

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**“ACTIVIDAD ANTIVIRAL DEL ÁCIDO GINKGÓLICO CONTRA LOS VIRUS
MAYARO, UNA, CHIKUNGUNYA Y ZIKA”**

PRESENTADO POR:

**SUSANA NAVARRO
2-734-1959**

**ASESOR PRINCIPAL
DR. JOSÉ GONZÁLEZ SANTAMARÍA**

Trabajo de Graduación presentado a consideración de la Escuela de Biología como requisito parcial para optar por el título de Licenciatura en Biología con Orientación en Microbiología y Parasitología.

**PANAMA , REPUBLICA DE PANAMA
2022**

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ



TRIBUNAL EXAMINADOR

Título

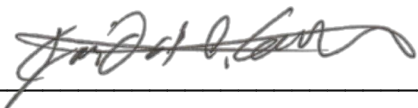
“ACTIVIDAD ANTIVIRAL DEL ÁCIDO GINKGÓLICO CONTRA LOS VIRUS MAYARO, UNA, CHIKUNGUNYA Y ZIKA”

Por:

Susana Navarro
2-734-1959

Trabajo de Graduación presentado a consideración de la Escuela de Biología como requisito parcial para optar por el título de Licenciatura en Biología con Orientación en Microbiología y Parasitología.

Dr. José González Santamaría
Asesor Principal



Firma del Asesor.

Dr. Humberto Cornejo
Co-Asesor

Firma del Asesor.

MSc. Fermín Mejía
Co-Asesor

Firma del Asesor.

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

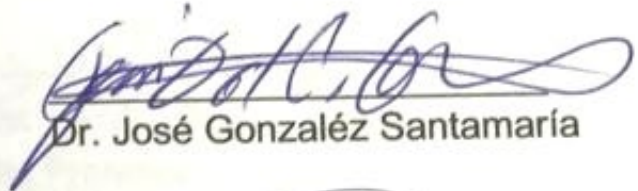
Ciudad Universitaria, Miércoles 16 de Febrero de 2022.

Por este medio se hace constar que el Proyecto de Trabajo de Graduación titulado: "ACTIVIDAD ANTIVIRAL DEL ÁCIDO GINKGÓLICO CONTRA LOS VIRUS MAYARO, UNA, CHICUNGUNYA Y ZIKA". Ha sido recomendado por el Departamento de Microbiología y Parasitología.

El trabajo será realizado por el estudiante:

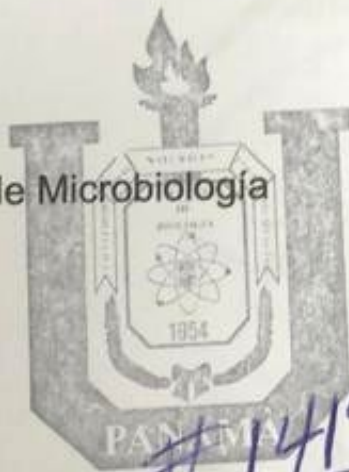
Susana Navarro

Profesor Asesor Principal:


Dr. José González Santamaría


Prof. Director del Dep. de Microbiología y Parasitología:


Dr. Humberto Cornejo



#1419

Aprobado por:


Dra. Dora Quirós

Directora de la Escuela de Biología

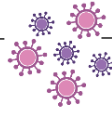
Fecha:

25/2/2022

Código:

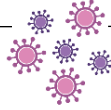
#1419

DEDICATORIA



Con todo el amor para mi familia, mi padre Hernán O. Navarro Hernández, mi madre Yolanda del C. Quirós Tuñón, mi hermano Fernando Alexis Quirós y a ti Arturo Torres Hernández que desde el cielo me sonríes, gracias por celebrar todos mis triunfos, fortalecerme en los momentos difíciles e impulsarme a seguir adelante, alcanzar cada una de mis metas y siempre estar ahí para mí.

AGRADECIMIENTOS



A Dios Todopoderoso, por concederme el regalo de la vida, la fe y la confianza para salir adelante y poder cumplir cada una de mis metas propuestas.

Agradezco al Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES) y de manera especial a mi mentor el Doctor José González Santamaría, Investigador del Departamento de Genómica y Proteómica, por brindarme la oportunidad y valioso apoyo de pertenecer a su equipo para poder crecer, superarme como profesional y aprender día con día más sobre esta hermosa carrera; gracias por su paciencia, dedicación al dirigir este proyecto, por todos los conocimientos impartidos y por haberme facilitado los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades necesarias para la realización de esta tesis.

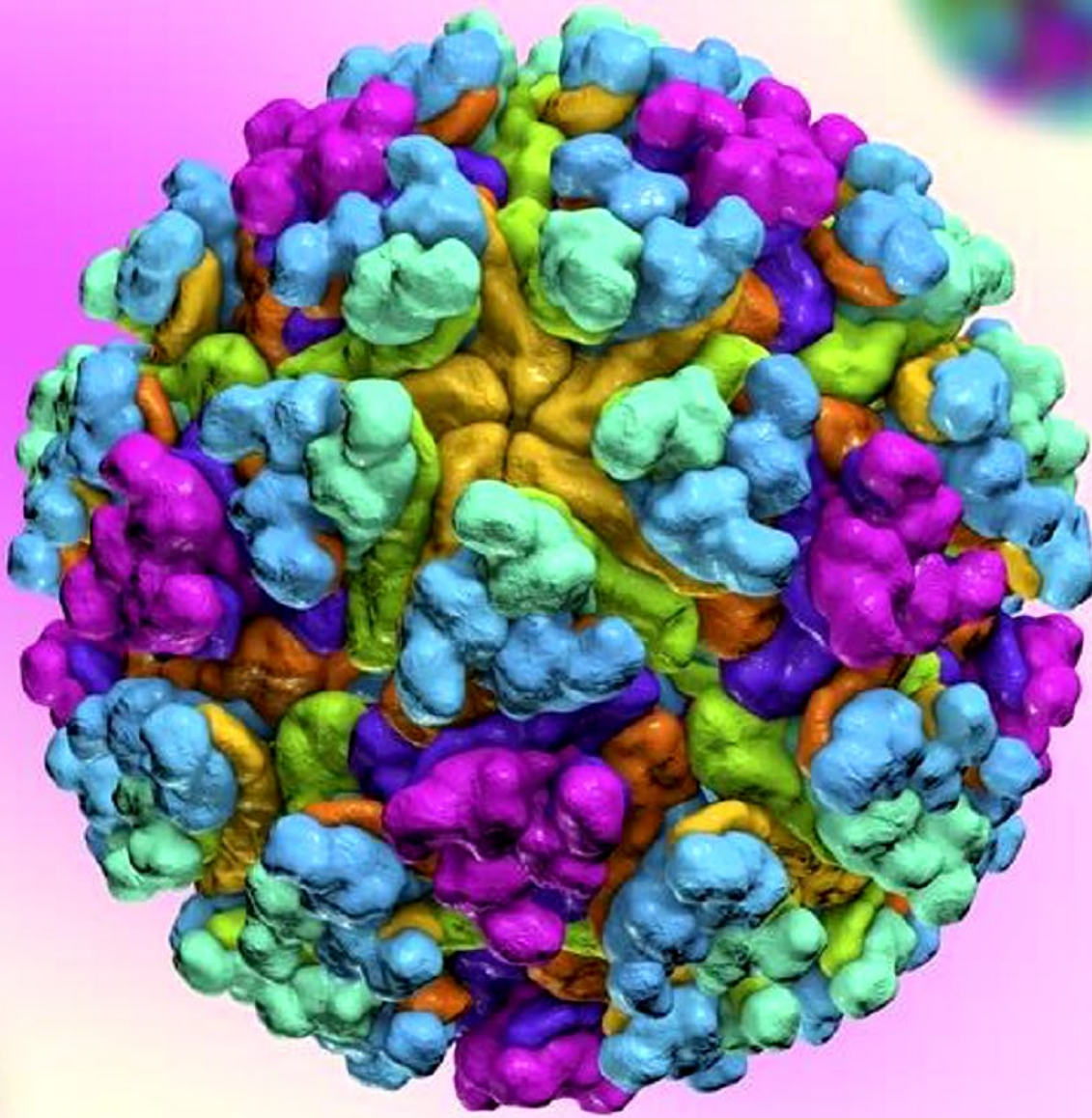
A mi grupo de investigación, por la amistad y el respaldo recibido durante estos años de trabajo. A todos los que directa e indirectamente contribuyeron con la realización de esta investigación.

Al Sistema Nacional de Investigación (SNI), a la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT) (Contrato 23-2021), Proyecto FID16-017 y al Ministerio de Economía y Finanzas (MEF) Proyecto 19911.012, por financiar este trabajo de tesis.

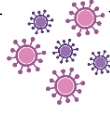
A los miembros del Comité asesor, Profesores Fermín Mejía y Humberto Cornejo, por el respaldo brindado durante el desarrollo de este estudio.

Al cuerpo docente de la Escuela de Biología, específicamente aquellos de la orientación de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Panamá, por contribuir con mi formación académica.

**“ACTIVIDAD ANTIVIRAL
DEL ÁCIDO GINKGÓLICO
CONTRA LOS VIRUS
MAYARO, UNA,
CHIKUNGUNYA Y ZIKA”**



ÍNDICE GENERAL



CONTENIDO

• Dedicatoria	IV
• Agradecimientos	V
• Índice General	VIII
• Índice de Tabla y Figuras	XI
• Abreviaturas	XIII
• Resumen	XIV
• Abstract	XVI

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

• Antecedentes.....	2
• Justificación	9
• Objetivos.....	9
○ General	9
○ Específicos	9
• Hipótesis.....	9
• Metodología.....	11

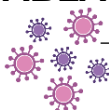
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

• 1. Introducción a las infecciones por arbovirus.....	19
• 2. Familia Togaviridae	
○ 2.1. Generalidades de los Arbovirus.....	20
○ 2.2. Distribución	21
○ 2.3. Características del Genoma.....	23
○ 2.4. Sitio de Replicación.....	24
• 2.5. Mayaro	
○ 2.5.1. Epidemiología	26
○ 2.5.2. Replicación del virus	31

○ 2.5.3. Sintomatología	32
○ 2.5.4. Diagnóstico	33
○ 2.5.5. Tratamiento	34
● 2.6. Virus Una	
○ 2.6.1. Epidemiología	35
● 2.7. Virus Chikungunya	
○ 2.7.1. Epidemiología	35
○ 2.7.2. Replicación del virus	38
○ 2.7.3. Sintomatología	41
○ 2.7.4. Diagnóstico	42
○ 2.7.5. Tratamiento	42
● 3. Familia Flaviviridae	
○ 3.1. Generalidades de los Flavivirus	44
● 3.2. Virus Zika	
○ 3.2.1. Epidemiología	45
○ 3.2.2. Replicación del virus	48
○ 3.3.3. Sintomatología	49
○ 3.3.4. Diagnóstico	51
○ 3.3.5. Tratamiento	51
● 4. Impacto sobre las arbovirosis causadas por mosquitos en Panamá y América.	52
● 5. Efecto antiviral de ácido ginkgólico como compuesto natural frente a las enfermedades transmitidas por artrópodos.	55
● CAPÍTULO III RESULTADOS	
● Análisis de la citotoxicidad de ácido ginkgólico en las células Vero o HeLa.	60
● Las células Vero o HeLa son susceptibles a la infección con los <i>Alfavirus</i> CHIKV, MAYV y UNAV.	61
● El ácido ginkgólico disminuye la producción de partículas virales de los arbovirus en las células Vero o HeLa.	62

•	La disminución del título de los Alfavirus se produce de forma dependiente a la concentración del ácido ginkgólico.	63
•	Efecto virucida del ácido ginkgólico contra los arbovirus.....	64
•	El ácido ginkgólico interrumpe una etapa temprana del ciclo de replicación del alfavirus.	65
•	La inhibición de CHIKV, MAYV y UNAV con ácido ginkgólico disminuyó la síntesis de las proteínas E1 y NSP1.	67
•	El ácido ginkgólico también bloquea la replicación del virus del Zika. ...	68
•	CAPÍTULO IV DISCUSIÓN	72
•	CAPÍTULO V CONCLUSIÓN	77
•	CAPÍTULO VI BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS	80

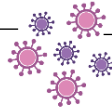
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS



• <u>Tabla 1.</u> Datos epidemiológicos sobre la circulación de Mayaro en América.	29
• <u>Figura1.</u> Diagrama mostrando las principales familias de arbovirus con miembros patógenos de humanos.....	20
• <u>Figura 2.</u> Países donde se ha identificado transmisión del virus Mayaro.	22
• <u>Figura 3.</u> Estructura general de los Alfavirus y su envoltura.....	23
• <u>Figura 4.</u> Esquema del genoma de los Alfavirus.....	25
• <u>Figura 5.</u> Resumen esquemático de los resultados filogenéticos, donde se identifican dos genotipos del virus Mayaro y el virus Una como referencia. ...	26
• <u>Figura 6.</u> Filogenia de los Alfavirus.	30
• <u>Figura 7.</u> Diagrama de sintomatología de Mayaro en humanos.	33
• <u>Figura 8.</u> Origen y propagación más probable de Chikungunya antes de llegar a América.	37
• <u>Figura 9.</u> Proceso de replicación de virus Chikungunya en una célula huésped.	40
• <u>Figura10.</u> Síntomas causados por el virus Chikungunya.	41
• <u>Figura 11.</u> Distribución de infección por Zika en humanos.	46
• <u>Figura 12.</u> Árbol filogenético del virus Zika que muestra los linajes africanos y asiáticos, incluidas las cepas que surgieron recientemente en el Pacífico y Brasil.	47
• <u>Figura 13.</u> Sintomatología producida por el virus Zika.	50
• <u>Figura 14.</u> Bebé con microcefalia y Bebé con cabeza normal.	50

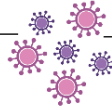
• <u>Figura 15.</u> Casos sospechosos y confirmados de dengue, chikungunya y Zika en Panamá.	54
• <u>Figura 16.</u> Planta de Ginkgo biloba.	57
• <u>Figura 17.</u> Estructura química de los compuestos que forman parte de Ginkgo biloba.	58
• <u>Figura 18.</u> Efecto del inhibidor en las células para evaluar su citotoxicidad.	60
• <u>Figura 19.</u> El ácido ginkgólico inhibe la producción de progenie viral por CHIKV, MAYV y UNA.	62
• <u>Figura 20.</u> Efecto del fármaco ácido ginkgólico en la replicación de CHIKV, MAYV y UNAV.	63
• <u>Figura 21.</u> El efecto del fármaco reduce la producción de la progenie de una manera dependiente a la concentración.	64
• <u>Figura 22.</u> El ácido ginkgólico altera la infectividad de las partículas de Alfavirus.	65
• <u>Figura 23.</u> El ácido ginkgólico reduce la replicación del arbovirus en una etapa temprana del ciclo viral.	66
• <u>Figura 24.</u> El ácido ginkgólico afecta a la expresión de las proteínas de los Alfavirus.	68
• <u>Figura 25.</u> El ácido ginkgólico también inhibe la replicación del virus del Zika.	70

ABREVIATURAS



•	MAYV	VIRUS MAYARO
•	UNAV	VIRUS UNA
•	CHIKV	VIRUS CHIKUNGUNYA
•	ZIKV	VIRUS ZIKA
•	VEEV	VIRUS ENCEFALITIS EQUINA DEL ESTE
•	WEEV	VIRUS ENCEFALITIS EQUINA OCCIDENTAL
•	DENV	VIRUS DENGUE
•	VERO	CÉLULAS DE RIÑÓN DE MONO VERDE AFRICANO
•	VERO-E6	CÉLULAS DE RIÑÓN DE MONO VERDE AFRICANO
•	HELA	CÉLULAS DE CANCER CÉRVICO-UTERINO
•	MOI	MULTIPLICIDAD DE INFECCIÓN
•	MEM	MEDIO ESENCIAL MÍNIMO
•	OMS	ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD

RESUMEN



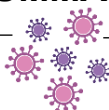
En Panamá, los *Alfavirus* Mayaro (MAYV), Una (UNAV), Chikungunya (CHIKV) y el *Flavivirus* Zika (ZIKV), causan enfermedades que continúan siendo un problema de salud pública prioritario, ya que son los responsables de importantes brotes epidémicos en la población.

A pesar de los avances realizados en el campo científico en cuanto a el conocimiento de sus reservorios, fuentes de infección, mecanismos de transmisión y agentes etiológicos, una de las problemáticas que enfrentamos hoy día es que no contamos con tratamientos o vacunas para el control de las enfermedades causadas por estos arbovirus. En este sentido, existe la necesidad de descubrir nuevos fármacos antivirales que posibiliten la adopción de nuevas medidas de control que, junto al desarrollo científico y técnico, nos ayuden a contrarrestar el impacto de estos brotes en nuestra población.

