. Kuhn, *Structural proteomics of dengue virus*. *Current opinion in microbiology*, 2008. **11**(4): p. 369-377.
15. González Villarreal, C.A., *Diseño de un sistema de expresión heteróloga de proteínas recombinantes de envoltura del virus del dengue*. 2013, Universidad Autónoma de Nuevo León.
16. Castro-Mussot, M.E., et al., *Immune responses and immunopathogenesis in infections with dengue virus*. *Gaceta medica de Mexico*, 2013. **149**(5): p. 531-540.
17. Celis, A., et al., *Selección de variantes de virus dengue sensibles a la heparina en células BHK-21*. *Investigación Clínica*, 2014. **55**(2): p. 155-167.
18. Normile, D., *Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts*. 2013, American Association for the Advancement of Science.
19. Cortés, F.M., S.Y. Gómez, and R.E. Ocazonez, *Subtipos de virus dengue serotipos 2, 3 y 4 aislados en el Departamento de Santander, Colombia*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 2007. **59**(3): p. 0-0.
20. Guzman, M.a.G. and G. Kouri, *Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges*. *Journal of Clinical Virology*, 2003. **27**(1): p. 1-13.
21. Avirutnan, P., et al., *Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement*. *The Journal of infectious diseases*, 2006. **193**(8): p. 1078-1088.
22. Noisakran, S., et al., *Association of dengue virus NS1 protein with lipid rafts*. *Journal of General Virology*, 2008. **89**(10): p. 2492-2500.

23. Chambers, T.J., et al., *Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990. **87**(22): p. 8898-8902.
24. Heaton, N.S., et al., *Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(40): p. 17345-17350.
25. Marrugo, B. and O. Lloyd, *Evaluación in vitro del efecto de estatinas contra el virus del dengue (DENV)*. 2015, Universidad Autónoma de Nuevo León.
26. Selisko, B., et al., *Biochemical characterization of the (nucleoside-2' O)-methyltransferase activity of dengue virus protein NS5 using purified capped RNA oligonucleotides 7MeGpppACn and GpppACn*. Journal of General Virology, 2010. **91**(1): p. 112-121.
27. Yap, T.L., et al., *Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution*. Journal of virology, 2007. **81**(9): p. 4753-4765.
28. Zhao, Y., et al., *A crystal structure of the dengue virus NS5 protein reveals a novel inter-domain interface essential for protein flexibility and virus replication*. PLoS pathogens, 2015. **11**(3): p. e1004682.
29. Cruz-Oliveira, C., et al., *Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells*. FEMS microbiology reviews, 2015. **39**(2): p. 155-170.
30. Hung, S.-L., et al., *Analysis of the steps involved in dengue virus entry into host cells*. Virology, 1999. **257**(1): p. 156-167.
31. Nelson, J., et al., *The 67 kDa laminin receptor: structure, function and role in disease*. Bioscience reports, 2008. **28**(1): p. 33-48.
32. Lozach, P.-Y., et al., *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(25): p. 23698-23708.
33. Germi, R., et al., *Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus*. Virology, 2002. **292**(1): p. 162-168.
34. Acosta, E.G., V. Castilla, and E.B. Damonte, *Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells*. Cellular microbiology, 2009. **11**(10): p. 1533-1549.
35. Diamond, M.S., et al., *Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains*. Journal of virology, 2000. **74**(17): p. 7814-7823.
36. Mosso, C., et al., *Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT*. Virology, 2008. **378**(1): p. 193-199.
37. Apte-Sengupta, S., D. Sirohi, and R.J. Kuhn, *Coupling of replication and assembly in flaviviruses*. Current opinion in virology, 2014. **9**: p. 134-142.
38. Velandia, M.L. and J.E. Castellanos, *Virus del dengue: estructura y ciclo viral*. Infectio, 2011. **15**(1): p. 33-43.
39. Samsa, M.M., et al., *Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation*. PLoS pathogens, 2009. **5**(10): p. e1000632.
40. Elshuber, S., et al., *Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus FN1*. Journal of General Virology, 2003. **84**(1): p. 183-191.
41. Malagon, J.N., J.C. Padilla, and D.P.R. Alvarez, *Guía de Atención Clínica Integral del paciente con Dengue*. Infectio, 2012. **15**(4).
42. Méndez, Á. and G. González, *Manifestaciones clínicas inusuales del dengue hemorrágico en niños*. Biomédica, 2006. **26**(1): p. 61-70.
43. Zúñiga, E.C., *Dengue Hemorrágico/Síndrome de choque por dengue en un paciente trasplantado cardiaco: reporte del primer caso y revision de la literatura*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología, 2009. **29**(1): p. 41-45.
44. Martina, B.E., P. Koraka, and A.D. Osterhaus, *Dengue virus pathogenesis: an integrated view*. Clinical microbiology reviews, 2009. **22**(4): p. 564-581.
45. Lin, C.F., et al., *Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage*. Journal of medical virology, 2003. **69**(1): p. 82-90.

46. Sun, D.S., et al., *Antiplatelet autoantibodies elicited by dengue virus non-structural protein 1 cause thrombocytopenia and mortality in mice*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2007. **5**(11): p. 2291-2299.
47. Chungue, E., et al., *Correlation between detection of plasminogen cross-reactive antibodies and hemorrhage in dengue virus infection*. Journal of Infectious Diseases, 1994. **170**(5): p. 1304-1307.
48. Martínez-Gutiérrez, M. and J.E. Castellanos, *Dengue hemorrágico, ¿ una aberración inmunológica?* REVISTA DE LA FACULTAD DE MEDICINA, 2006. **11**(2).
49. OMS, *Comité de Emergencia del Reglamento Sanitario Internacional (2005) sobre el virus de Zika y el aumento de los trastornos neurológicos y las malformaciones congénitas*. 2016.
50. Mlakar, J., et al., *Zika virus associated with microcephaly*. New England Journal of Medicine, 2016. **374**(10): p. 951-958.
51. Schuler-Faccini, L., et al., *Posible vínculo entre la infección por el virus del Zika y la microcefalia-Brasil, 2015*. US Department of Health and Human Services/Centers for Disease Control and Prevention. MMWR [serie en Internet]. 2016 ene [citado 19 de marzo de 2016]; 65.
52. Parra, B., et al., *Guillain–Barré syndrome associated with Zika virus infection in Colombia*. New England Journal of Medicine, 2016. **375**(16): p. 1513-1523.
53. Dick, G., S. Kitchen, and A. Haddow, *Zika virus (II). Pathogenicity and physical properties*. Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene, 1952. **46**(5).
54. Fagbami, A., *Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State*. Epidemiology & Infection, 1979. **83**(2): p. 213-219.
55. Lanciotti, R.S., et al., *Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007*. Emerging infectious diseases, 2008. **14**(8): p. 1232.
56. OMS, *Alerta Epidemiológica Incremento de microcefalia en el nordeste de Brasil*. 2015.
57. Cauchemez, S., et al., *Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study*. The Lancet, 2016. **387**(10033): p. 2125-2132.
58. Rasmussen, S.A., et al., *Zika virus and birth defects—reviewing the evidence for causality*. New England Journal of Medicine, 2016. **374**(20): p. 1981-1987.
59. Tang, H., et al., *Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth*. Cell stem cell, 2016. **18**(5): p. 587-590.
60. Hayes, E.B., *Zika virus outside Africa*. Emerging infectious diseases, 2009. **15**(9): p. 1347.
61. Baronti, C., et al., *Complete coding sequence of zika virus from a French polynesia outbreak in 2013*. Genome Announc., 2014. **2**(3): p. e00500-14.
62. Kuno, G. and G.-J. Chang, *Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses*. Archives of virology, 2007. **152**(4): p. 687-696.
63. Wong, S.S.-Y., R.W.-S. Poon, and S.C.-Y. Wong, *Zika virus infection—the next wave after dengue?* Journal of the Formosan Medical Association, 2016. **115**(4): p. 226-242.
64. Gatherer, D. and A. Kohl, *Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas*. Journal of General Virology, 2016. **97**(2): p. 269-273.
65. Faye, O., et al., *Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th century*. PLoS neglected tropical diseases, 2014. **8**(1): p. e2636.
66. Anfasa, F., et al., *Phenotypic differences between Asian and African lineage Zika viruses in human neural progenitor cells*. MSphere, 2017. **2**(4).
67. Hamel, R., et al., *Biology of Zika virus infection in human skin cells*. Journal of virology, 2015. **89**(17): p. 8880-8896.
68. Buckley, A. and E. Gould, *Detection of virus-specific antigen in the nuclei or nucleoli of cells infected with Zika or Langat virus*. Journal of general virology, 1988. **69**(8): p. 1913-1920.
69. Marchette, N., R. Garcia, and A. Rudnick, *Isolation of Zika virus from Aedes aegypti mosquitoes in Malaysia*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 1969. **18**(3): p. 411-415.
70. Grard, G., et al., *Zika virus in Gabon (Central Africa)—2007: a new threat from Aedes albopictus?* PLoS neglected tropical diseases, 2014. **8**(2): p. e2681.

71. Oehler, E., et al., *Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome—case report, French Polynesia, December 2013*. Eurosurveillance, 2014. **19**(9): p. 20720.
72. Ledermann, J.P., et al., *Aedes hensilli as a potential vector of Chikungunya and Zika viruses*. PLoS neglected tropical diseases, 2014. **8**(10): p. e3188.
73. Oliveira Melo, A., et al., *Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg?* Ultrasound in Obstetrics & Gynecology, 2016. **47**(1): p. 6-7.
74. Besnard, M., et al., *Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014*. Eurosurveillance, 2014. **19**(13): p. 20751.
75. Musso, D., et al., *Potential sexual transmission of Zika virus*. Emerging infectious diseases, 2015. **21**(2): p. 359.
76. Musso, D., et al., *Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014*. Eurosurveillance, 2014. **19**(14): p. 20761.
77. Watrin, L., et al., *Guillain–Barré syndrome (42 cases) occurring during a Zika virus outbreak in French Polynesia*. Medicine, 2016. **95**(14).
78. Campos, G.S., A.C. Bandeira, and S.I. Sardi, *Zika virus outbreak, bahia, brazil*. Emerging infectious diseases, 2015. **21**(10): p. 1885.
79. Simmins Jr, C., *Establishing base levels of microcephaly in Brazil prior to the arrival of Zika viral illnesses [published online ahead of print February 8, 2016]*. Bull World Health Organ. doi. **10**.
80. OMS, *Director-General addresses media after Zika Emergency Committee*. 2016.
81. Tetro, J.A., *Zika and microcephaly: causation, correlation, or coincidence*. Microbes Infect, 2016. **18**(3): p. 167-8.
82. Van Den Berg, B., et al., *Guillain–Barré syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis*. Nature Reviews Neurology, 2014. **10**(8): p. 469.
83. Foy, B.D., et al., *Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA*. Emerging infectious diseases, 2011. **17**(5): p. 880.
84. Burt, F.J., et al., *Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen*. The Lancet Infectious Diseases, 2017. **17**(4): p. e107-e117.
85. Ross, R., *The Newala epidemic: III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic*. Epidemiology & Infection, 1956. **54**(2): p. 177-191.
86. Robinson, M.C., *An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1955. **49**(1): p. 28-32.
87. OMS, *Chikungunya and Dengue in the south west Indian Ocean*. 2006.
88. Vu, D.M., D. Jungkind, and A.D. LaBeaud, *Chikungunya virus*. Clinics in laboratory medicine, 2017. **37**(2): p. 371-382.
89. OPS, *Casos acumulados virus Zika*. 2019.
90. de la Salud, A.M., *Respuesta mundial para el control de vectores: informe de la Secretaría*. 2017, Organización Mundial de la Salud.