Los productos naturales son una rica fuente de compuestos con distintas actividades biológicas, entre ellas, propiedades antivirales. Por su mecanismo de acción, los compuestos naturales pueden interferir en alguna de las fases de la infección y replicación de los virus. Por lo tanto, el principal objetivo de esta investigación era estudiar la posible actividad antiviral del ácido ginkgólico contra los arbovirus MAYV, UNAV, CHIKV y ZIKV. La producción de progenie viral en sobrenadantes a partir de células tratadas o no tratadas con ácido ginkgólico se cuantificó mediante el ensayo de formación de placa. También se determinó la

actividad virucida del ácido ginkgólico contra estos virus. Además, la expresión de proteínas virales se evaluó utilizando la técnica de Western blot e inmunofluorescencia. Nuestros resultados revelan que el ácido ginkgólico promueve una disminución dependiente de la dosis de los títulos virales en todos los virus probados. Además, el compuesto demostró una fuerte actividad virucida. Finalmente, descubrimos que la expresión de las proteínas virales se veía afectada por el tratamiento con este fármaco. Estos resultados colectivamente, sugieren que el ácido ginkgólico podría tener una actividad antiviral de amplio espectro y constituyen una posible alternativa para el tratamiento de las enfermedades causadas por estos arbovirus.

SUMMARY



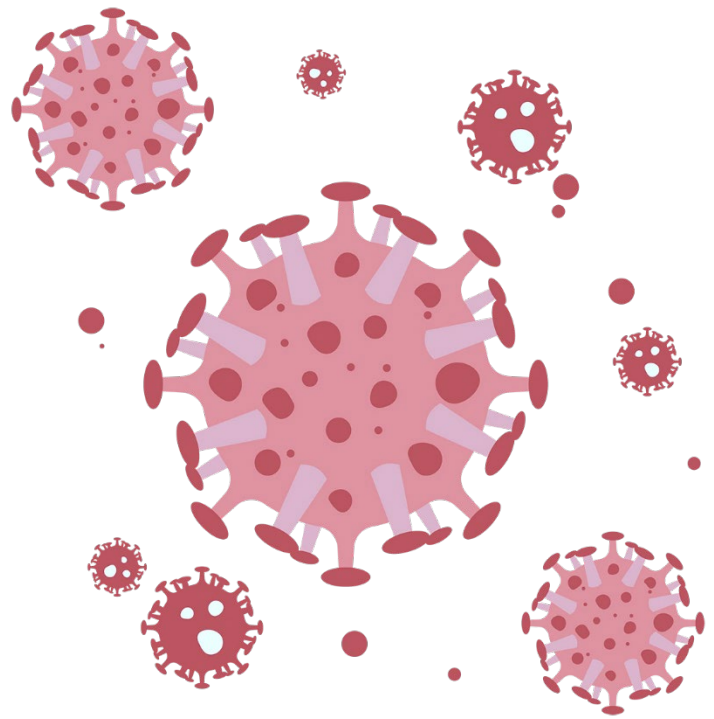
In Panama, the alphaviruses Mayaro (MAYV) Una (UNAV) Chikungunya (CHIKV) and the flavivirus Zika (ZIKV), cause diseases that continue to be a priority public health problem since they are responsible for important epidemic outbreaks in the population.

Despite the progress made in the scientific field in terms of knowledge of their reservoirs, sources of infection, transmission mechanisms and etiological agents, one of the problems we face today is that we currently do not have treatments or vaccines for the control of diseases caused by these arboviruses, so there is a great need to discover new antiviral drugs that at the same time enable the adoption of new control measures that together with economic, scientific and technical development will help us to counteract the impact of these outbreaks in our population.

Nowadays, many natural products have antiviral activities, due to their mechanism of action they interfere in some of the phases of infection and replication of these viruses since they have a rich source of compounds with different biological activities. Therefore, the main objective of this research was to study the possible antiviral activity of ginkgolic acid against MAYV, UNAV, CHIKV and ZIKV arboviruses. The production of viral progeny in supernatants from Ginkgolic acid

treated or untreated cells was quantified by plaque formation assay. The virucidal activity of ginkgolic acid against these viruses was also determined. In addition, viral protein expression was evaluated using Western blotting and immunofluorescence. Our results reveal that ginkgolic acid promotes a dose-dependent decrease of viral titers in all viruses tested. In addition, the compound demonstrated strong virucidal activity.

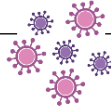
Finally, we found that viral protein expression was affected by treatment with this drug. All these results collectively are of great significance as they suggest that ginkgolic acid may have broader antiviral activity and constitute an important approach to reduce diseases caused by these arboviruses.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN



• Antecedentes

Los arbovirus son virus transmitidos por artrópodos, entre ellos, Mayaro (MAYV), Una (UNAV) y Chikungunya (CHIKV), que pertenecen al género *Alfavirus*, familia *Togaviridae*, sin embargo, Zika (ZIKV) pertenece al género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*. Los arbovirus son transmitidos por mosquitos del género *Aedes*, *Culex*, *Haemagogus*, entre otros (Pando et al., 2020). Los alfavirus pueden clasificarse como virus del Viejo o del Nuevo Mundo, de acuerdo a su distribución geográfica. Por otro lado, dentro de los flavivirus se destacan aquellos virus transmitidos por mosquitos como Dengue (DENV), virus del Nilo Occidental (WNV) y el virus de la Fiebre Amarilla (YFV), que generalmente están asociados con enfermedades febriles con síndromes hemorrágicos o neurológicos, respectivamente (Laureti et al., 2018). No obstante, el virus Mayaro (MAYV) es un alfavirus artrálgico del Nuevo Mundo, cuyo genoma es una molécula de ARN de cadena sencilla de sentido positivo. Este virus se aisló por primera vez en la isla caribeña de Trinidad y Tobago en 1954 (Muñoz & Navarro, 2012), y es uno de los virus que forma parte del complejo de virus Semliki Forest (Ludert et al., 2017) que incluye otros virus de gran relevancia en salud pública, entre ellos, los virus Ross River, Una, Getah, Bebaru, O'nyong-nyong, Semliki Forest y CHIKV (Esposito & Fonseca, 2017). El ciclo de

transmisión de MAYV se parece mucho al de la fiebre amarilla y se cree que ocurre principalmente a través de mosquitos vectores, especialmente los del género *Haemagogus*. Este género de mosquitos vive en un hábitat selvático, en bosques tropicales lluviosos, en la cercanía del dosel arbóreo, sus hábitos de alimentación son diurnos, las hembras ponen huevecillos en huecos de árboles y troncos, pero también pueden utilizar recipientes artificiales como llantas, latas, botellas, entre otros, que acumulan agua en zonas rurales y periurbanas. Estos mosquitos han coincidido temporal y espacialmente con el nicho de los monos, su principal fuente de ingestión sanguínea (Bogotá-sierra et al., 2017). Por otro lado, se ha sugerido que varias especies de *Aedes* (*Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*) también podrían ser potenciales vectores de MAYV (Rey & Lounibos, 2015).

Los reservorios naturales de MAYV son los vertebrados silvestres, sobre todo primates no humanos, aves y reptiles (Esposito & Fonseca, 2017). No obstante, un estudio mostró que había infección por este virus en sueros recolectados durante la construcción del canal de Panamá que tuvo lugar entre 1904 y 1914 (Srihongse et al., 1973) (Anderson et al., 1957). Desde entonces se notificaron casos en América Central y América del Sur, en particular en las regiones alrededor de la cuenca amazónica (J. C. Navarro et al., 2013). Posterior a los casos ocurridos en Trinidad y Tobago, se reportaron casos de la enfermedad en Brasil (1955), Colombia (1958-1960), Bolivia (1959), Suriname (1964), Perú (1965), Estados Unidos de América (casos importados de Perú y Bolivia, 1997), Ecuador (1997), Guayana Francesa (1998), Venezuela (2000), México (2001), Panamá (2010) y Haití (2015) (Torres et al., 2004) (Acosta-Ampudia et al., 2018). Aunque algunos estudios sugieren la posibilidad de transmisión en área urbana (Muñoz & Navarro, 2012), los brotes

descritos en la última década en las Américas se reportaron en residentes de las comunidades rurales de la región amazónica de Brasil, Bolivia, Perú y Venezuela. La mayoría de los casos humanos ocurrieron en personas que trabajan o residen en los bosques tropicales húmedos.

El genoma de MAYV es una molécula de ARN de cadena positiva de ~ 11.5 kb de longitud, que contiene dos marcos de lectura abierto (ORF). El ORF proximal al extremo 5' codifica para las proteínas no estructurales, mientras que el ORF proximal al extremo 3' codifica para las proteínas estructurales. Las proteínas no estructurales se traducen directamente del ARN genómico en una poliproteína, que es procesada proteolíticamente en las cuatro proteínas no estructurales (nsP1-nsP4). Las proteínas estructurales se traducen a partir de un ARN subgenómico (ARN 26S), codificando así una poliproteína que da lugar a las proteínas: cápside (C), E1, E2, E3 y 6K (Shirako & Strauss, 1994).

La entrada del virus en la célula hospedadora es mediada por receptores y ocurre mediante un proceso de endocitosis, posteriormente la envoltura vírica se fusiona con la membrana del endosoma, una reacción que es mediada por E1 y que depende de un proceso de acidificación de vesículas; estas alteraciones en el pH y los cambios en la concentración iónica intracelular propician la replicación viral. Estas reacciones permiten la liberación de la nucleocápside que, al perderla, libera el genoma viral al citoplasma celular (Muñoz & Navarro, 2012). Una vez en el citoplasma, el genoma del alfavirus se une a los ribosomas para sintetizar las proteínas no estructurales.

MAYV en los primeros días de la infección, presenta un cuadro clínico similar al de otros arbovirus: fiebre, dolor de cabeza, mialgia, dolor ocular, escalofríos,

fuerte artralgia, mareos, náuseas, erupción cutánea principalmente en el pecho, las piernas, la espalda, los brazos y con menor frecuencia en la cara, dolor abdominal. El curso de la enfermedad es autolimitado, con una duración de 3 a 5 días, quedando como una secuela importante las artralgias, que pueden permanecer semanas o meses (Valdés, 2016) (Torres et al., 2004) (P. Navarro et al., 2016).

UNAV es otro *Alfavirus* del nuevo mundo, perteneciente a la familia *Togaviridae*, al igual que Mayaro forma parte del complejo Semliki Forest (SFV) (A. M. Powers et al., 2006a). Se aisló por primera vez de los mosquitos *Psorophora ferox* en el estado de Pará, Brasil, Venezuela, Surinam y Panamá (Galindo et al., 1966) (CAUSEY et al., 1963) (Peralta & Shelokov, 1966) (Walder et al., 1984). UNAV se ha detectado en bajos niveles en estudios epidemiológicos (Powers et al., 2006).

Chikungunya (CHIKV) al igual que UNAV y MAYV es un arbovirus de la familia *Togaviridae* fue aislado por primera vez durante un brote en Tanzania en 1952, desde entonces ha generado enormes brotes de importancia epidemiológica (Acosta-Reyes et al., 2015). El genoma de CHIKV está formado por ARN monocatenario de polaridad positiva y codifica 4 proteínas no estructurales (NSP1 a NSP4) y 3 proteínas estructurales (C, E1 y C2) (Simizu et al., 1984), este virus se transmite principalmente por la picadura del mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, las mismas especies involucradas en la transmisión del dengue (Acosta-Reyes et al., 2015), por lo que la enfermedad inicia de 3 a 7 días después de la picadura del mosquito infectado y puede durar el mismo tiempo en la fase aguda (Metz et al., 2011). Hasta el momento, se han identificado tres linajes de este

arbovirus con diferentes características genotípicas y antigénicas: el linaje de África oriental, central y sudafricana (ECSA), el linaje de África occidental y el linaje asiático que es el agente causal de la epidemia en América (Silva & Dermody, 2017). La enfermedad provocada por CHIKV comparte muchas similitudes con las enfermedades causadas por otros alfavirus como MAYV y UNAV, ya que incluyen síntomas similares como fiebre, acompañada de dolor muscular, dolor de cabeza, náuseas, cansancio y erupciones cutáneas. La mayoría de los pacientes se recuperan completamente, pero en algunos casos los dolores en las articulaciones pueden durar varios meses, o incluso años después de la culminación de la infección (Acosta-Reyes et al., 2015). Los humanos son el reservorio principal de este alfavirus al igual que diversos vertebrados durante los períodos epidémicos, incluyendo primates no humanos, roedores, aves y algunos mamíferos pequeños (Pialoux et al., 2007).

La ocurrencia de coinfecciones entre dengue y CHIKV en seres humanos ha ocurrido en pacientes que habitan en áreas endémicas para ambos virus (Aguilar et al., 2020). Hasta la fecha, se han desarrollado diferentes vacunas, pero ninguna ha sido aprobada para su uso. Esto puede suceder por varios factores como la falta de validación de un buen modelo animal para su prueba, determinación de la dosis y posible interferencia con otras vacunaciones virales, y por último y más importante, el costo del desarrollo, pues el virus afecta en su mayoría regiones geográficas que no pertenecen al mundo desarrollado (Silva & Dermody, 2017).

Zika (ZIKV) pertenece a la familia *Flaviviridae* y se transmite principalmente a través de la picadura de mosquitos del género *Aedes* (Laureti et al., 2018). Su

pariente más cercano es el virus Spondweni (Haddow et al., 2016), el único otro miembro de su clado. ZIKV fue aislado por primera vez en 1947 en el bosque de Zika, en Uganda (África) durante un estudio sobre la transmisión de la fiebre amarilla selvática. Desde entonces, se ha encontrado principalmente en África y ha generado pequeños brotes esporádicos también en Asia que han ido en aumento y afectando a la población (Gonzales Collantes, 2017). Los análisis filogenéticos demuestran que existen dos linajes de este flavivirus (el linaje africano y el linaje asiático), el brote en Latinoamérica estaba relacionado con este último proveniente de Brasil (Cabezas & García, 2017) .

ZIKV es un virus de ARN de cadena positiva con un genoma viral que codifica para tres proteínas estructurales y siete no estructurales que son necesarias para la replicación y el ensamblaje del virus (Sirohi & Kuhn, 2017). La infección por este flavivirus generalmente no causa síntomas o es solo una enfermedad leve autolimitada, estos síntomas pueden manifestarse de manera moderada o aguda después de un periodo de incubación de 3 a 12 días como fiebre, dolor de cabeza, dolor muscular, articulaciones y sarpullido (Espinoza, 2017), y otros más severos como problemas neurológicos, el síndrome de Guillain-Barré (Morabito & Graham, 2017). Además de la transmisión por sus mosquitos vectores; se puede transmitir de una persona a otra a través del contacto sexual y en algunos casos el virus puede contraerse mediante transfusiones de sangre (Pielnaa et al., 2020) o en la donación de órganos o durante el embarazo aumentando el riesgo de defectos en el nacimiento de los neonatos como una afección cerebral potencialmente mortal denominada microcefalia (Coronell et al., 2016). A pesar de que estos arbovirus son considerados patógenos emergentes, no existen tratamientos o vacunas para

combatir estas infecciones. La identificación de los receptores de entrada del flavivirus, en particular los involucrados en la infección del sistema nervioso central, podrían conducir a la identificación de nuevas dianas terapéuticas.

Las moléculas antivirales ejercen su acción inhibiendo ya sea la entrada del virus, bloqueando enzimas importantes en la replicación o ensamblaje viral, así como la salida del virus en la célula (Romero et al., 2016). Durante los últimos 10 a 15 años, el desarrollo de fármacos antivirales han ido en aumento de manera progresiva y han sido cada vez más eficaces (Arredondo-García et al., 2016), Muchos antivirales por su mecanismo de acción interfieren en alguna de las fases de la infección y la replicación de los virus; otros, como interferones y citoquinas, incitan acciones antiproliferativas en la célula huésped (Romero et al., 2016). La clasificación de los inhibidores se puede realizar por su mecanismo de acción o su perfil de actividad. La eficacia de estos compuestos depende, entre otras cosas, de obtener concentraciones inhibitorias en el sitio de la infección (Romero et al., 2016).

Debido al impacto de los virus en los sistemas de salud de la región y la necesidad de encontrar nuevos medicamentos antivirales, este proyecto propone analizar el efecto del compuesto ácido ginkgólico sobre la replicación de los virus Mayaro, Una, Chikungunya y Zika. El ácido ginkgólico es un compuesto natural aislado de las cubiertas de las semillas u hojas de *Ginkgo biloba*, una planta que se utiliza ampliamente en la medicina tradicional china (Van Beek & Wintermans, 2001). Informes anteriores han demostrado que el ácido ginkgólico tiene actividad antitumoral (Qiao et al., 2017) (Ma et al., 2015), antibacteriana (Hua et al., 2017) y antiparasitaria (Chen et al., 2008) así como actividad antiviral contra el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Lü et al., 2012). No obstante, la capacidad del

ácido ginkgólico para afectar la replicación de estos arbovirus permanece sin explorar.