91. Lum, F.-M. and L.F. Ng, *Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis*. Antiviral research, 2015. **120**: p. 165-174.
92. Tsetsarkin, K.A., et al., *Chikungunya virus: evolution and genetic determinants of emergence*. Current opinion in virology, 2011. **1**(4): p. 310-317.
93. Strauss, J.H. and E.G. Strauss, *The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution*. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 1994. **58**(3): p. 491-562.
94. Fong, R.H., et al., *Exposure of epitope residues on the outer face of the chikungunya virus envelope trimer determines antibody neutralizing efficacy*. Journal of virology, 2014. **88**(24): p. 14364-14379.
95. Metz, S.W., et al., *Functional processing and secretion of Chikungunya virus E1 and E2 glycoproteins in insect cells*. Virology journal, 2011. **8**(1): p. 353.
96. Pietilä, M.K., K. Hellström, and T. Ahola, *Alphavirus polymerase and RNA replication*. Virus research, 2017. **234**: p. 44-57.

97. Shin, G., et al., *Structural and functional insights into alphavirus polyprotein processing and pathogenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(41): p. 16534-16539.
98. Fros, J.J., et al., *Chikungunya virus nsP3 blocks stress granule assembly by recruitment of G3BP into cytoplasmic foci*. Journal of virology, 2012. **86**(19): p. 10873-10879.
99. Wintachai, P., et al., *Identification of prohibitin as a Chikungunya virus receptor protein*. Journal of medical virology, 2012. **84**(11): p. 1757-1770.
100. Schwartz, O. and M.L. Albert, *Biology and pathogenesis of chikungunya virus*. Nature Reviews Microbiology, 2010. **8**(7): p. 491.
101. Bhakat, S. and M.E. Soliman, *Chikungunya virus (CHIKV) inhibitors from natural sources: a medicinal chemistry perspective*. Journal of natural medicines, 2015. **69**(4): p. 451-462.
102. Gómez-Calderón, C., et al., *Antiviral effect of compounds derived from the seeds of Mammea americana and Tabernaemontana cymosa on Dengue and Chikungunya virus infections*. BMC complementary and alternative medicine, 2017. **17**(1): p. 57.
103. Lamballerie, X.D., et al., *On chikungunya acute infection and chloroquine treatment*. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 2008. **8**(6): p. 837-840.
104. Sissoko, D., et al., *Post-epidemic Chikungunya disease on Reunion Island: course of rheumatic manifestations and associated factors over a 15-month period*. PLoS neglected tropical diseases, 2009. **3**(3): p. e389.
105. Manimunda, S.P., et al., *Clinical progression of chikungunya fever during acute and chronic arthritic stages and the changes in joint morphology as revealed by imaging*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2010. **104**(6): p. 392-399.
106. Wagner, E.K., et al., *Basic virology*. Vol. 3. 1999: Blackwell Science Malden, MA.
107. Julander, J.G., et al., *Efficacy of the broad-spectrum antiviral compound BCX4430 against Zika virus in cell culture and in a mouse model*. Antiviral research, 2017. **137**: p. 14-22.
108. de Carvalho, O.V., et al., *The thiopurine nucleoside analogue 6-methylmercaptapurine riboside (6MMPr) effectively blocks Zika virus replication*. International journal of antimicrobial agents, 2017. **50**(6): p. 718-725.
109. Zmurko, J., et al., *The viral polymerase inhibitor 7-deaza-2'-C-methyladenosine is a potent inhibitor of in vitro Zika virus replication and delays disease progression in a robust mouse infection model*. PLoS neglected tropical diseases, 2016. **10**(5): p. e0004695.
110. Eyer, L., et al., *Nucleoside inhibitors of Zika virus*. The Journal of infectious diseases, 2016. **214**(5): p. 707-711.
111. Nguyen, N.M., et al., *A randomized, double-blind placebo controlled trial of balapiravir, a polymerase inhibitor, in adult dengue patients*. The Journal of infectious diseases, 2012. **207**(9): p. 1442-1450.
112. Khan, M., et al., *Cellular IMPDH enzyme activity is a potential target for the inhibition of Chikungunya virus replication and virus induced apoptosis in cultured mammalian cells*. Antiviral research, 2011. **89**(1): p. 1-8.
113. Xu, M., et al., *Identification of small-molecule inhibitors of Zika virus infection and induced neural cell death via a drug repurposing screen*. Nature medicine, 2016. **22**(10): p. 1101.
114. Barrows, N.J., et al., *A screen of FDA-approved drugs for inhibitors of Zika virus infection*. Cell host & microbe, 2016. **20**(2): p. 259-270.
115. Chan, J.F.-W., et al., *Novel antiviral activity and mechanism of bromocriptine as a Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitor*. Antiviral research, 2017. **141**: p. 29-37.
116. Khan, M., et al., *Assessment of in vitro prophylactic and therapeutic efficacy of chloroquine against Chikungunya virus in vero cells*. Journal of medical virology, 2010. **82**(5): p. 817-824.
117. Ozden, S., et al., *Inhibition of Chikungunya Virus Infection in Cultured Human Muscle Cells by Furin Inhibitors IMPAIRMENT OF THE MATURATION OF THE E2 SURFACE GLYCOPROTEIN*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(32): p. 21899-21908.
118. Pohjala, L., et al., *Inhibitors of alphavirus entry and replication identified with a stable Chikungunya replicon cell line and virus-based assays*. PloS one, 2011. **6**(12): p. e28923.

119. Cortez-Gallardo, V., et al., *Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas*. Revista Biomédica, 2004. **15**(2): p. 123-136.
120. Gómez-Estrada, H., et al., *Folk medicine in the northern coast of Colombia: an overview*. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, 2011. **7**(1): p. 27.
121. Jacquin, N.J.v., *Tabernaemontana cymosa Jacq.* 2018.
122. Miers, J., *On the Apocynaceae of South America: With Some Preliminary Remarks on the Whole Family*. 1878: Williams and Norgate.
123. Dey, A., A. Mukherjee, and M. Chaudhury, *Alkaloids from apocynaceae: origin, pharmacotherapeutic properties, and structure-activity studies*, in *Studies in Natural Products Chemistry*. 2017, Elsevier. p. 373-488.
124. Rodríguez, G.M., et al., *Lista comentada de las plantas vasculares de bosques secos prioritarios para la conservación en los departamentos de Atlántico y Bolívar (Caribe colombiano)*. Biota Colombiana, 2012. **13**(2).
125. Cruz, M.P., et al., *Etnobotánica de la región tropical del Cesar, Complejo Ciénaga de Zapatosa*. Colombia, Diversidad Biótica VIII: media y baja montaña de la serranía de Perijá. Pag, 2009: p. 417-447.
126. Espitia Palencia, L.P. and D.C. Sarmiento Bernal, *Caracterización de los Productos Forestales no Maderables del Bosque Seco Tropical Asociado a las Comunidades del Caribe Colombiano*. 2016.
127. Hirschhorn, H.H., *Botanical remedies of South and Central America, and the Caribbean: an archival analysis. Part II. Conclusion*. Journal of ethnopharmacology, 1982. **5**(2): p. 163-180.
128. Díaz Castillo, F., et al., *Actividad larvicida de extractos etanólicos de Tabernaemontana cymosa y Trichilia hirta sobre larvas de estadio III y IV de Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)*. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 2012. **17**(3): p. 256-267.
129. Achenbach, H., M. Benirschke, and R. Torrenegra, *Alkaloids and other compounds from seeds of Tabernaemontana cymosa*. Phytochemistry, 1997. **45**(2): p. 325-335.
130. Farrow, S.C., et al., *Cytochrome P450 and O-methyltransferase catalyze the final steps in the biosynthesis of the anti-addictive alkaloid ibogaine from Tabernanthe iboga*. Journal of Biological Chemistry, 2018. **293**(36): p. 13821-13833.
131. Lavaud, C. and G. Massiot, *The iboga alkaloids*, in *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 105*. 2017, Springer. p. 89-136.
132. Samala, S., et al., *Diversity-oriented synthesis of ketoindoloquinolines and indolotriazoloquinolines from 1-(2-nitroaryl)-2-alkynylindoles*. The Journal of organic chemistry, 2014. **79**(6): p. 2491-2500.
133. Won, C., et al., *Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF ARABIDOPSIS and YUCCAs in Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(45): p. 18518-18523.
134. Young, S.N., *How to increase serotonin in the human brain without drugs*. Journal of psychiatry & neuroscience: JPN, 2007. **32**(6): p. 394.
135. Weng, J.-R., et al., *Indole-3-carbinol as a chemopreventive and anti-cancer agent*. Cancer letters, 2008. **262**(2): p. 153-163.
136. Biersack, B. and R. Schobert, *Indole compounds against breast cancer: recent developments*. Current drug targets, 2012. **13**(14): p. 1705-1719.
137. Kurz, W., et al., *Alkaloid production in Catharanthus roseus cell cultures VIII*. Planta medica, 1981. **42**(05): p. 22-31.
138. Chen, F.-E. and J. Huang, *Reserpine: a challenge for total synthesis of natural products*. Chemical reviews, 2005. **105**(12): p. 4671-4706.
139. Ishikawa, H., D.A. Colby, and D.L. Boger, *Direct coupling of catharanthine and vindoline to provide vinblastine: total synthesis of (+)-and ent-(-)-vinblastine*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(2): p. 420-421.

140. Leneva, I.A., et al., *Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol*. *Antiviral research*, 2009. **81**(2): p. 132-140.
141. Boriskin, Y., et al., *Arbidol: a broad-spectrum antiviral compound that blocks viral fusion*. *Current medicinal chemistry*, 2008. **15**(10): p. 997-1005.
142. Pecheur, E.-I., et al., *Biochemical mechanism of hepatitis C virus inhibition by the broad-spectrum antiviral arbidol*. *Biochemistry*, 2007. **46**(20): p. 6050-6059.
143. Romero, D.L., et al., *Targeting delavirdine/atevirdine resistant HIV-1: identification of (alkylamino) piperidine-containing bis (heteroaryl) piperazines as broad spectrum HIV-1 reverse transcriptase inhibitors*. *Journal of medicinal chemistry*, 1996. **39**(19): p. 3769-3789.
144. Morse, G.D., et al., *Concentration-targeted phase I trials of atevirdine mesylate in patients with HIV infection: dosage requirements and pharmacokinetic studies*. *Antiviral research*, 2000. **45**(1): p. 47-58.
145. Simbirtsev, A., et al., *Biological Activity of Peptide SCV-07 Against Murine Tuberculosis*. *Russian journal of immunology: RJI: official journal of Russian Society of Immunology*, 2003. **8**(1): p. 11-22.
146. Coburn, C.A., et al., *Discovery of MK-8742: an HCV NS5A inhibitor with broad genotype activity*. *ChemMedChem*, 2013. **8**(12): p. 1930-1940.
147. Nakamoto, S., et al., *Hepatitis C virus NS5A inhibitors and drug resistance mutations*. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2014. **20**(11): p. 2902.
148. Devogelaere, B., et al., *TMC647055, a potent nonnucleoside hepatitis C virus NS5B polymerase inhibitor with cross-genotypic coverage*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2012. **56**(9): p. 4676-4684.
149. Cummings, M.D., et al., *Discovery and early development of TMC647055, a non-nucleoside inhibitor of the hepatitis C virus NS5B polymerase*. *Journal of medicinal chemistry*, 2013. **57**(5): p. 1880-1892.
150. Gutiérrez-Lesmes, O.A., L.I. Plata-Casas, and S.C. Montaña-Contreras, *Mortality in minor patients with diagnosis of dengue and its relationship with the use of Dipirone*. *Universidad y Salud*, 2016. **18**(3): p. 550-555.