• **Justificación**

Los virus son patógenos obligados que secuestran la maquinaria celular del huésped que infectan para replicarse eficientemente. MAYV, UNAV, CHIKV y ZIKV son virus emergentes o reemergentes poco estudiados y con un potencial de causar epidemias a mayor escala. No obstante, hay muy poco conocimiento sobre la patogénesis de la infección causada por estos virus y no existen vacunas o tratamientos específicos aprobados. Debido a la amenaza para la salud pública global que representan los virus emergentes, es de suma importancia la identificación de potenciales moléculas antivirales que permitan combatir estas infecciones.

• **Objetivos:**

General

- Analizar el efecto del compuesto natural ácido ginkgólico sobre la replicación de los virus MAYV, UNAV, CHIKV y ZIKV.

Específicos

- Análizar la toxicidad del compuesto ácido ginkgólico en células HeLa o Vero.
- Evaluar el efecto del compuesto ácido ginkgólico en la producción de partículas virales de estos arbovirus.

- Llevar a cabo un análisis de dosis respuesta del ácido ginkgólico en células infectadas con los distintos arbovirus.
- Determinar en qué etapa estos inhibidores afectan la replicación de estos alfavirus y flavivirus.
- Evaluar el efecto de los inhibidores sobre la síntesis de proteínas virales.

- **Hipótesis**

- El tratamiento con el compuesto ácido ginkgólico afectan la replicación de MAYV, UNAV, CHIKV y ZIKV.

• Metodología

○ Cultivo de células y propagación de cepas virales

Los experimentos fueron realizados en las líneas celulares Vero (CCL-81), Vero-E6 (CRL-1586, ambas obtenidas de ATCC, Manassas, VA, EE. UU.) y HeLa (donada por la Dra. Carmen Rivas del Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas, España). Las células fueron cultivadas en medio esencial mínimo de Eagle (MEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 %, 200 μ M de L-Glutamina y 10,000 U/ml de Penicilina-Estreptomicina (medio MEM completo) (todos de GIBCO, Estados Unidos) en un frasco de 75 cm², incubadas a 37° C en una atmosfera humidificada con 5% de CO₂ durante 24 horas. Al día siguiente, se cambió el medio de cultivo y cuando las células alcanzaron su confluencia, fueron tratadas con 1.5 ml de 0.25 % de tripsina-EDTA, se realizaron pasajes a frascos de cultivo de 75 cm² para su mantenimiento y a platos de 6, 12, 24 y 96 pocillos para realizar los diversos experimentos. Para llevar a cabo estos experimentos, se utilizaron las cepas ARV0565 del virus Mayaro (MAYV) proveniente de Perú (A. M. Powers et al., 2006b) y BT-1495-3 del virus Una (UNAV), proveniente de la provincia de Bocas del Toro, Panamá (Galindo et al., 1966). Las cepas fueron proporcionadas por el doctor Robert Tesh y Scott Weaver del Centro de Referencia Mundial de Virus y Arbovirus Emergentes (WRCEVA) de la Universidad de Texas (UTMB, Estados Unidos). Las cepas de Chikungunya (CHIKV, Panama_256137_2014) (Carrera et al., 2017) y Zika (ZIKV, 259249) se

aislaron del suero de pacientes durante los brotes de Chikungunya y Zika en Panamá en 2014 y 2015, respectivamente. Los virus se propagaron en células Vero-E6 en frascos de 175 cm². Las células se infectaron con los virus a una multiplicidad de infección (MOI) de 1 durante 1 hora. Después, se retiró el medio de infección y se agregó medio MEM suplementado con 2% de SFB. Las células infectadas se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 3 días. Tras ese período, se colectó el sobrenadante o medio de cultivo, se centrifugó en tubos AMICON para concentrar los virus, que fueron alicuotados en crioviales y congelados a -80 °C hasta su uso. El título viral de cada cepa se determinó mediante el ensayo de formación de placas y tinción con violeta cristal en células Vero-E6. El título de las cepas se representó como unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml).

- **Preparación del ácido ginkgólico**

El compuesto ácido ginkgólico se obtuvo de Sigma-Aldrich (Estados Unidos). Este compuesto se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 10µM y se almacenó en alícuotas a – 20 °C hasta su uso. Se prepararon soluciones de trabajo de ácido ginkgólico en MEM a las concentraciones indicadas.

- **Determinación de la viabilidad celular**

Para determinar la citotoxicidad del compuesto ácido ginkgólico, se llevó a cabo el ensayo de reducción del compuesto MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-difeniltetrazol). Este ensayo se basa en la actividad metabólica de la enzima succinato deshidrogena que convierte el MTT (de color amarillo y soluble en agua) a formazán un compuesto insoluble en agua y de color violeta. Para ello, colocamos aproximadamente 25,000 células HeLa o Vero en platos de 96 pocillos en medio

MEM completo y se incubaron a 37°C durante 24 horas para su adherencia. A continuación, se preparó una solución del compuesto a concentraciones crecientes en medio MEM 1X sin rojo fenol. Como control negativo se usó medio MEM solo sin rojo fenol. Después, añadimos 100 µl de las soluciones de los compuestos a cada pocillo y se incubaron durante 24 o 48 horas. Tras ese período, se añadió 50 µl de MTT a una concentración de 5 mg/ml a los pocillos con las células y se incubó durante 4 horas a 37°C para la formación de los cristales de formazán. Posteriormente, añadimos 100 µl del solvente MTT (10% SDS, 0.1M HCL en H₂O) y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 570 nm como se ha realizado previamente (Llamas-González et al., 2019).

- **Cuantificación de la producción de partículas virales**

Para cuantificar la producción de partículas virales, utilizamos la técnica de formación de placas y tinción con violeta cristal. Para ello, se realizamos diluciones seriadas 1:10 (desde 10⁻¹ a 10⁻⁸) de los cultivos de los virus, los sobrenadantes de células control o tratadas con el compuesto a las concentraciones indicadas e infectadas con MAYV, UNAV, CHIKV y ZIKV. De estas diluciones, se usaron 500 µl para infectar en duplicado células Vero-E6, crecidas en platos de 6 pocillos con una confluencia de alrededor de un 70 a 80 %. Después de una hora de absorción del virus y tras retirar el inóculo, se añadió a cada pocillo una solución de medio MEM 2X con 4% de SFB y agarosa al 2 % en una relación 1:1, se dejó solidificar la mezcla de medio-agarosa y los platos se incubaron a 37°C durante 3 días. A continuación, las células se fijaron con formaldehído al 10 % durante 30 minutos, luego se retiró el formaldehído y el agar cuidadosamente con ayuda de una espátula; y las células

fueron teñidas con una solución de violeta cristal durante 5 minutos. Después, se retiró el violeta cristal y los platos se lavaron con agua del grifo, se dejaron secando y se contó el número de placas presentes en cada pocillo. Para calcular el título viral, utilizamos la siguiente fórmula:

$$\text{Título viral (UFP/ml)} = \frac{\text{No de placas} \times \text{dilución} \times \text{volumen de dilución (1200 } \mu\text{l)}}{\text{Volumen de infección (500 } \mu\text{l)}}$$

El título viral se representó como el logaritmo de base 10 de las unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml) (Llamas-González et al., 2019).

- **Análisis de proteínas mediante inmunoblot**

Células HeLa o Vero fueron tratadas o no con el compuesto a una concentración de 10 μ M en medio MEM suplementado con 2 % de SFB durante una hora. Después, se procedió a retirar el compuesto y se infectaron las células con MAYV o UNAV a una MOI de 10 o CHIKV a una MOI de 1 y las mismas, se incubaron a 37°C durante una hora. Después, retiramos los virus y agregamos medio MEM con 2 % de SFB y los compuestos a la concentración previamente indicada. Como control se usó medio MEM con 2 % de SFB. A continuación, a distintos tiempos las células fueron lisadas en tampón de carga de proteínas Laemmli con 10 % de β -Mercaptoetanol (Bio-Rad, Estados Unidos). Las proteínas se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y después, la misma cantidad de proteína fue separada en geles de poliacrilamida-SDS al 10 % (PAGE-SDS, Bio-Rad, Estados Unidos) en tampón de electroforesis (99.8% Tris-Base; Glicina, 20% SDS; pH 8.3), transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Estados Unidos) en tampón de transferencia (99.8% Tris-Base, Glicina, H₂O) y bloqueadas durante 30 minutos con una solución de leche desnatada al 5 % en tampón T-TBS (10 mM de Tris base, pH 7.4; 150 mM de NaCl y 0.05 % de Tween 20), como se ha realizado previamente (González-Santamaría et al., 2011). Las membranas fueron después incubadas durante 24 horas a 4 °C con los siguientes anticuerpos, preparados en la solución de leche desnatada al 5 % en tampón T-TBS: anti-E1 (1:1000), anti-nsP1 (1:1000), ambos diseñados, generados y validados en nuestro laboratorio (Llamas-González et al., 2019), o GAPDH (1:5000) (Cell Signaling Technology, Estados Unidos). Posteriormente, las membranas fueron lavadas en tampón T-TBS durante 30

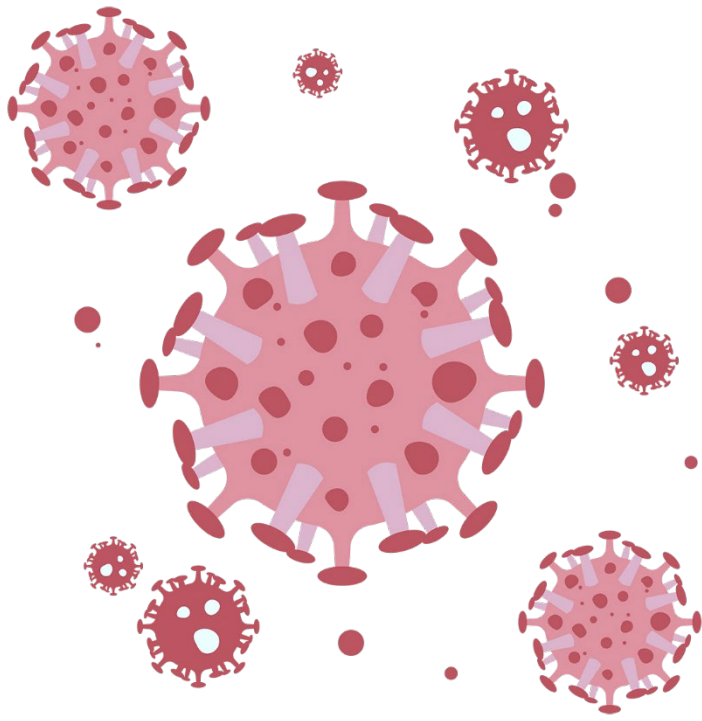
minutos e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG-HRP de conejo (1:3000), diluido en solución de leche desnatada al 5%. Finalmente, las membranas fueron colocadas en solución ECL (Cell Signaling Technology, Estados Unidos) durante 5 minutos y la señal de quimioluminiscencia fue detectada mediante un escáner C-Digit (González-Santamaría et al., 2011) (LI-COR, Estados Unidos).

- **Análisis de inmunofluorescencia y microscopía confocal**

Células HeLa fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio y se infectaron con MAYV, UNAV y CHIKV a una multiplicidad de infección (MOI) de 10. A las 24 h después de la infección, las células se fijaron en paraformaldehído al 2% durante 20 minutos y se permeabilizaron con Triton-X100 al 0.25%. Luego, las células se incubaron en una solución de albúmina de suero bovino al 2% en PBS durante 20 minutos y fueron teñidas durante la noche a 4°C con un anticuerpo anti-MAYV, anti-UNAV, anti-CHIKV de fluido ascítico inmune de ratón (amablemente proporcionado por el Dr. Scott Weaver, WRCEVA, UTMB, EE. UU.). Finalmente, las células se lavaron con tampón PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón, conjugado Alexa-Flour 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), durante una hora en la oscuridad. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con Prolong Diamond Antifade Mountant con Dapi (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), y las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal Flowview FV1000 (Olympus, Lombard, IL, EE. UU.). El número de células positivas para MAYV, UNAV y CHIKV se contaron en al menos 10 campos y se representaron como el porcentaje de células positivas.

- **Análisis estadístico**

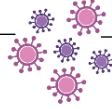
Los datos experimentales de los grupos control y tratado, se analizaron con la prueba de Mann & Whitney, ANOVA unidireccional y ANOVA bidireccional utilizando el software GraphPad Prism versión 7 para Mac. Todos los experimentos se realizarán al menos 3 veces. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.



CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

MARCO TEÓRICO



1. Introducción a las infecciones por arbovirus

Durante las últimas décadas el número de epidemias causadas por arbovirus emergentes y reemergentes ha ido en aumento. Estas infecciones han sido causadas por virus considerados controlados o de poca importancia, pero la introducción de estos, a nuevas áreas geográficas han contribuido a la aparición de brotes importantes.

Los arbovirus son como lo describió la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1967, virus con genoma de ARN de cadena simple, transmitidos por artrópodos hematófagos, de ahí su nombre del inglés “Arthropod-Borne Viruses” o “virus transmitidos por artrópodos” (Shirako & Strauss, 1994). Los arbovirus son un grupo taxonómicamente variado ya que están conformados por más de 500 especies, de los cuales 150 pueden causar enfermedad en el ser humano, los mismos se dividen en 3 familias principalmente: *Flaviviridae*, *Togaviridae* y *Bunyaviridae* (Ver Figura 1). (Arredondo-García et al., 2016).

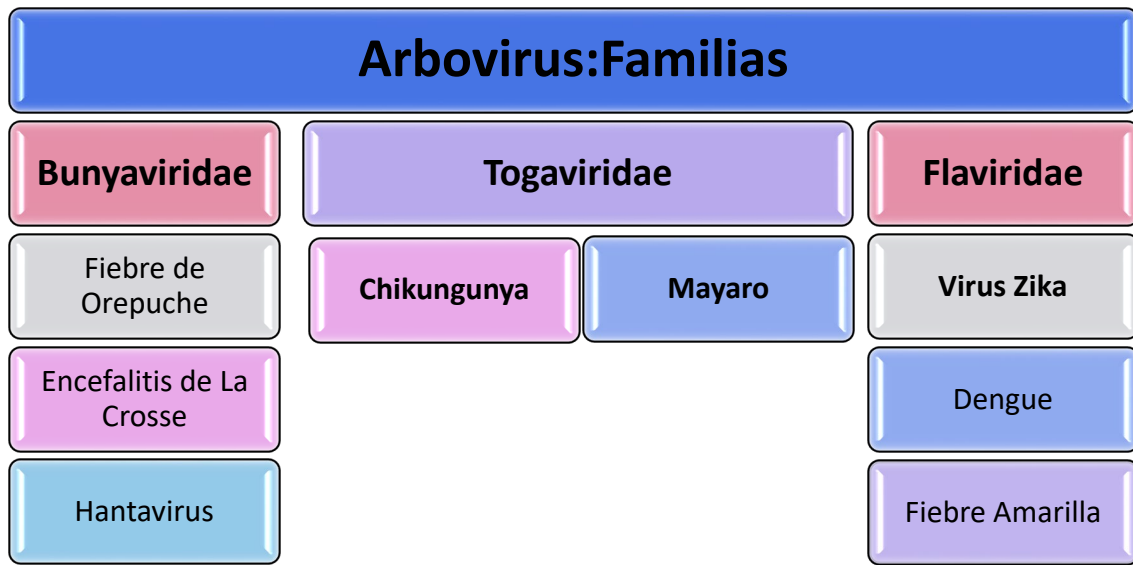


Figura 1. Diagrama mostrando las principales familias de arbovirus con miembros patógenos de humanos (Navarrete-espinoza & Gómez-dantés, 2006).

Estos arbovirus son transmitidos por una gran cantidad de vectores como mosquitos, garrapatas y pulgas entre otros (Arredondo-García et al., 2016). En esta tesis nos enfocaremos en aquellos arbovirus transmitidos por mosquitos como los alfavirus Mayaro (MAYV), Una (UNAV), Chikungunya (CHIKV) y el flavivirus Zika (ZIKV), que afectan predominantemente al hombre.

2. Familia Togaviridae

2.1. Generalidades de los alfavirus

Los alfavirus son un grupo de virus de ARN monocatenario con polaridad positiva, estos se encuentran dentro de la familia *Togaviridae*. Existen diversas especies de alfavirus que pueden provocar enfermedades en el ser humano y otros animales vertebrados, tales como caballos, roedores, peces y aves.

Estos se agrupan por la similitud en sus características genéticas y estructurales; pero difieren en la variedad de síndromes y enfermedades que provocan en humanos y animales experimentales (Forrester et al., 2012). Las consecuencias de una infección por alfavirus en humanos puede ir desde enfermedades febriles asintomáticas, leves, no diferenciadas, hasta una enfermedad comprometida causando poliartralgia debilitante, encefalitis y en muchas ocasiones la muerte del paciente (Smith et al., 2018).