151. Deen, J., *The dengue vaccine dilemma: balancing the individual and population risks and benefits*. *PLoS medicine*, 2016. **13**(11): p. e1002182.
152. Silva Jr, J.V., et al., *Current status, challenges and perspectives in the development of vaccines against yellow fever, dengue, Zika and chikungunya viruses*. *Acta tropica*, 2018. **182**: p. 257-263.
153. Sáez-Llorens, X., et al., *Immunogenicity and safety of one versus two doses of tetravalent dengue vaccine in healthy children aged 2–17 years in Asia and Latin America: 18-month interim data from a phase 2, randomised, placebo-controlled study*. *The Lancet Infectious Diseases*, 2018. **18**(2): p. 162-170.
154. Gaudinski, M.R., et al., *Safety, tolerability, and immunogenicity of two Zika virus DNA vaccine candidates in healthy adults: randomised, open-label, phase 1 clinical trials*. *The Lancet*, 2018. **391**(10120): p. 552-562.
155. Erasmus, J.H., et al., *A chikungunya fever vaccine utilizing an insect-specific virus platform*. *Nature medicine*, 2017. **23**(2): p. 192.
156. Roy, A., L. Lim, and J. Song, *Identification of quercetin from fruits to immediately fight Zika*. *bioRxiv*, 2016: p. 074559.
157. Carneiro, B.M., et al., *The green tea molecule EGCG inhibits Zika virus entry*. *Virology*, 2016. **496**: p. 215-218.
158. Ciesek, S., et al., *The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, inhibits hepatitis C virus entry*. *Hepatology*, 2011. **54**(6): p. 1947-1955.
159. Talarico, L.B. and E.B. Damonte, *Interference in dengue virus adsorption and uncoating by carrageenans*. *Virology*, 2007. **363**(2): p. 473-485.

160. Rodrigues, J.A.G., et al., *An anti-dengue and anti-herpetic polysulfated fraction isolated from the coenocytic green seaweed Caulerpa cupressoides inhibits thrombin generation in vitro*. Acta Scientiarum. Biological Sciences, 2017. **39**(2): p. 149-159.
161. Talarico, L., et al., *The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell*. Antiviral research, 2005. **66**(2-3): p. 103-110.
162. Zandi, K., et al., *Novel antiviral activity of baicalein against dengue virus*. BMC complementary and alternative medicine, 2012. **12**(1): p. 214.
163. Keivan, Z., et al., *In vitro antiviral activity of fisetin, rutin and naringenin against dengue virus type-2*. Journal of Medicinal Plants Research, 2011. **5**(23): p. 5534-5539.
164. Rothan, H., et al., *Screening of antiviral activities in medicinal plants extracts against dengue virus using dengue NS2B-NS3 protease assay*. Trop. Biomed, 2014. **31**: p. 286-296.
165. Lee, S.H., et al., *Effects of cocktail of four local Malaysian medicinal plants (Phyllanthus spp.) against dengue virus 2*. BMC complementary and alternative medicine, 2013. **13**(1): p. 192.
166. Tang, L.I., et al., *Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants*. BMC complementary and alternative medicine, 2012. **12**(1): p. 3.
167. Mello, C.d.S., et al., *Decrease in Dengue virus-2 infection and reduction of cytokine/chemokine production by Uncaria guianensis in human hepatocyte cell line Huh-7*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2017. **112**(6): p. 458-468.
168. Vázquez-Calvo, Á., et al., *Antiviral properties of the natural polyphenols delphinidin and epigallocatechin gallate against the flaviviruses West Nile virus, Zika virus, and dengue virus*. Frontiers in microbiology, 2017. **8**: p. 1314.
169. Estoppey, D., et al., *The natural product cavinafungin selectively interferes with Zika and dengue virus replication by inhibition of the host signal peptidase*. Cell reports, 2017. **19**(3): p. 451-460.
170. Pryke, K.M., et al., *A novel agonist of the TRIF pathway induces a cellular state refractory to replication of Zika, chikungunya, and dengue viruses*. MBio, 2017. **8**(3): p. e00452-17.
171. Meneses, R., et al., *Aceites esenciales de plantas colombianas inactivan el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla*. Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud, 2009. **41**(3): p. 236-243.
172. Ocazonez, R.E., et al., *Virucidal activity of Colombian Lippia essential oils on dengue virus replication in vitro*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2010. **105**(3): p. 304-309.
173. Lani, R., et al., *Antiviral activity of selected flavonoids against Chikungunya virus*. Antiviral research, 2016. **133**: p. 50-61.
174. Lu, J.-W., et al., *Synergistic effects of combination treatment using EGCG and suramin against the chikungunya virus*. Biochemical and biophysical research communications, 2017. **491**(3): p. 595-602.
175. Varghese, F.S., et al., *The antiviral alkaloid berberine reduces chikungunya virus-induced mitogen-activated protein kinase signaling*. Journal of virology, 2016. **90**(21): p. 9743-9757.
176. Gupta, D., et al., *Anti-Chikungunya viral activities of aplysiatoxin-related compounds from the marine cyanobacterium Trichodesmium erythraeum*. Marine drugs, 2014. **12**(1): p. 115-127.
177. Lani, R., et al., *Antiviral activity of silymarin against chikungunya virus*. Scientific reports, 2015. **5**: p. 11421.
178. Mounce, B.C., et al., *Curcumin inhibits Zika and chikungunya virus infection by inhibiting cell binding*. Antiviral research, 2017. **142**: p. 148-157.
179. Yasumura, Y. and Y. Kawakita, *Studies on SV40 in tissue culture-preliminary step for cancer research in vitro*. Nihon rinsho, 1963. **21**: p. 1201-1215.
180. Desmyter, J., J.L. Melnick, and W.E. Rawls, *Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero)*. Journal of virology, 1968. **2**(10): p. 955-961.
181. Giard, D.J., et al., *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors*. Journal of the National Cancer Institute, 1973. **51**(5): p. 1417-1423.

182. Himmelsbach, K. and E. Hildt, *Identification of various cell culture models for the study of Zika virus*. World journal of virology, 2018. **7**(1): p. 10.
183. Chiu, H.-C., et al., *High-throughput quantitative proteomic analysis of dengue virus type 2 infected A549 cells*. PLoS one, 2014. **9**(3): p. e93305.
184. Sourisseau, M., et al., *Characterization of reemerging chikungunya virus*. PLoS pathogens, 2007. **3**(6): p. e89.
185. Lehmann, M.H., *Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor triggers interleukin-10 expression in the monocytic cell line U937*. Molecular immunology, 1998. **35**(8): p. 479-485.
186. Kuhn, R.J., et al., *Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion*. Cell, 2002. **108**(5): p. 717-725.
187. Song, M.-g., et al., *NRF2 signaling negatively regulates phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)-induced differentiation of human monocytic U937 cells into pro-inflammatory macrophages*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0134235.
188. Farias, K.J.S., et al., *Chloroquine interferes with dengue-2 virus replication in U937 cells*. Microbiology and immunology, 2014. **58**(6): p. 318-326.
189. Chan, J.F.-W., et al., *Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs*. Emerging microbes & infections, 2016. **5**(1): p. 1-12.
190. Wikan, N., et al., *Chikungunya virus infection of cell lines: analysis of the East, Central and South African lineage*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e31102.
191. Martínez-Gutierrez, M., J.E. Castellanos, and J.C. Gallego-Gómez, *Statins reduce dengue virus production via decreased virion assembly*. Intervirology, 2011. **54**(4): p. 202-216.
192. Martínez-Gutierrez, M., et al., *Lovastatin delays infection and increases survival rates in AG129 mice infected with dengue virus serotype 2*. PLoS one, 2014. **9**(2): p. e87412.
193. Gaitán Ibarra, R., *Estudio químico y actividad citotóxica de especies promisorias pertenecientes al género tabebuia en la Costa Atlántica Colombiana*. 1999.
194. Hernández-Castro, C., F. Díaz-Castillo, and M. Martínez-Gutierrez, *Ethanol extracts of Cassia grandis and Tabernaemontana cymosa inhibit the in vitro replication of dengue virus serotype 2*. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2015. **5**(2): p. 98-106.
195. Zanluca, C., et al., *First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2015. **110**(4): p. 569-572.
196. Teixeira, M.G., et al., *The epidemic of Zika virus-related microcephaly in Brazil: detection, control, etiology, and future scenarios*. American journal of public health, 2016. **106**(4): p. 601-605.
197. Perret, C., et al., *Chikungunya, enfermedad emergente en América Latina. Descripción de los primeros casos en Chile*. Revista chilena de infectología, 2018. **35**(4): p. 413-419.
198. Lin, Y.-L., et al., *Heparin inhibits dengue-2 virus infection of five human liver cell lines*. Antiviral research, 2002. **56**(1): p. 93-96.
199. Roehrig, J.T., et al., *Mutation of the dengue virus type 2 envelope protein heparan sulfate binding sites or the domain III lateral ridge blocks replication in Vero cells prior to membrane fusion*. Virology, 2013. **441**(2): p. 114-125.
200. Tan, C.W., et al., *Polysulfonate suramin inhibits Zika virus infection*. Antiviral research, 2017. **143**: p. 186-194.
201. Chen, Y., et al., *Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate*. Nature medicine, 1997. **3**(8): p. 866.
202. Basavannacharya, C. and S.G. Vasudevan, *Suramin inhibits helicase activity of NS3 protein of dengue virus in a fluorescence-based high throughput assay format*. Biochemical and biophysical research communications, 2014. **453**(3): p. 539-544.
203. Ho, Y.-J., et al., *Suramin inhibits chikungunya virus entry and transmission*. PLoS one, 2015. **10**(7): p. e0133511.

204. Kamiyama, N., et al., *Ribavirin inhibits Zika virus (ZIKV) replication in vitro and suppresses viremia in ZIKV-infected STAT1-deficient mice*. *Antiviral research*, 2017. **146**: p. 1-11.
205. Takhampunya, R., et al., *Inhibition of dengue virus replication by mycophenolic acid and ribavirin*. *Journal of General Virology*, 2006. **87**(7): p. 1947-1952.
206. Kaur, P. and J.J.H. Chu, *Chikungunya virus: an update on antiviral development and challenges*. *Drug discovery today*, 2013. **18**(19-20): p. 969-983.
207. Denizot, F. and R. Lang, *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability*. *Journal of immunological methods*, 1986. **89**(2): p. 271-277.
208. Leitmeyer, K.C., et al., *Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis*. *Journal of virology*, 1999. **73**(6): p. 4738-4747.
209. Colpitts, C.C., et al., *Turmeric curcumin inhibits entry of all hepatitis C virus genotypes into human liver cells*. *Gut*, 2014. **63**(7): p. 1137-1149.
210. Carrillo-Hernández, M.Y., et al., *Co-circulation and simultaneous co-infection of dengue, chikungunya, and zika viruses in patients with febrile syndrome at the Colombian-Venezuelan border*. *BMC infectious diseases*, 2018. **18**(1): p. 61.
211. Lanciotti, R.S., et al., *Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006*. *Emerging infectious diseases*, 2007. **13**(5): p. 764.
212. Quintero-Gil, D.C., et al., *Differential replication of dengue virus serotypes 2 and 3 in coinfections of C6/36 cells and Aedes aegypti mosquitoes*. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 2014. **8**(07): p. 876-884.
213. Cockburn, J.J., et al., *Mechanism of dengue virus broad cross-neutralization by a monoclonal antibody*. *Structure*, 2012. **20**(2): p. 303-314.