En este momento, no hay terapias antivirales ni vacunas seguras y eficaces disponibles. La identificación de dianas para la intervención antiviral o el desarrollo de vacunas requieren una comprensión profunda de los mecanismos de replicación del virus tanto en el huésped vertebrado como en el vector (Strauss & Strauss, 1994).

2.2. Distribución

Los alfavirus terrestres se agrupan de acuerdo a su distribución geográfica, en los del Nuevo Mundo y los del Viejo Mundo, que surgieron después de múltiples introducciones y re-introducciones (Forrester et al., 2012; Levinson et al., 1990; A. N. N. M. Powers et al., 2001). Los virus del Viejo Mundo incluyen a miembros del complejo Semliki Forest Virus (SFV) como Sindbis, Ross River, O'nyong nyong y Barmah Forest incluyendo a CHIKV y los virus del Nuevo Mundo que incluyen: el virus Mayaro (MAYV) y UNA (UNAV) (Mejía & López-Vélez, 2018).

El género *Alfavirus* es endémico en todos los continentes con el rango de especies individuales confinadas a las regiones por barreras ambientales. Sin

embargo, como en el caso del reciente brote de CHIKV, estos rangos son dinámicos y las nuevas poblaciones humanas están siendo expuestas a virus y riesgo de enfermedad (Forrester et al., 2012; Weaver, 2014).

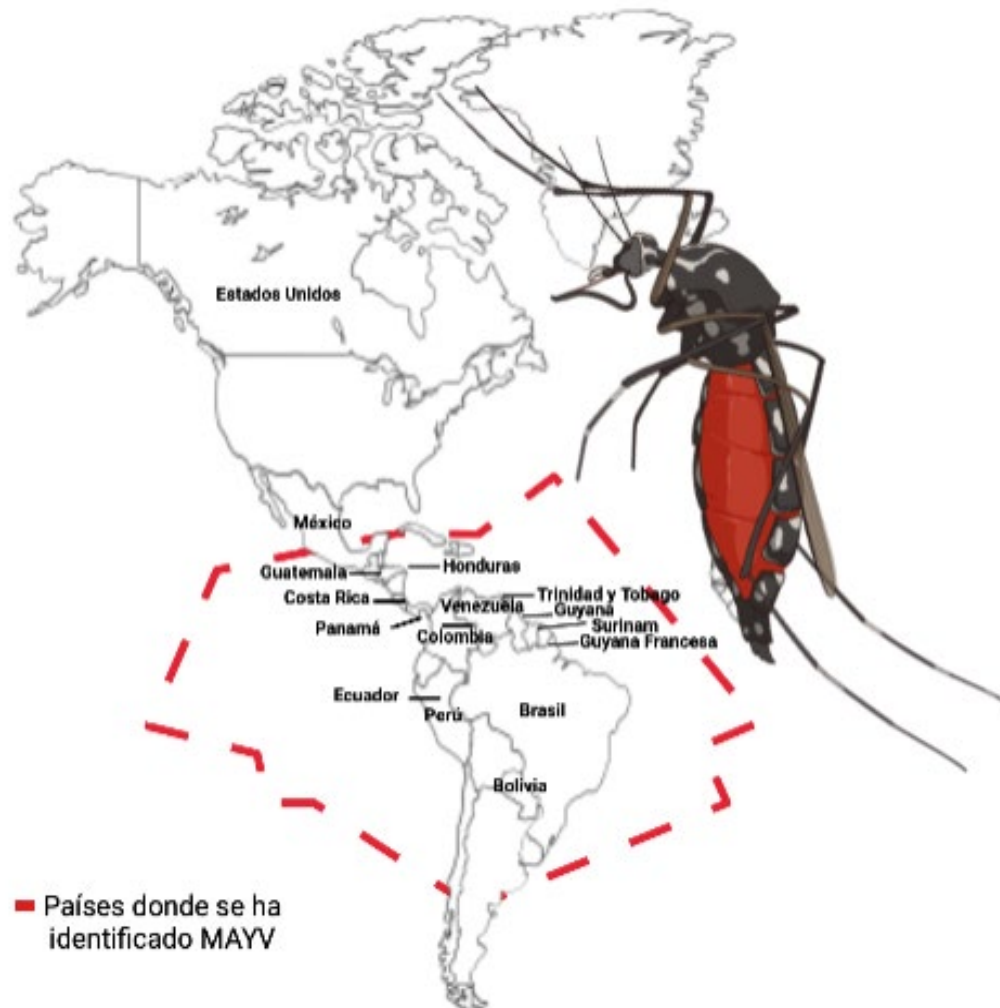


Figura 2. Países donde se ha identificado transmisión del virus Mayaro adaptado de (Mackay&Arden, 2016).

2.3. Características del Genoma

La partícula de los *Alfavirus* consiste en un genoma de ARN de cadena sencilla y sentido positivo, rodeado por una envoltura, la proteína de la cápside

dentro de una envoltura lipídica derivada del huésped decorada con espículas de glicoproteínas.

La cubierta de la cápside y las puntas de glicoproteína están dispuestas en partículas icosaédricas de 70 nm de diámetro. Hay 240 copias de la proteína de la cápside dispuestas en una retícula T = 4, con picos de glicoproteína de superficie, que consisten en E1 y E2 (Holland Cheng et al., 1995; Zhang et al., 2002).

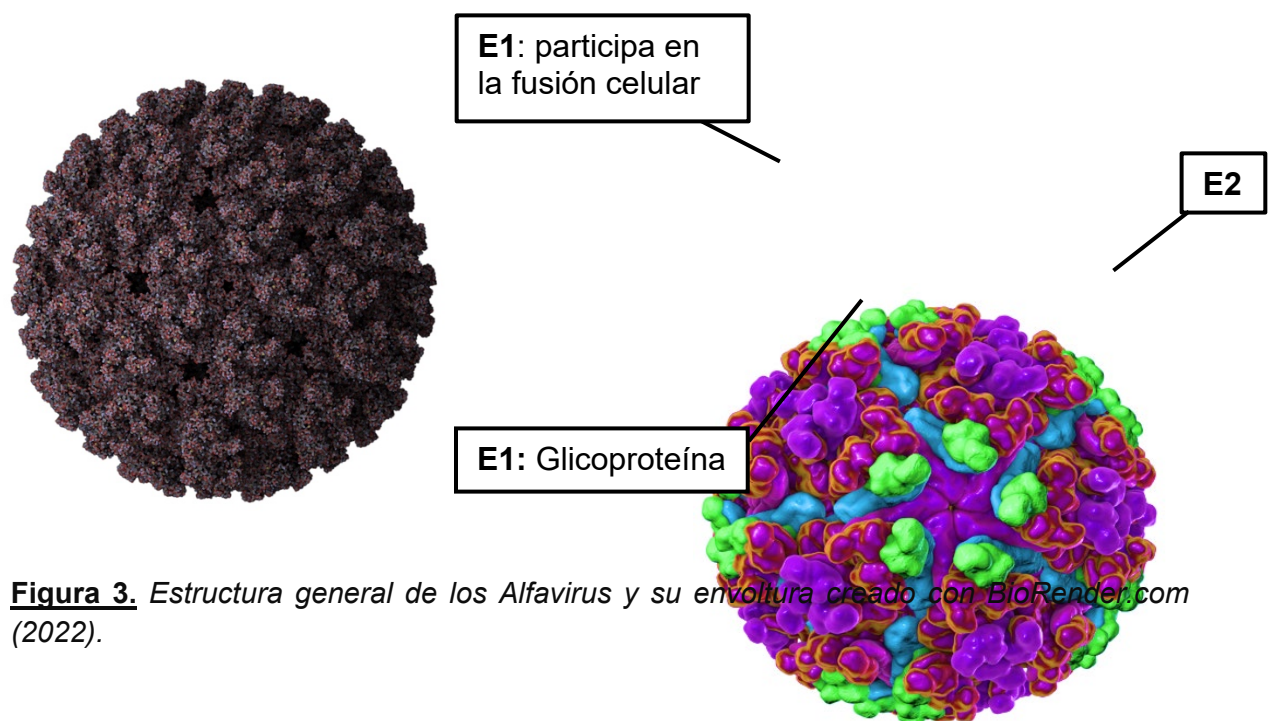


Figura 3. Estructura general de los Alfvirus y su envoltura creado con BioRender.com (2022).

El genoma posee una caperuza en el extremo 5' 7-metil-GpppA y una cola de poli-A en el extremo 3' (Hefti et al., 1975). El genoma tiene dos marcos de lectura abierto (ORF), el primero se traduce directamente del ARN genómico y codifica las proteínas no estructurales NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, requeridas para la síntesis de ARN. El segundo ORF, el cual se expresa mediante la producción de un ARNm subgenómico a partir de un promotor de un intermediario de replicación de ARN de cadena negativa, que codifica para las proteínas estructurales C, E1, E2, E3 y 6K,

que funcionan en el ensamblaje de nuevas partículas de virus (Strauss & Strauss, 1994).

Estas últimas se transforman en una nucleocápside y sus glicoproteínas, lo que, después de combinarse con la membrana plasmática, conduce a la liberación de nuevas partículas virales fuera de la célula. Las partículas liberadas infectan a otras células y el ciclo se repite (Valdés, 2016).

2.4. Sitio de replicación

La síntesis de ARN de los Alfavirus es un proceso asociado a la membrana. Los primeros estudios encontraron que la actividad de síntesis de ARN se fraccionó con membranas (Friedman et al., 1972; Gomatos et al., 1980).

Los Alfavirus y otros virus ARN inducen la reorganización de las membranas del huésped en estructuras citoplásmicas conocidas como vacuolas citopáticas tipo 1, que durante mucho tiempo se sospechó que eran los sitios de la síntesis de ARN (Grimley et al., 1968; Salonen et al., 2003). La síntesis de ARN ocurre en el lado citoplásmico de estas estructuras de membrana modificadas, pero está al menos parcialmente secuestrada dentro de las invaginaciones denominadas esférulas (Ehsani et al., 2001; Froshauer et al., 1988).

Se ha encontrado que la formación de estas esférulas depende no solo de proteínas no estructurales, sino también de la síntesis activa de ARN (Spuul et al., 2007).

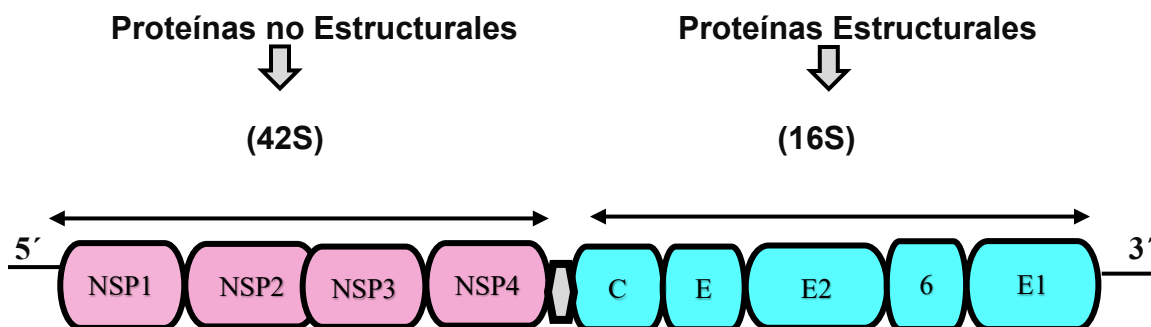


Figura 4. Esquema del genoma de los Alfavirus adaptado de (Muñoz & Navarro, 2012).

2.5. Mayaro

2.5.1. Epidemiología

Mayaro se aisló por primera vez de pacientes febriles en Trinidad y Tobago en 1954 (Muñoz & Navarro, 2012). Este virus se mantiene en un ciclo selvático en donde se encuentra su principal vector, mosquitos del género *Haemagogus* y como reservorios a pequeños primates no humanos. No obstante, no se puede descartar la participación de otros vectores y hospedadores en la diseminación del virus (Esposito & Fonseca, 2017; Renato et al., 2107).

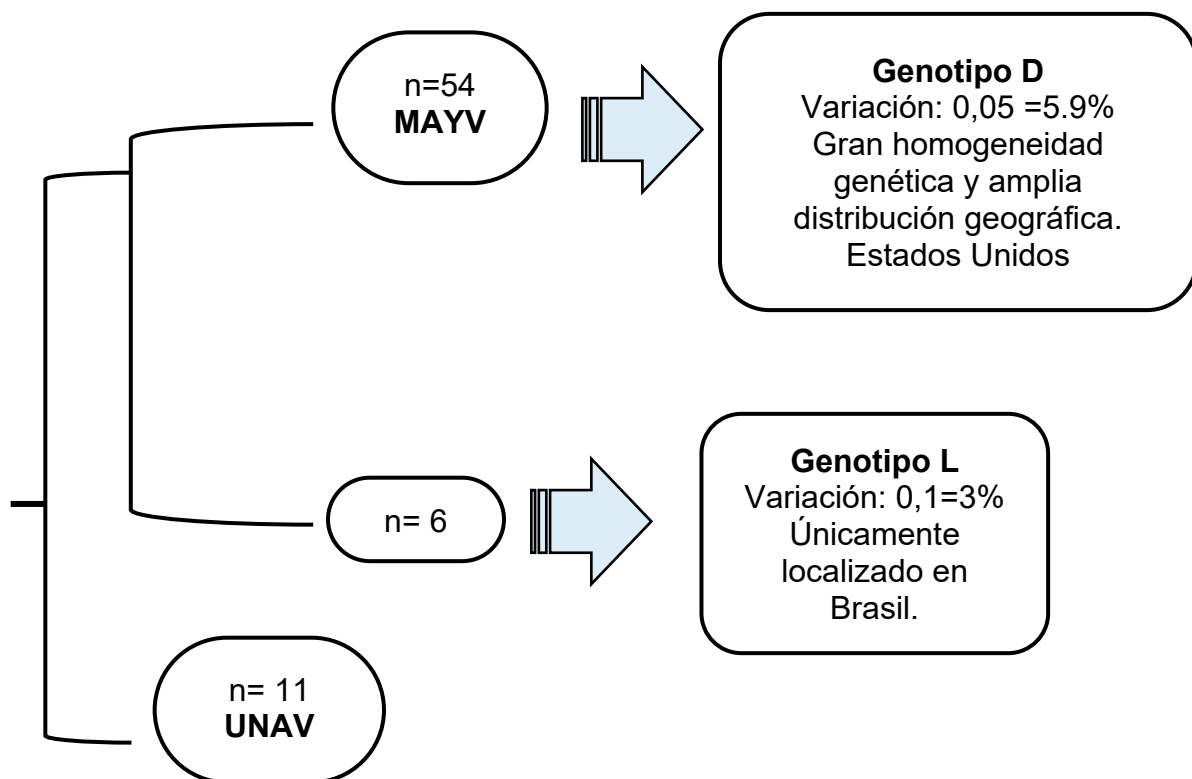


Figura 5. Resumen esquemático de los resultados filogenéticos , donde se identifican dos genotipos del virus Mayaro y el virus UNA como referencia. Origen de secuencias del genotipo D; Brasil, Guyana Francesa, Surinam, Perú, Bolivia y Trinidad y Tobago MAYV= Virus Mayaro; n= número de secuencias utilizadas (Muñoz & Navarro, 2012).

Después de los casos de Trinidad y Tobago, se ha identificado la existencia de tres genotipos principales del virus: en Brasil (1955) donde se reporta el genotipo (L) , el genotipo D en la región de Colombia (1958-1960), Bolivia (1959), Suriname (1964), Estados Unidos de América (casos importados de Perú y Bolivia, 1997), Ecuador (1997), Guayana Francesa (1998), Venezuela (2000), México (2001), Panamá (2010) y Haití (2015) (Holland Cheng et al., 1995) (Torres et al., 2004) (Muñoz & Navarro, 2012) y el genotipo N, un clado recientemente descrito que se encuentra sólo en una región localizada en Perú(Acosta-Ampudia et al., 2018).

En 2015 se reportó en Haití un caso confirmado, el cual corresponde a un niño de 8 años de una zona rural que fue diagnosticado de coinfección por dengue y Mayaro. En 2018 se notificaron 35 casos de fiebre de Mayaro en Perú. En 2019 se confirmaron dos casos en Perú, en las provincias de Quispicanchis (región Cusco) y La Mar (región Ayacucho) (Acosta-Ampudia et al., 2018)

Los datos previos, justifican el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico molecular altamente específicos y alentar a las autoridades de salud pública, comunidades científicas a trabajar activamente en el diagnóstico, prevención y tratamiento de la infección por MAYV.