214. Deng, Y.-Q., et al., *Isolation, identification and genomic characterization of the Asian lineage Zika virus imported to China*. *Science China Life Sciences*, 2016. **59**(4): p. 428-430.
215. Voss, J.E., et al., *Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography*. *Nature*, 2010. **468**(7324): p. 709.
216. Godoy, A.S., et al., *Crystal structure of Zika virus NS5 RNA-dependent RNA polymerase*. *Nature communications*, 2017. **8**: p. 14764.
217. Cheung, J., *Structure of the Chikungunya virus nsP2 protease*. 2011.
218. Trott, O. and A.J. Olson, *AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading*. *Journal of computational chemistry*, 2010. **31**(2): p. 455-461.
219. Phillips, J.C., et al., *Scalable molecular dynamics with NAMD*. *Journal of computational chemistry*, 2005. **26**(16): p. 1781-1802.
220. Domingo, C., et al., *2nd International external quality control assessment for the molecular diagnosis of dengue infections*. *PLoS neglected tropical diseases*, 2010. **4**(10): p. e833.
221. INS, *Boletín Epidemiológico Semanal. Semana epidemiológica 13*. 2020.
222. INS, *Boletín Epidemiológico Semanal*. 2019.
223. Alvis-Guzmán, N., et al., *Dengue, Chikunguña y Zika en Colombia 2015-2016*. *Revista MVZ Cordoba*, 2017: p. 5994-6003.
224. Fonseca-González, I., et al., *Insecticide resistance status of Aedes aegypti (L.) from Colombia*. *Pest management science*, 2011. **67**(4): p. 430-437.
225. OMS, *Dengue y dengue grave*. 2019.
226. OMS, *Enfermedad por el virus de Zika*. 2018.
227. OMS, *Chikungunya*. 2017.
228. Kaushik, N., et al., *Biomedical importance of indoles*. *Molecules*, 2013. **18**(6): p. 6620-6662.
229. Torres, O.A.D., *A bioprospección na Colombia: um exemplo de conflito entre as capacidades de ciencia e tecnologia e o marco regulatório*. 2009.
230. Fernández-Plaza, S., J. Sevilla, and L. Madero, *Tratamiento del cáncer en pediatría: estado actual y expectativas futuras*. *Pediatr integral*, 2004. **8**(6): p. 5001-10.

231. Kottkamp, A.C., et al., *The antiparasitic drug atovaquone inhibits arbovirus replication through the depletion of intracellular nucleotides*. *BioRxiv*, 2018: p. 507152.
232. Marra, R.K., et al., *Quinolone-N-Acylhydrazone Hybrids as Potent Zika and Chikungunya Virus Inhibitors*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2019: p. 126881.
233. Xue, L., X. Fang, and J.M. Hyman, *Comparing the effectiveness of different strains of Wolbachia for controlling chikungunya, dengue fever, and zika*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2018. **12**(7): p. e0006666.
234. Beltrán-Silva, S., et al., *Clinical and differential diagnosis: Dengue, chikungunya and Zika*. *Revista Médica del Hospital General de México*, 2018. **81**(3): p. 146-153.
235. Paemanee, A., et al., *Screening of melatonin,  $\alpha$ -tocopherol, folic acid, acetyl-L-carnitine and resveratrol for anti-dengue 2 virus activity*. *BMC research notes*, 2018. **11**(1): p. 307.
236. Blázquez, A.B., M.A. Martín-Acebes, and J.-C. Saiz, *Inhibition of West Nile virus multiplication in cell culture by anti-Parkinsonian drugs*. *Frontiers in microbiology*, 2016. **7**: p. 296.
237. Salvato, M., et al., *Molecular basis of viral persistence: a single amino acid change in the glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus is associated with suppression of the antiviral cytotoxic T-lymphocyte response and establishment of persistence*. *Journal of virology*, 1991. **65**(4): p. 1863-1869.
238. Snow, G.E., et al., *Research on dengue during World War II revisited*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2014. **91**(6): p. 1203-1217.
239. Wu-Hsieh, B.A., Y.T. Yen, and H.C. Chen, *Dengue hemorrhage in a mouse model*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2009. **1171**: p. E42-E47.
240. Acosta, E.G., V. Castilla, and E.B. Damonte. *Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells*. *Cellular microbiology* 2009 [cited 11 10]; 1533-1549].
241. Teissier, E., et al., *Mechanism of inhibition of enveloped virus membrane fusion by the antiviral drug arbidol*. *PloS one*, 2011. **6**(1): p. e15874.
242. Martínez-Betancur, V., M. Marín-Villa, and M. Martínez-Gutierrez, *Infection of epithelial cells with dengue virus promotes the expression of proteins favoring the replication of certain viral strains*. *Journal of medical virology*, 2014. **86**(8): p. 1448-1458.
243. Martínez-Betancur, V. and M. Martínez-Gutierrez, *Proteomic profile of human monocytic cells infected with dengue virus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2016. **6**(11): p. 914-923.
244. de Sa, A., et al., *From nature to drug discovery: the indole scaffold as a 'privileged structure'*. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 2009. **9**(7): p. 782-793.
245. Tan, D.X., et al., *Ebola virus disease: potential use of melatonin as a treatment*. *Journal of pineal research*, 2014. **57**(4): p. 381-384.
246. Gulick, R.M., et al., *Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection*. *New England Journal of Medicine*, 2008. **359**(14): p. 1429-1441.
247. Wollmann, G., et al., *Attenuation of vesicular stomatitis virus infection of brain using antiviral drugs and an adeno-associated virus-interferon vector*. *Virology*, 2015. **475**: p. 1-14.
248. Franco, E.J., et al., *The effectiveness of antiviral agents with broad-spectrum activity against chikungunya virus varies between host cell lines*. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 2018. **26**: p. 2040206618807580.
249. Nowicka-Sans, B., et al., *In vitro antiviral characteristics of HIV-1 attachment inhibitor BMS-626529, the active component of the prodrug BMS-663068*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2012. **56**(7): p. 3498-3507.