País	Hospedador	Método de detección	Cepa
Bolivia	humanos	Serología; molecular; aislado	FSB279, FSB309, FSB311, FSB319, FSB323, Uruma
Brasil, Centro- Oeste región	humanos, primates; otros mamíferos.	Serología; molecular	MAYV_BR/MT_CBA301/2012, MAYV_BR/MT_VG22/2012, MAYV_BR/MT_CBA308/2012, MAYV_BR/MT_CBA306/2012, MAYV_BR/MT_NSL12/2012, MAYV_BR/MT_CBA305/2012, MAYV_BR/MT_CBA230/2012, MAYV_BR/MT_SOR246/2012, MAYV_BR/MT_VG20/2012, MAYV_BR/MT_CBA9/2012, MAYV_BR/MT_VG147/2012, MAYV_BR/MT_CBA322/2012, MT/SINOP/210/2011, BeH504639
Brasil, región norte	humanos primates; mosquitos	Serología; molecular; aislado	BeAn343102, BeAn337622, BeAr30853, BeAr350396, BeAr505411, BeH186258, BeH256, BeH342912, BeH343148, BeH343155, BeH343178, BeH394881, BeH407, BeH473130, BeH428890, BeH504378, BeH506151, Acre27, FSB1131, IQE2777, 11A, 12A, 13A, 14A, 15A, 16A
Brasil, Centro- Oeste región	humanos	Serología	ND
Colombia	humanos, mosquitos	Serología; aislado	ND
Costa Rica	humanos	Serología	ND
Ecuador	humanos	Serología	ND
Guyana Francesa	humanos, primates	Serología; molecular; aislado	MAYLC, MAYMP, Mayguy1, Mayguy2, BNI-1, BeAr20290, Guyana
Guatemala	humanos ,primates	Serología	ND
Guyana	humanos	Serología	ND
Honduras	humanos primates	Serología	ND
México	humanos	Serología	ND
Panamá	humanos, primates	Serología; aislado	ND

Perú	humanos	Serología; molecular; aislado	07-18066-99, Arv565, DEF533, FSC497, FSC498, Iqd2668, IQD4881, IQD5316, IQD5364 IQT2849, IQT4235(CH), IQU2939, IQU2950, IQU3056, IQU3132, MFI0231, OBS2209, OBS2248, OBS2251, OBS2340, OBS6161, OBS6443, (#96-104)
Surinam	humanos	Serología; aislado	D218
Trinidad y Tobago	humanos, primates; mosquitos	Serología; aislado	TRVL4675, TRVL15537
Venezuela	humanos	Serología	ND
Detección serológica: detección de anticuerpos en suero del huésped. Detección molecular: RT-PCR. Aislamiento: aislamiento viral en cultivo celular. ND: No determinado.			

Tabla 1. Datos epidemiológicos sobre la circulación de Mayaro en América tomado de (De Oliveira Mota et al., 2015).

La epidemiología de este alfavirus es similar con las diferencias geográficas a la de los virus Barmah, Chikungunya, río Ross, Sindibis y la del virus O'nyong'nyong en África por haber mosquitos diseminadores de estos arbovirus, que se mantienen en un ciclo enzoótico en áreas boscosas y húmedas. El brote más reciente de fiebre por MAYV se describió en Venezuela en la estación de Ospino, Estado Portuguesa, entre febrero y marzo de 2010, con 72 casos humanos (Torres et al., 2010)(Muñoz & Navarro, 2012).

El virus Mayaro (MAYV) es un arbovirus que forma parte del complejo Semliki que consta de otros siete virus: virus Bebaru, Chikungunya, Getah, Sindbis, Ross River, O'nyong nyong y Una ya que comparten algunos sitios antigénicos comunes, (Acosta-Ampudia et al., 2018).

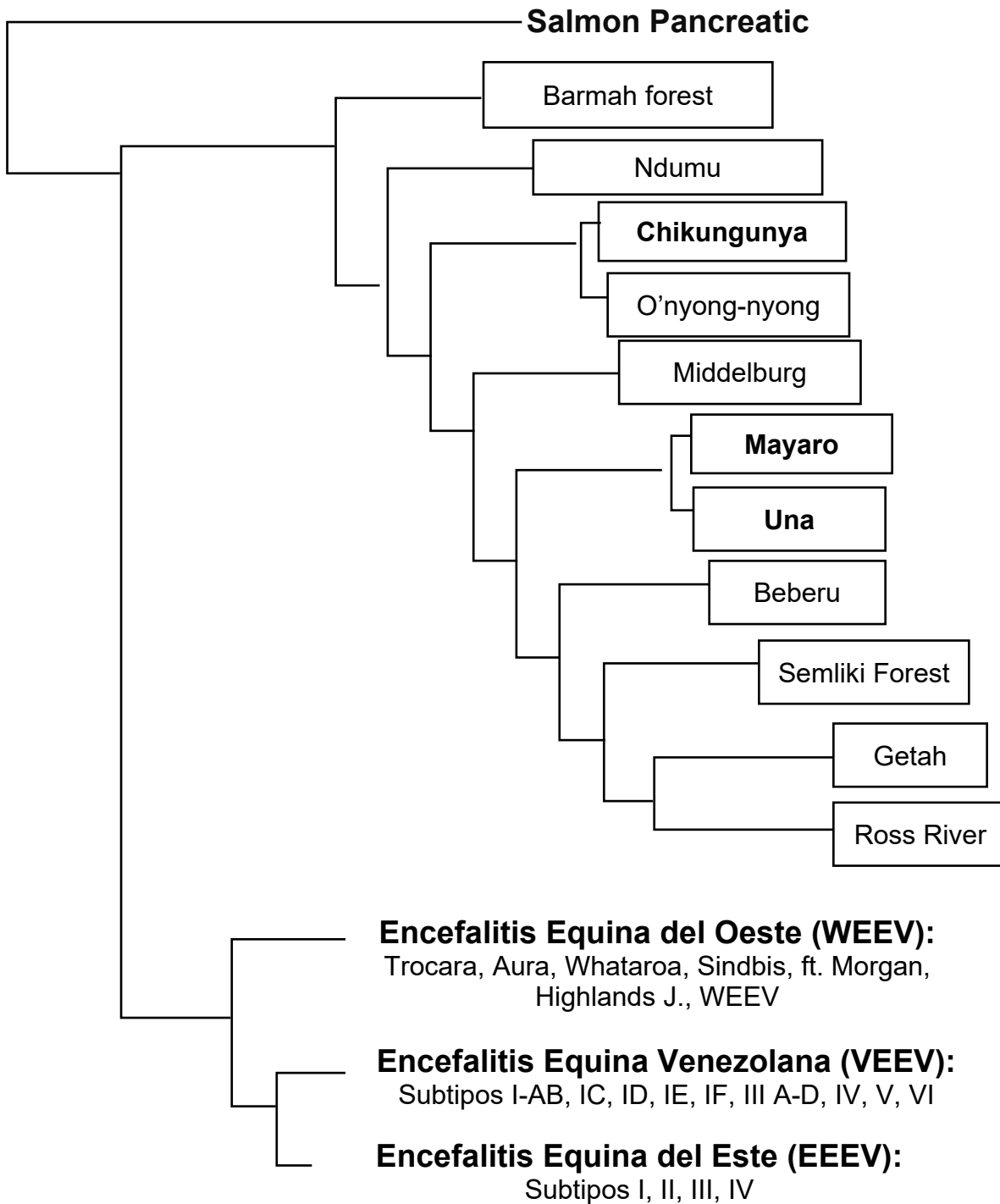


Figura 6. Filogenia de los alfavirus. Se presenta un árbol esquemático basado en (Ludert et al., 2017). Se observa el “clado” del complejo Semliki Forest y en él, a los grupos de virus hermanos, Mayaro y UNA. Los “clados” internos están asociados a los complejos de encefalitis equinas del oeste, del este y venezolana.

2.5.2. Replicación del virus

La entrada del virus en la célula hospedadora se da por la picadura de un mosquito infectado por MAYV, mediado por receptores mediante un proceso de endocitosis (Muñoz & Navarro, 2012). La glucoproteína E2 es responsable del contacto entre partículas virales y la superficie celular, ya que los anticuerpos anti-E2 pueden neutralizar la capacidad de infección viral, lo cual no se observa al emplear anticuerpos anti-E1 (Strauss & Strauss, 1994) (A. M. Powers et al., 2006b). El aumento de la permeabilidad de la membrana de la célula hospedadora y los cambios de concentración iónica alteran la actividad enzimática de la célula, lo cual favorece la traducción del ARN vírico sobre el ARNm celular, que impide la reconstrucción y el mantenimiento de la célula, y es la causa principal de la muerte de la células infectadas (Renato et al., 2017); además, la nsP2 entra al núcleo e interfiere con la transcripción de la célula hospedera (Muñoz & Navarro, 2012). El hecho de poseer ARN de material genético, le da a este virus gran adaptabilidad debido a la alta tasa de mutaciones, lo que aumenta su probabilidad de adaptación a nuevos organismos, tanto vertebrados como invertebrados, que pueden servir de hospedadores (Valdés, 2016).

2.5.3. Sintomatología

En humanos, el virus Mayaro es capaz de alcanzar niveles de viremia similares a los reportados en monos, los cuales son capaces de infectar con el virus a mosquitos vectores experimentalmente (Muñoz & Navarro, 2012). La infección con virus Mayaro produce síntomas inespecíficos en forma similar a otros arbovirus en su fase inicial: fiebre, dolor de cabeza, mialgia, dolor retroocular, escalofríos, fuerte artralgia, mareos, náuseas, fotofobia, anorexia, erupción cutánea principalmente en el pecho, las piernas, la espalda, los brazos y con menor frecuencia en la cara, dolor abdominal, leucopenia y plaquetopenia; en algunos casos, se ha presentado diarrea, dolor de garganta, congestión nasal, tos y manifestaciones hemorrágicas (Renato et al., 2107).

Los factores moleculares envueltos en la artritis inducida por alfavirus, están asociados a la permanencia y persistencia de los síntomas: a) replicación viral en las células diana, incluyendo macrófagos y células musculares; b) la respuesta inflamatoria inmune con activación e intensificación de macrófagos, células NK y linfocitos T, con incremento de los mediadores inflamatorios; c) persistencia del virus en los tejidos corporales. Al replicarse en los macrófagos y fibroblastos de los órganos diana, ocasionan inflamación considerable en articulaciones y músculos. Los antígenos liberados ocasionan el intenso dolor resultante y el compromiso articular agudo, subagudo y crónico que persistiría durante varios meses (P. Navarro et al., 2016).

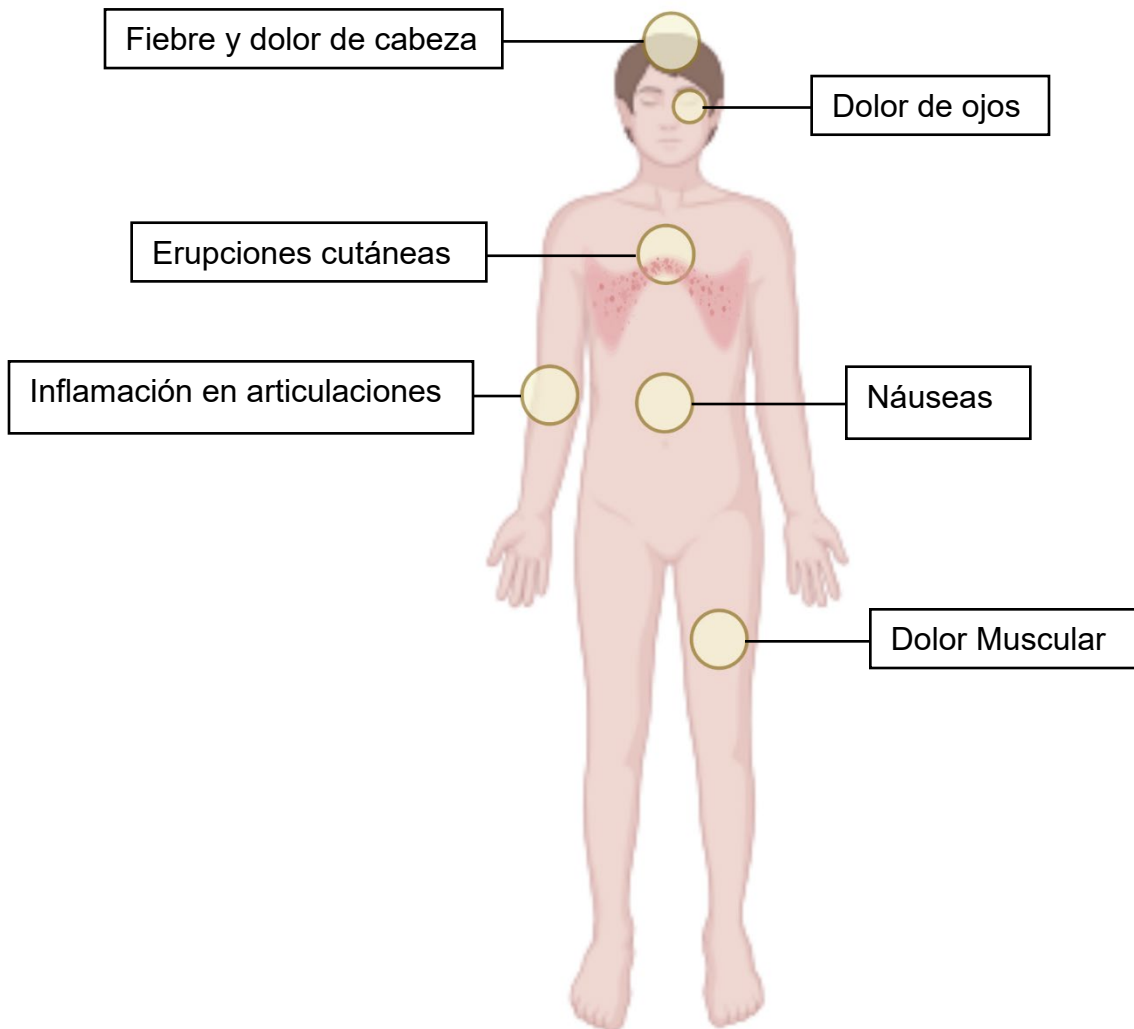


Figura 7. Diagrama de sintomatología de MAYV en humanos creado con BioRender.com (2022).

2.5.4. Diagnóstico

El diagnóstico del virus del Mayaro se basa principalmente en la sintomatología inicial, aunque se confunde con otros cuadros clínicos. Por lo tanto se emplean métodos inmunológicos y moleculares, entre los cuales se encuentran: aislamiento viral mediante la inoculación de cultivos celulares o ratones,

posteriormente se realiza la aplicación de pruebas serológicas como, ELISA, fijación del complemento, inhibición de la hemaglutinación y reducción de placas por neutralización, donde se detectan inmunoglobulinas específicas, y por métodos moleculares se encuentra la amplificación del material genético del virus mediante RT-PCR, en este método se utilizan secuencias del gen nsP1. (Renato et al., 2107) (Mota et al., 2015). La problemática de las pruebas inmunológicas se dan debido a que los pacientes no acuden en una fase aguda o se tienen muestras de sueros pareados, con cierta diferencia de tiempo para obtener resultados positivos, por lo cual las pruebas moleculares son más eficaces y específicas (Muñoz & Navarro, 2012). Una vez más se hace necesario alertar a las comunidades médicas nacionales y autoridades sanitarias ante la amenaza que representa esta enfermedad infecciosa que con mayor fuerza incide en países cercanos y que puede convertirse en un problema de salud a corto o mediano plazo.

2.5.5. Tratamiento

Mayaro, al igual que muchas otras enfermedades infecciosas virales, no tiene tratamiento específico para el agente etiológico. La terapéutica consiste en el alivio sintomático de la fiebre y los dolores de la inflamación articular, empleándose analgésicos y antipiréticos derivados del paracetamol, esperando que la respuesta inmune del huésped sea lo suficientemente adecuada para eliminar el agente infeccioso y sus antígenos.

2.6.UNA

2.6.1. Epidemiología

El virus (UNAV) es otro alfavirus del nuevo mundo miembro del complejo del Bosque Semliki (A. M. Powers et al., 2006b). UNAV fue aislado por primera vez de los mosquitos *Psorophora ferox* en el estado de Pará, Brasil, y está ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales de América Central y del Sur (Brasil, Colombia, Guayana Francesa, Panamá, Surinam, Trinidad, Venezuela), donde tiene una baja seroprevalencia. UNAV es un patógeno casi desconocido con poca información sobre su biología y patogénesis.

2.7. Chikungunya

2.7.1. Epidemiología

El virus Chikungunya (CHIKV) es un arbovirus reemergente perteneciente también al género *Alfavirus*, de la familia *Togaviridae*. El curso clínico característico de la infección por este virus incluye fiebres, artralgias y exantema. (Abdelnabi et al., 2016). El virus fue aislado por primera vez e identificado como el agente etiológico responsable de un brote de enfermedad febril en Tanzania y Mozambique entre 1952 y 1953 (Ross, 1956).