250. Lalezari, J.P., et al., *Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America*. *New England Journal of Medicine*, 2003. **348**(22): p. 2175-2185.
251. Honigsmann, A. and A. Pralle, *Compartmentalization of the cell membrane*. *Journal of molecular biology*, 2016. **428**(24): p. 4739-4748.
252. Thaker, S.K., et al., *Differential Metabolic Reprogramming by Zika Virus Promotes Cell Death in Human versus Mosquito Cells*. *Cell metabolism*, 2019. **29**(5): p. 1206-1216. e4.

253. Saxena, T., et al., *Combined miRNA and mRNA signature identifies key molecular players and pathways involved in chikungunya virus infection in human cells*. PLoS one, 2013. **8**(11): p. e79886.
254. Iranpour, M., et al., *Apoptosis, autophagy and unfolded protein response pathways in Arbovirus replication and pathogenesis*. Expert reviews in molecular medicine, 2016. **18**.
255. Das, T., et al., *Multifaceted innate immune responses engaged by astrocytes, microglia and resident dendritic cells against Chikungunya neuroinfection*. Journal of General Virology, 2015. **96**(2): p. 294-310.
256. Abdullahi, A., et al., *Catecholamines Induce Endoplasmic Reticulum Stress via Both Alpha and Beta Receptors*. Shock (Augusta, Ga.), 2019.
257. Krejbich-Trotot, P., et al., *Chikungunya virus mobilizes the apoptotic machinery to invade host cell defenses*. The FASEB Journal, 2011. **25**(1): p. 314-325.
258. Krejbich-Trotot, P., et al., *Chikungunya triggers an autophagic process which promotes viral replication*. Virology journal, 2011. **8**(1): p. 432.
259. Nayak, T.K., et al., *P38 and JNK Mitogen-Activated Protein Kinases Interact With Chikungunya Virus Non-structural Protein-2 and Regulate TNF Induction During Viral Infection in Macrophages*. Frontiers in Immunology, 2019. **10**: p. 786.
260. Delvecchio, R., et al., *Chloroquine, an endocytosis blocking agent, inhibits Zika virus infection in different cell models*. Viruses, 2016. **8**(12): p. 322.
261. Albulescu, I.C., et al., *Suramin inhibits Zika virus replication by interfering with virus attachment and release of infectious particles*. Antiviral research, 2017. **143**: p. 230-236.
262. Gillespie, L.K., et al., *The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex*. Journal of virology, 2010. **84**(20): p. 10438-10447.
263. Samuel, C.E., *Antiviral actions of interferons*. Clinical microbiology reviews, 2001. **14**(4): p. 778-809.
264. Dong, B., et al., *Intrinsic molecular activities of the interferon-induced 2-5A-dependent RNase*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(19): p. 14153-14158.
265. Ortigoza, M.B., et al., *A novel small molecule inhibitor of influenza A viruses that targets polymerase function and indirectly induces interferon*. PLoS pathogens, 2012. **8**(4): p. e1002668.
266. Pellegrino, S., et al., *The Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine binds the eukaryotic ribosome to repress cancer cell growth*. Structure, 2018. **26**(3): p. 416-425. e4.
267. Al Ustwani, O., et al., *Omacetaxine mepesuccinate in chronic myeloid leukemia*. Expert opinion on pharmacotherapy, 2014. **15**(16): p. 2397-2405.
268. Terstappen, G.C. and A. Reggiani, *In silico research in drug discovery*. Trends in pharmacological sciences, 2001. **22**(1): p. 23-26.
269. Velásquez, M., et al., *Autodock-PM6 method to choose the better pose in molecular docking studies*. Revista Colombiana de Química, 2013. **42**(1): p. 101-124.
270. Plemper, R.K., *Cell entry of enveloped viruses*. Current opinion in virology, 2011. **1**(2): p. 92-100.
271. Tassaneeritthep, B., et al., *DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells*. Journal of Experimental Medicine, 2003. **197**(7): p. 823-829.
272. Scheiner, S., T. Kar, and J. Pattanayak, *Comparison of various types of hydrogen bonds involving aromatic amino acids*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(44): p. 13257-13264.
273. Quintero-Gil, C., et al., *In-silico design and molecular docking evaluation of peptides derivatives from bacteriocins and porcine beta defensin-2 as inhibitors of Hepatitis E virus capsid protein*. Virusdisease, 2017. **28**(3): p. 281-288.
274. Waters, M.L., *Aromatic interactions in model systems*. Current opinion in chemical biology, 2002. **6**(6): p. 736-741.

275. Kumar, M., A. Sudeep, and V.A. Arankalle, *Evaluation of recombinant E2 protein-based and whole-virus inactivated candidate vaccines against chikungunya virus*. *Vaccine*, 2012. **30**(43): p. 6142-6149.
276. Ekins, S., J. Mestres, and B. Testa, *In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling*. *British journal of pharmacology*, 2007. **152**(1): p. 9-20.
277. Bourai, M., et al., *Mapping of Chikungunya virus interactions with host proteins identified nsP2 as a highly connected viral component*. *Journal of virology*, 2012. **86**(6): p. 3121-3134.
278. Ismail, N.S., et al., *Computer based design, synthesis and biological evaluation of novel indole derivatives as HCV NS3-4A serine protease inhibitors*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2008. **16**(17): p. 7877-7887.
279. Murgueitio, M.S., et al., *In silico virtual screening approaches for anti-viral drug discovery*. *Drug Discovery Today: Technologies*, 2012. **9**(3): p. e219-e225.
280. Ekins, S., J. Mestres, and B. Testa, *In silico pharmacology for drug discovery: applications to targets and beyond*. *British journal of pharmacology*, 2007. **152**(1): p. 21-37.
281. Balm, M.N., et al., *A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus*. *Journal of medical virology*, 2012. **84**(9): p. 1501-1505.