El nombre de este virus deriva del makonde, lengua bantú hablada en Tanzania y Mozambique. Significa “el hombre que camina encorvado”, en referencia al dolor articular provocado por la infección. La transmisión autóctona del virus en estas regiones se ha favorecido por la presencia urbana de sus principales vectores,

las especies de mosquitos del género *Aedes*, como, *Aedes aegypti*, *Aedes furcifier* y *Aedes albopictus*.(Acosta-Reyes et al., 2015) (Restrepo-Jaramillo, 2014). En 2004 se originó una emergencia del CHIKV luego de un brote en la costa de Kenya, que produjo un cambio epidemiológico en la expresión de la enfermedad, expandiéndose desde 2005-2007 en forma intensa y en una magnitud sin precedentes a islas del suroeste del océano indico, el pacifico y sudeste de Asia, reportándose entre el 2005 y 2006 más de un millón de casos (Acosta-Reyes et al., 2015).

Los brotes de CHIKV más severos y fatales se presentaron en la Isla de la Reunión, en el Océano Índico afectando al 40% de la población con más de 260, 000 casos y 237 fallecidos, posterior a estos brotes la enfermedad se extendió a Europa donde alcanzó su punto máximo en el 2007, cuando se detectó que el virus se estaba diseminando de forma autóctona en el norte de Italia, luego de ser introducido por un viajero virémico que regresaba de la India (Macias et al., 2014).

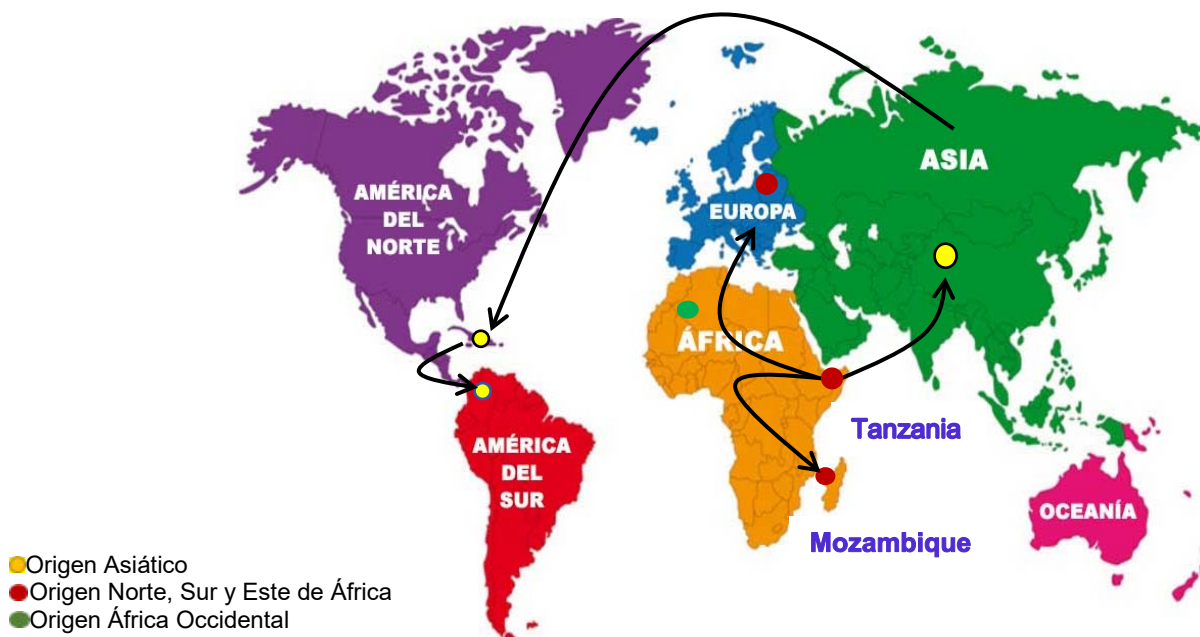


Figura 8. Origen y propagación más probable del CHIKV antes de llegar a América. Figura adaptada de (Cervantes-Acosta & Sanjuán-Vergara, 2016) .

Diversos factores causales se han atribuido a la expansión del CHIKV en diversas partes del mundo (Barba Evia, 2015), entre ellos:

- Adaptación viral a un nuevo mosquito vector *Aedes albopictus*.
- Altos rangos de ataques asociados con la recurrencia de epidemias.
- Niveles altos de viremia $>5 \log_{10}$ unidades/ml asociados con infección en el huésped humano.
- Amplia distribución mundial del vector responsable de la transmisión.

2.7.2. Replicación del virus

El virus entra a la célula diana, monocito, mediante mecanismos de endocitosis llevada por receptores, y la multiplicación la efectúa en el citoplasma celular. Luego de la acidificación de la vesícula y la correspondiente liberación de la cápside, el genoma viral en un ARNm, es traducido en una poliproteína, llamada NSP1234. Esta poliproteína es escindida por la proteasa viral nsP2 en las cuatro proteínas no estructurales, necesarias para la transcripción y la replicación del ARN viral. Estas cuatro proteínas realizan actividad de ARN-polimerasa para la síntesis de ARN viral; colocación del capuchón en el extremo 5' del ARNm viral y en el ARNm subgenómico que da origen a las proteínas estructurales; la actividad helicasa, implicada en el despliegue de la molécula de ARN durante la replicación genómica y actividad de proteasa para el desarrollo de la poliproteína (Saisawang et al., 2015; Strauss & Strauss, 1994).

La expresión de las cuatro proteínas no estructurales a partir de proteólisis de la NSP1234 procede mediante mecanismos que están implicados en la regulación de la replicación del ARN viral. En el proceso de autoproteólisis, la poliproteína precursora da origen a la proteína intermediaria P123 y la proteína madura NSP4, capaces de realizar la síntesis de ARN de polaridad negativa (ARN⁻) viral pero que no son muy eficientes en la síntesis de ARN de polaridad positiva (ARN⁺). Una nueva proteólisis de P123 entre los polipéptidos NSP1 y NSP2 da lugar a una actividad polimerasa que es capaz de sintetizar, en forma eficiente, tanto ARN⁻ como ARN⁺. Una segunda proteólisis entre NSP2 y NSP3 crea una polimerasa capaz de sintetizar ARN⁺. Se ha comprobado que la regulación de la replicación del ARN se da mediante una proteólisis diferencial de P123. En las etapas tempranas de la infección, NSP4 y P123 forman complejos de replicación de ARN⁻ transitorios que desaparecen con la proteólisis de P123. En las etapas tardías de la infección, un nivel elevado de actividad de proteínas viral elimina la síntesis de P123 y ninguna síntesis adicional de ARN⁻ es posible. NSP4 y los productos de la proteólisis de P123 forman complejos de replicación de ARN⁺ que son estables y permanecen activos a lo largo del ciclo de infección (Shirako & Strauss, 1994).

Las proteínas en la proteína de la cápside C, las glicoproteínas de envoltura, E1, E2 y E3 junto con la proteína 6K son traducidas como una poliproteína a partir de un ARNm subgenómico, sintetizado en las etapas tardías del ciclo de multiplicación que preceden al ensamblaje viral. El ARNm subgenómico es sintetizado por la polimerasa viral, utilizando como molde una molécula de ARN. Una vez sintetizada la poliproteína precursora, la proteína C es liberada de esta

mediante una actividad autocatalítica (M. J. Schlesinger & Schlesinger, 1973; S. Schlesinger & Schlesinger, 1972).

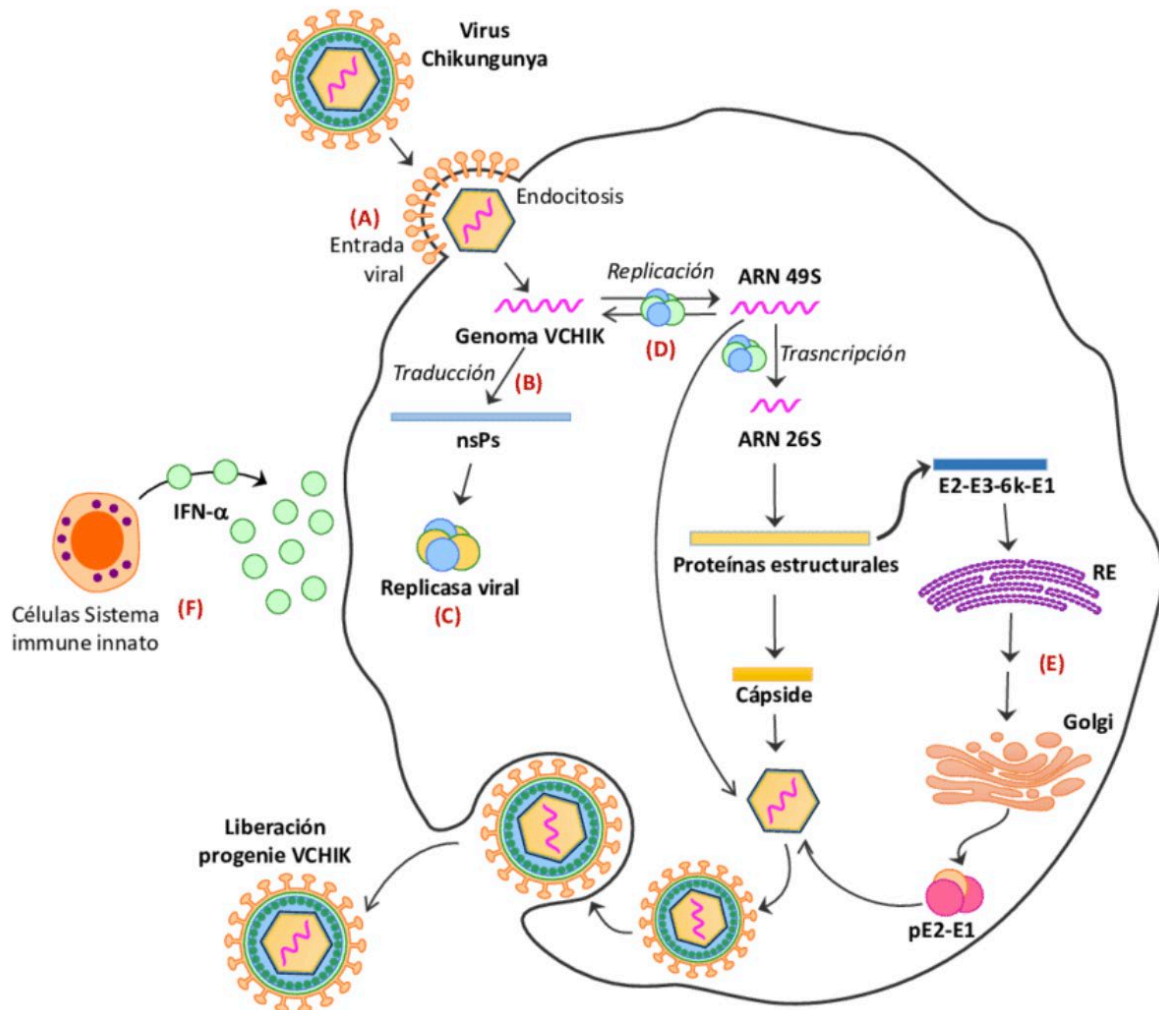


Figura 9. Proceso de replicación de virus Chikungunya en una célula huésped, desde su entrada hasta la salida de nuevas células virales (tomada de Moneriz-Pretell et al., 2016). Los compuestos antivirales en fase de estudio hasta la fecha se han clasificado en los siguientes mecanismos de acción: **(A)** inhibidores de la entrada viral, **(B)** inhibidores de la traducción de proteínas virales, **(C)** inhibidores de la replicasa viral, **(D)** inhibidores de la replicación del genoma viral, **(E)** Inhibidores de la maduración de las glicoproteínas virales y **(F)** moduladores de la respuesta inmune del huésped. Virus Chikungunya (CHIKV), Proteínas no estructurales virales (nsPs), Retículo endoplásmico (RE), Interferon (IFN).

2.7.3. Sintomatología

Los síntomas causados por CHIKV afectan a todos los grupos de edad y a ambos géneros. Luego de un período de incubación de 3-7 días tras la picadura del mosquito, el virus CHIKV causa una enfermedad febril generalmente asociada con artralgia, artritis, dolor de espalda y cefalea (Lo-Presti et al., 2014), además de posible tenosinovitis, que consiste en el engrosamiento de tendones con acumulación de líquido peritendinoso en la vaina, causante de la tumefacción e impotencia funcional (Seijo et al., 2014). En algunos pacientes y con menor frecuencia, la infección también puede presentarse con vómitos y náuseas, conjuntivitis, rash cutáneo o edema (Staples et al., 2011). A menudo los pacientes solo tienen síntomas leves y la infección pasa inadvertida. El 3 al 28% de las personas infectadas son asintomáticas, pero contribuye a la diseminación de la enfermedad (Frias-Salcedo, 2014). La mayoría de los pacientes se recuperan completamente, pero en algunos casos los dolores en las articulaciones pueden durar varios meses, o incluso años después de la culminación de la infección (Acosta-Reyes et al., 2015).



Figura 10. *Síntomas causados por el virus Chikungunya cefalea, conjuntivitis, náuseas, rash y dolor en las articulaciones creado con BioRender.com (2022).*

2.7.4. Diagnóstico

Hay varios métodos que se pueden utilizar para diagnosticar la infección por virus chikungunya el cual generalmente se realiza mediante la detección en la sangre de los anticuerpos producidos por el sistema inmunitario como defensa contra el virus. Sin embargo, también pueden aislarse virus chikungunya en la sangre en los primeros días de la infección (Pauff & Miller, 2012). Las muestras recogidas durante la primera semana de la enfermedad se deben analizar mediante métodos serológicos y virológicos (concretamente, mediante métodos de reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa [RCP-RT]). Se dispone de varios de estos métodos de RT-PCR, cuya sensibilidad es variable; algunos de ellos son adecuados para el diagnóstico clínico. Los productos obtenidos por RT-PCR a partir de muestras clínicas también pueden utilizarse para genotipificar los virus y comparar muestras de orígenes geográficos distintos (Weaver, 2014).

2.7.5. Tratamiento

No existe ningún antiviral específico para tratar la fiebre de chikungunya. El manejo clínico se centra principalmente en aliviar los síntomas, entre ellos el dolor articular (con antipiréticos y analgésicos adecuados), así como en administrar líquidos al enfermo y hacerle descansar. Para aliviar el dolor y hacer descender la fiebre se recomienda utilizar fármacos como el paracetamol (Lo-Presti et al., 2014). Debido a la similitud entre los síntomas de la fiebre chikungunya y los del virus

dengue, los enfermos no confirmados de fiebre chikungunya, en las zonas donde circulan ambos virus, no deben tomar ácido acetilsalicílico ni antiinflamatorios no esteroideos hasta que no se descarte un diagnóstico de dengue, puesto que estos fármacos pueden aumentar el riesgo de hemorragia en los enfermos de dengue (Restrepo, 2014).

3. Familia Flaviviridae

3.1. Generalidades de los Flavivirus

La familia *Flaviviridae* está constituida de una variedad de virus capaces de causar enfermedad tanto en animales y humanos, y estos son de gran importancia médica y social en todo el mundo. Los flavivirus se propagan principalmente por vectores artrópodos como mosquitos y garrapatas. Entre estos, tenemos el virus de la encefalitis del valle de Murray (MVE), virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV), virus de la fiebre amarilla (YFV), virus del Nilo Occidental (VNO), virus de la encefalitis japonesa (VEJ), el virus del dengue (DENV) y el virus del Zika (ZIKV), siendo este último el que estudiaremos en detalle (Laureti et al., 2018). ZIKV es otro virus importante de esta familia que se puede transmitir sexualmente y a través de una transfusión de sangre, y puede propagarse de una mujer embarazada a su feto, causando malformaciones cerebrales graves en el niño, incluida la microcefalia y otros defectos de nacimiento (Bunney, P. E., Zink, A. N., Holm, A. A., Billington, C. J., & Kotz et al., 2017).

Todos los flavivirus tienen un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo, de una sola cadena de aproximadamente 11kb de longitud que codifica diez proteínas; tres proteínas estructurales forman la cubierta del virus y siete proteínas no estructurales que están involucradas en la replicación del genoma viral (Huang et al., 2014). Los alfavirus pertenecientes al complejo de Semliki forest y los flavivirus se consideraban anteriormente géneros dentro de la familia de los

togaviridae debido a su organización estructural similar. Sin embargo, difieren en el orden genético y la estrategia de replicación y ahora se clasifican en familias separadas (Strauss & Strauss, 2020). Dada la importancia médica y económica de algunos miembros de las familias *Flaviviridae* al igual que los *Togaviridae*, aún no se dispone de una terapia antiviral para tratar o prevenir las infecciones causadas por estas familias es por ello que hay un creciente interés en comprender su evolución, así como en conocer un poco más sobre su ciclo de replicación que ya es un problema de salud en la actualidad.

3.2. Zika

3.2.1. Epidemiología

La infección por este flavivirus se describió por primera vez en Nigeria (África) en 1954 (Gonzales Collantes, 2017). Zika fue aislado por primera vez en la península de Entebbe, Uganda en 1947 de un mono rhesus. Inicialmente no había indicios de que el virus causara enfermedades en humanos, pero una encuesta a residentes de múltiples áreas de Uganda reveló una seroprevalencia del 6,1% de anticuerpos contra el virus, lo que sugería que la infección humana era recurrente (Song et al., 2017).

Se reportó un brote de gran importancia en la Polinesia Francesa entre los años 2013 y 2014 y en una pequeña fracción de los casos graves se asociaron con complicaciones neurológicas, como el síndrome de Guillain-Barré, se sugirió que el resultado de este brote fue por un bajo nivel de inmunidad y la gran cantidad de mosquitos vectores en la región (Cao-Lormeau, 2014).

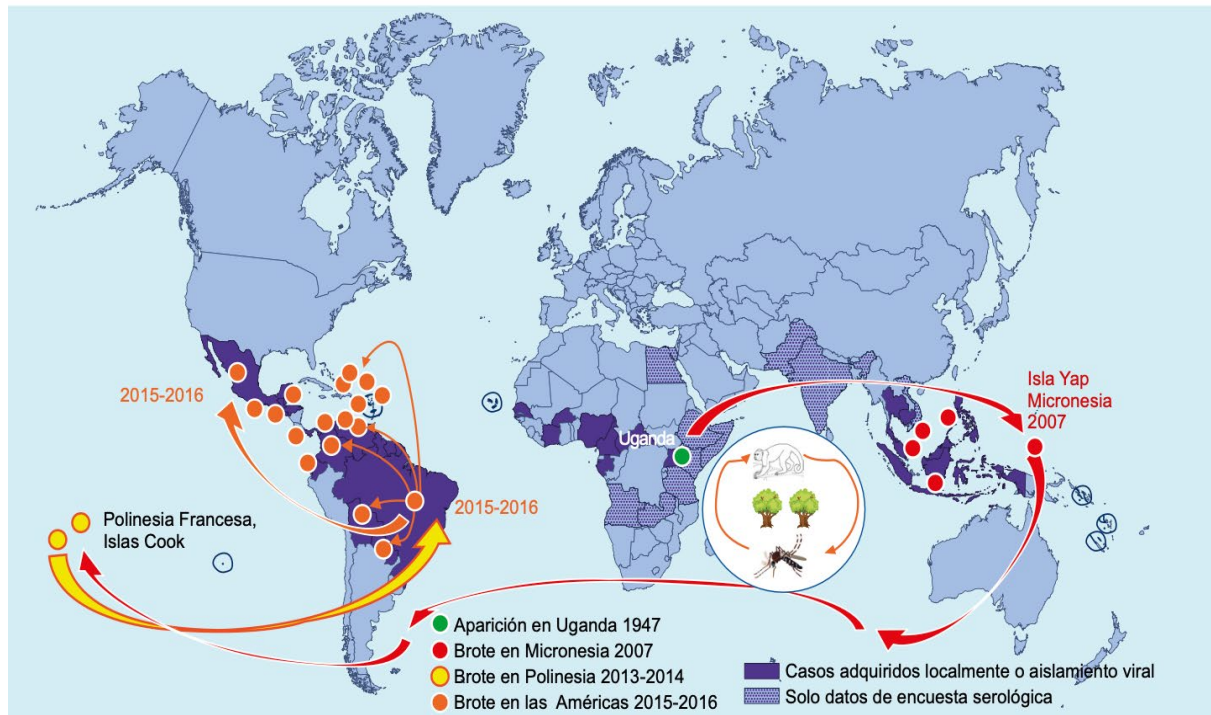


Figura 11. Distribución de infección por Zika en humanos. El mapa muestra la aparición del ZIKV en Uganda (ciclo zoonótico) y la propagación en los brotes de Micronesia, Polinesia Francesa y las Américas (hasta marzo de 2016) (Salud, 2017).

El virus del Zika se identificó por primera vez en las Américas en marzo de 2015, cuando se produjo un brote de una enfermedad con erupciones cutáneas en Bahía, Brasil (Campos et al., 2015) (Zanluca et al., 2015). Los datos epidemiológicos indican que en Salvador, la capital de Bahía, el brote había comenzado en febrero y se había extendido hasta junio de 2014. En octubre, el virus se había propagado a al menos 14 estados brasileños (Ai et al., 2016), y en diciembre de 2015, el Ministerio de Salud de Brasil estimó que se habían producido hasta 1,3 millones de casos sospechosos (Hennessey et al., 2016). En octubre de 2015, Colombia notificó la primera transmisión autóctona del virus Zika fuera de

Brasil (Ai et al., 2016), y para el 3 de marzo de 2016, un total de 51.473 casos sospechosos se habían notificado en ese país. En marzo de 2016, el virus se había propagado a al menos 33 países y territorios de las Américas (Report, 2016).

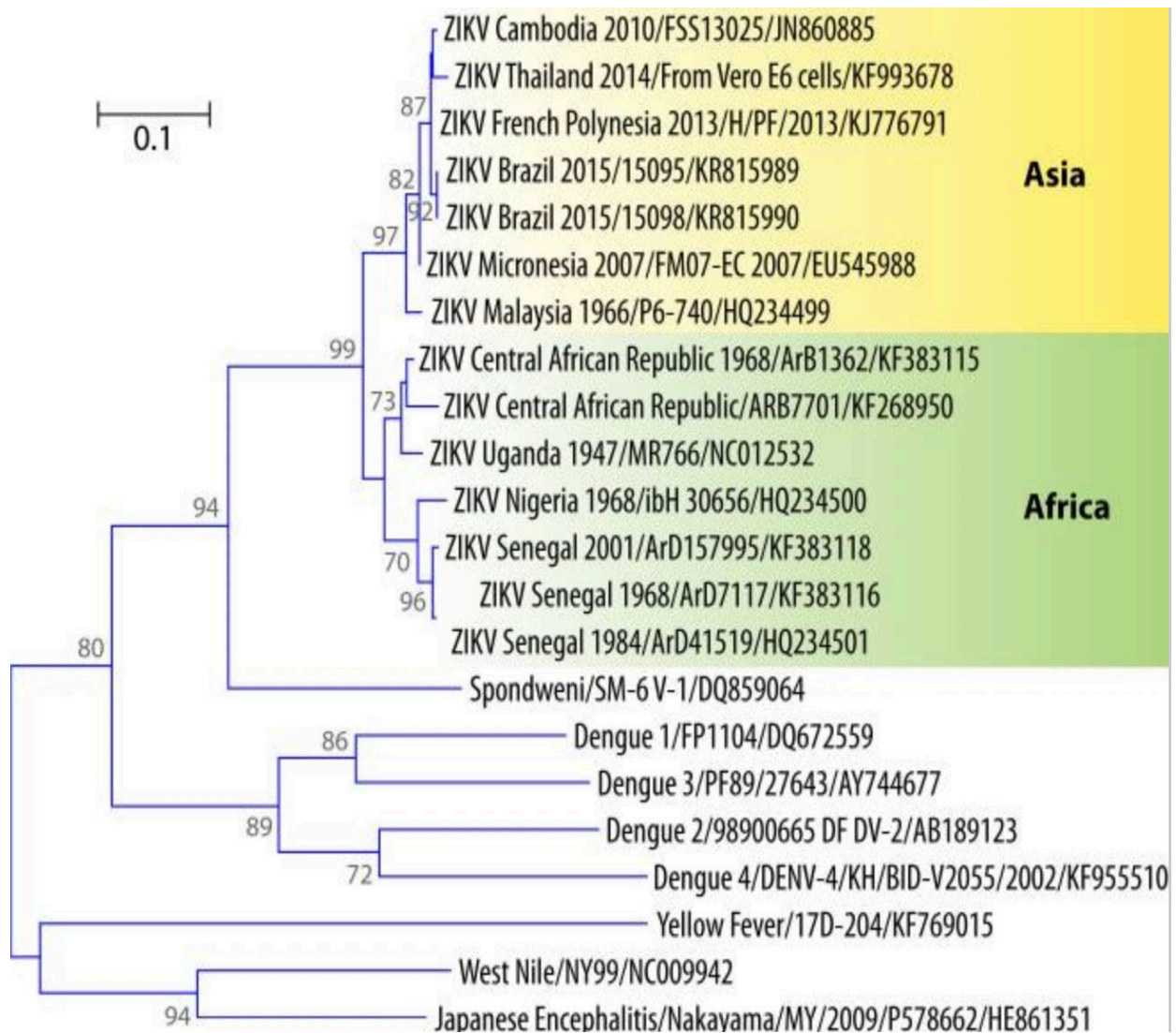


Figura 12. Árbol filogenético de ZIKV que muestra los linajes africanos y asiáticos, incluidas las cepas que surgieron recientemente en el Pacífico y Brasil (Didier Musso et. al., 2016).

3.2.2. Replicación del virus

El ciclo de replicación del virus Zika es similar al de otros virus del mismo género *Flavivirus*. El virión se une a los receptores de la membrana de la célula

hospedera a través de la glicoproteína E de la envoltura, que induce la endocitosis del virión, luego de la acidificación del endosoma, se produce la fusión de la envoltura del virus con la membrana endosomal, la nucleocápside se desintegra y el genoma del virus se libera en el citoplasma. El genoma es transportado a los ribosomas, donde se traduce en la poliproteína que se escinde co- y post-traduccionalmente en las 10 proteínas citadas previamente.

El genoma del Virus Zika se replica a través de la transcripción a un intermediario de ARN simple cadena de polaridad negativa en el citoplasma de la célula, en una reacción catalizada por la ARN polimerasa viral. Luego de esa primera transcripción se inducen evaginaciones del retículo endoplasmático, que dan lugar a paquetes de vesículas, en las cuales el ARN de polaridad negativa se transcribe al ARN viral de polaridad positiva por acción de la ARN polimerasa viral. Estas vesículas reclutan las proteínas del virión, que luego son transportadas, junto con el genoma viral, al aparato de Golgi en donde se ensamblarán para luego ser liberados por exocitosis, previa maduración del virión por proteólisis de prM (Gillespie et al., 2010).

El virión de Zika posee un genoma de ARN monocatenario, no segmentado, con sentido positivo y de un tamaño de 10,794 nucleótidos. El genoma está incluido en una cápside de simetría de tipo icosaédrico, constituida por una única subunidad polipeptídica, la proteína C. En la envoltura de la partícula viral inmadura se encuentra la proteína precursora prM, que mediante proteólisis se transforma en la proteína M del virión maduro. La glicoproteína E también se localiza en la envoltura, formando dímeros que, en el virión maduro, se ubican de forma paralela a la

membrana lipídica, adoptando una simetría de tipo icosaédrica. El virión maduro tiene forma esférica y un tamaño aproximado de 50 nm (Kuno & Chang, 2007).

3.2.3. Sintomatología

Los síntomas más comunes de la infección con el virus son dolores de cabeza leves, erupciones maculopapulares, fiebre, malestar general, conjuntivitis y dolores articulares, la enfermedad clínica suele ser leve y sus síntomas pueden durar de varios días a una semana. El primer caso bien documentado por infección del virus del Zika se describió en 1964; comenzó con un dolor de cabeza leve y progresó hasta convertirse en un sarpullido maculopapular junto con fiebre y dolor de espalda. En dos días, el sarpullido comenzó a disminuir y al tercer día la fiebre cedió para solo quedar las erupciones (Hayes, 2009). La enfermedad grave que requiere hospitalización es poco frecuente y la letalidad es baja. Sin embargo, se han confirmado casos de síndrome de Guillain-Barré, durante la epidemia en la Polinesia Francesa, se confirmaron 73 casos de síndrome de Guillain-Barré y otros padecimientos neurológicos, y se sospecha que podrían ser complicaciones del virus, aunque no hay estudios que lo confirmen (Lorneau et al., 2013).

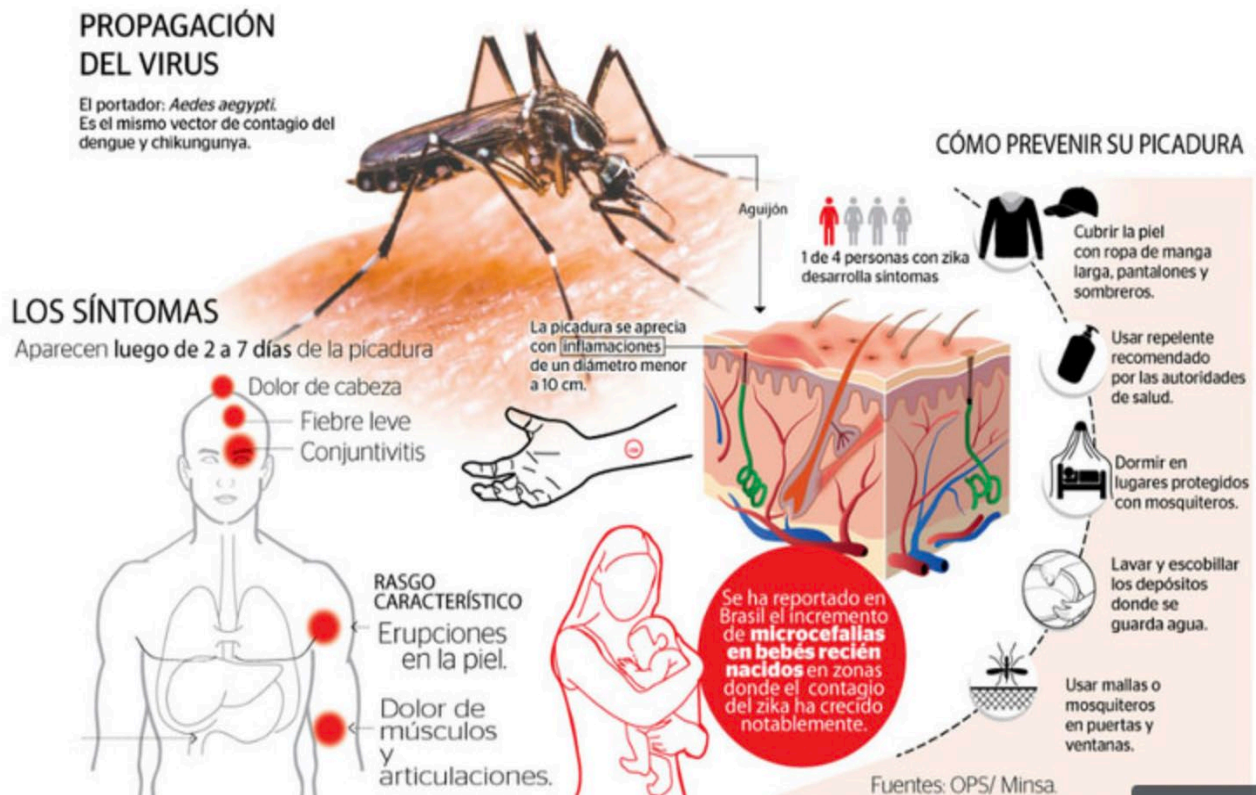


Figura 13. Sintomatología producida por el virus Zika, fuentes: Organización Panamericana de la Salud (OPS).

No obstante debido a la preocupación por la microcefalia causada por la infección materna por el virus del Zika, los fetos y bebés de las mujeres infectadas con el virus del Zika durante el embarazo deben ser evaluados para detectar posibles infecciones congénitas y anomalías neurológicas (Oliveira Melo et al., 2016).

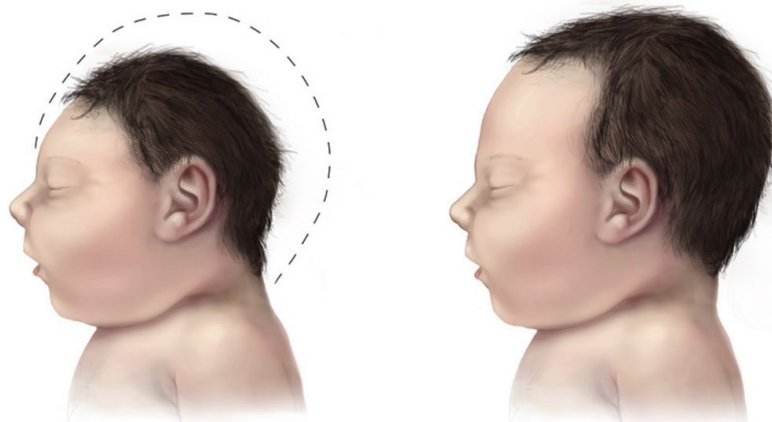


Figura 14. Bebé con microcefalia y Bebé con cabeza normal tomada de (CDC)Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Centro Nacional de Defectos Congénitos y Discapacidades del Desarrollo.

3.2.4. Diagnóstico

En los países con capacidades de laboratorio limitadas, el diagnóstico molecular no está disponible y el diagnóstico de arbovirus a menudo se realiza mediante pruebas serológicas mediante IgM ELISA o pruebas rápidas y pruebas de confirmación por ensayo de neutralización por reducción de placas (PRNT), por RT-PCR se realiza en sangre o en saliva si es imposible recoger una muestra de sangre, si los resultados de Flavivirus RT-PCR son positivos, se realiza la secuenciación, de acuerdo con los protocolos estándar para la diferenciación de anticuerpos anti-flavivirus (Johnson et al., 2000).

3.2.5. Tratamiento

No existen vacunas o medicamentos preventivos para el virus del Zika. Los síntomas pueden ser tratados con analgésicos como el paracetamol, ya que no hay tratamiento específico para la infección por el virus del Zika. Para ayudar a aliviar los síntomas, se recomienda reposo y mucho líquido para prevenir la deshidratación. El acetaminofén puede ayudar a aliviar los dolores musculares y la fiebre. Las personas infectadas con el virus del Zika, el chikungunya o el dengue deben estar protegidas de una mayor exposición a los mosquitos durante los primeros días de la enfermedad para evitar que otros mosquitos se infecten y reducir el riesgo de transmisión local (Janeiro et al., 2015).

4. Impacto sobre las arbovirosis causadas por mosquitos en Panamá y América

Durante las últimas décadas las epidemias arbovirales han aumentado en Panamá y resto de países de América. Aunque se han realizado medidas de prevención para controlar estas enfermedades, las mismas no han sido suficientes para disminuir su incidencia. Estas afectan a todos los grupos poblacionales, por lo que resulta necesario identificar el comportamiento clínico y epidemiológico de las infecciones causadas por arbovirus (Espinal et al., 2019) .

Los arbovirus representan una amenaza de salud trascendental tanto para los seres humanos como para algunas especies de animales causando una variedad de manifestaciones clínicas que van desde leves hasta síntomas que pueden amenazar la vida (Mayer et al 2017). En Panama, como en otras regiones tropicales las enfermedades transmitidas por mosquitos como mayaro (MAYV), una (UNAV) dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) y zika (ZIKV) constituyen un problema de salud pública importante. En Panamá existe una prevalencia de *Aedes aegypti* en áreas urbanas y de *Aedes albopictus* en áreas rurales, como ambos vectores transmiten con eficacia los virus como el dengue, desde el año 2005 se ha visto un aumento sustancial con un 50% de los casos con respecto a años anteriores, debido a la introduccion de estas especies a nuevas áreas geográficas (Mayer et al., 2017). Durante la última epidemia del 2013-2014 se detectó la circulación de los serotipos 1 y 2 a nivel nacional y el serotipo 3 en la frontera de Costa Rica con Bocas del Toro.

Las áreas con la mayor concentración de casos de Dengue, y donde se han presentado los brotes en el país a inicio del 2015 son las regiones de Herrera, Los Santos y Bocas del Toro; desde la semana 18 se registra un brote en la Región Metropolitana, corregimiento de Pacora, comunidad de Las Garzas y otro en la región de Veraguas, corregimiento de Soná, comunidad de Soná que fue sostenido hasta la semana 27 (OPS/OMS,2015).

El primer caso importado de Chikungunya detectado en Panamá fue en el mes de abril del 2014 Semana epidemiológica 17 y el primer caso del país en mayo semana epidemiológica 22. Concluyendo el 2014 con 68 casos positivos; 26 son autóctonos y 42 importados, de estos muchos fueron extranjeros residentes en Panamá que viajaron a países afectados, los 42 casos importados provinieron mayormente de países del Caribe y Sur América y con menor frecuencia de Centro América (OPS/OMS,2015).

En cuanto a Zika los casos fueron confirmados en la semana epidemiológica 47 de 2015 en la Isla de Ustupu en el distrito Alligandí, comarca de Kuna Yala en donde se registraron alrededor de 846 casos sospechosos de enfermedad por el virus del Zika, de los cuales 272 fueron positivos por laboratorio. La mayoría de los casos de Zika proceden de la comarca de Kuna Yala (OPS, 2016).

Hasta mayo del 2016 se presentó un acumulado de 272 casos confirmados de infección por Zika, 16 de los cuales correspondían a mujeres embarazadas, se registraron tres casos de microcefalia y un caso de obito fetal con resultado positivo para Zika, así como tres casos de Síndrome Guillam Barre (Ops, 2016).

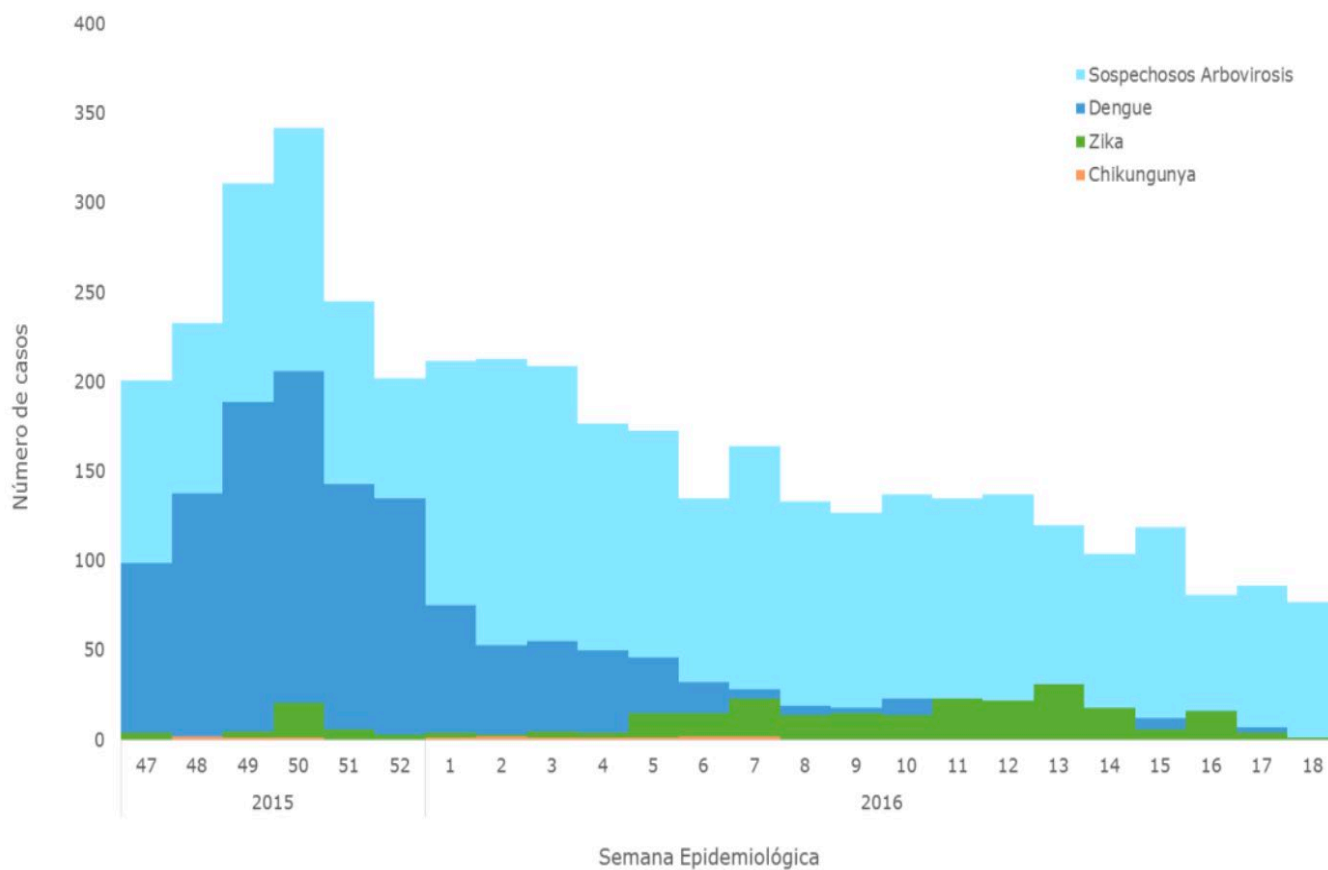


Figura 15. Casos sospechosos y confirmados de dengue, chikungunya y Zika en Panamá. semana epidemiológica 47 de 2015 a semana epidemiológica 18 de 2016 (OPS, 2016).

5. Efecto antiviral de ácido ginkgólico como compuesto natural

Como hemos mencionado anteriormente no existen fármacos o tratamientos específicos que puedan ser utilizados en el ser humano contra cada uno de estos arbovirus, como consecuencia existe un aumento en la propagación de las enfermedades y en la cantidad de casos en los últimos tiempos, es por ello que teniendo en cuenta la situación actual a nivel mundial debido al SARS-CoV2 sabemos que es de suma importancia el control de estas afecciones. Una solución es seguir realizando investigaciones científicas que aporten y puedan llegar a establecer un método eficaz y seguro para obtener posibles compuestos con actividad antiviral específica contra cada virus a fin de poder masificar su uso en la población. Una posible estrategia es la búsqueda de nuevas moléculas activas a partir de fuentes naturales como las plantas.

La utilización de productos naturales con fines terapéuticos data desde los inicios de la humanidad (*MSc. Yaima Esperanza Pérez Campos, 2014*). Las plantas son una rica fuente de nuevos agentes antivirales farmacológicamente activos (*Monteagudo, 2020*). La medicina natural tiene un efecto similar a los medicamentos convencionales, debido a su composición química, según la OMS destaca que de los 119 fármacos derivados de las plantas, alrededor de 74% se usan en la medicina moderna, de manera que se correlacionan directamente con los usos tradicionales que las culturas nativas les daban como hierbas medicinales (*MSc. Yaima Esperanza Pérez Campos, 2014*).

Muchos antivirales por su mecanismo de acción interfieren en alguna de las fases de la infección y la replicación de los virus; otros, como interferones y citoquinas, incitan acciones antiproliferativas en la célula huésped (Romero et al., 2016).

La clasificación de los inhibidores se puede realizar por su mecanismo de acción o su perfil de actividad. La eficacia de estos compuestos depende, entre otras cosas, de obtener concentraciones inhibitorias en el sitio de la infección (Romero et al., 2016).

El Ginkgo biloba, una de las especies de árboles vivos más antiguos es cultivado en todo el mundo por sus propiedades medicinales y su atractivo estético. El ginkgo (derivado del chino Yin-Kuo, que significa "albaricoque plateado") biloba (refiriéndose a sus hojas de dos lóbulos en forma de abanico) se deriva de la hoja del árbol Maidenhair, que se cree que vive de 2.000 a 4.000 años (Diamond et al., 2000).

La mayoría de los productos provenientes de esta planta se preparan con el extracto que se obtiene de sus hojas en forma de abanico, informes anteriores han demostrado que el ácido ginkgólico tiene actividad antitumoral (Qiao et al., 2017) (Ma et al., 2015), antibacteriana (Hua et al., 2017) y antiparasitaria (Chen et al., 2008) así como actividad antiviral contra el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Lü et al., 2012).



Figura 16. *Planta de Ginkgo biloba de pngtree.com (2022).*

Tras diversas investigaciones podemos observar sus múltiples beneficios para una gran cantidad de enfermedades ya que se utiliza en pacientes con insuficiencia circulatoria cerebral e incluso para el tratamiento de problemas emocionales y afectivos, de igual manera está indicado en secuelas de accidentes cerebrovasculares y en trastornos vasculares periféricos como el síndrome de Raynaud; en el tratamiento contra la disminución de la memoria, del estado de alerta y de la atención, así como en la isquemia cerebral, la fibrosis pulmonar, la demencia y el Alzheimer (Mix & Crews, 2002; Birks et al., 2002; Yuan et al., 2017).

Del mismo modo estudios recientes sugieren que el ácido ginkgólico inhibe la síntesis de ADN y proteínas, por lo tanto bloquea o dilata el desarrollo de las contaminaciones virales agudas como Sarampión y Coronavirus COVID-19 (Ibrahim et al., 2021).

Ginkgo biloba tiene una amplia variedad de fitoquímicos, incluyendo alcanos, lípidos, esteroides, benzenoides, carotenoides, fenilpropanoides, carbohidratos, flavonoides y terpenoides (Bilia, 2002).

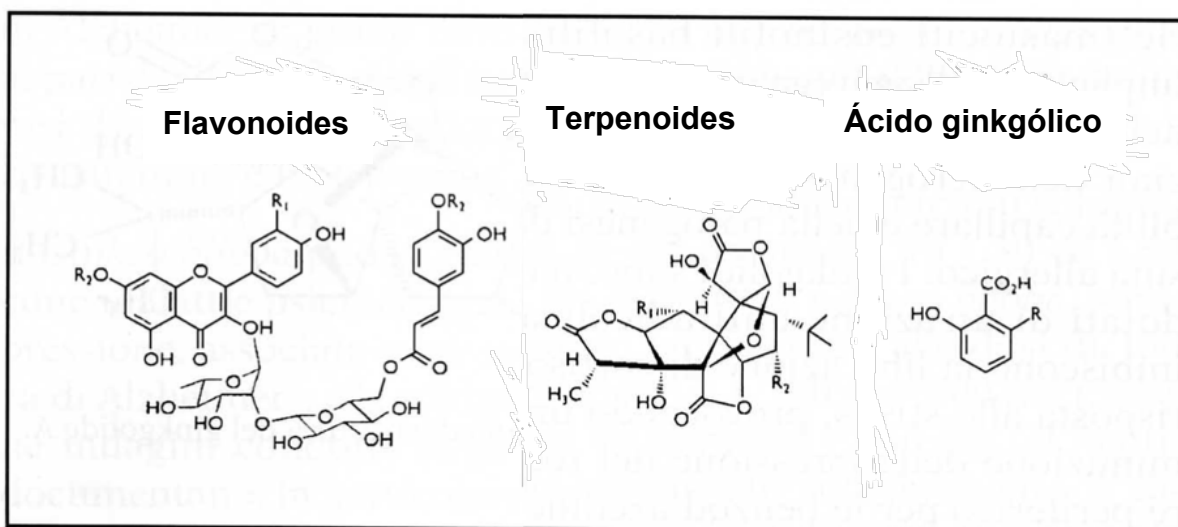
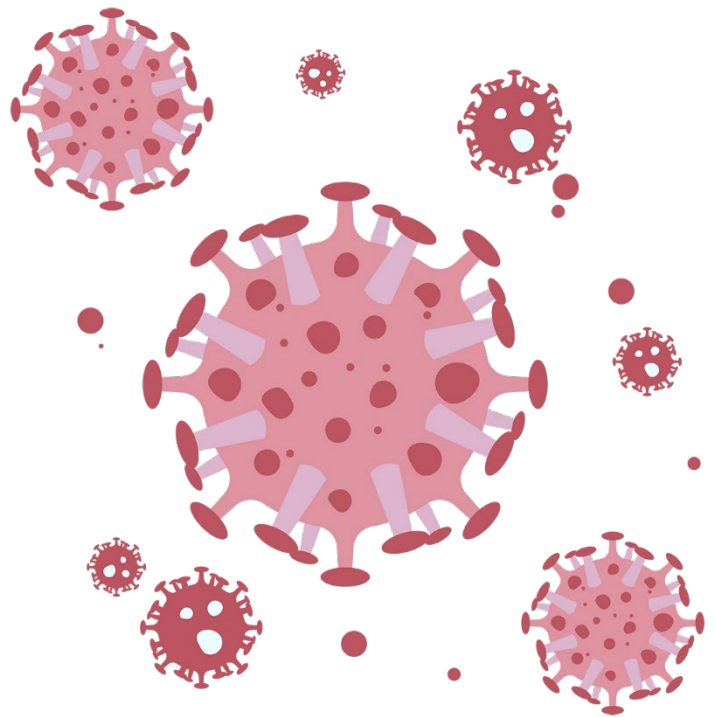


Figura 17. Estructura química de los compuestos que forman parte de *Ginkgo biloba* modificado de (Сулейманова, 2009).

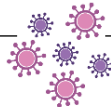
La búsqueda de nuevos antivirales para los virus MAYV, UNAV, CHIKV y ZIKV es una necesidad actual y permanente, es por eso que el uso de alternativas naturales o terapias complementarias ha recibido una gran demanda en los últimos años. Actualmente según la Organización Mundial de la Salud-OMS se estima que el 80% de la población mundial depende de la medicina tradicional para sus necesidades de atención primaria en salud (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2002).



CAPÍTULO III

RESULTADOS

Resultados



• Análisis de la citotoxicidad de ácido ginkgólico en las células Vero o HeLa

Para evaluar la citotoxicidad de los inhibidores, tratamos las células Vero o HeLa con ácido ginkgólico a concentraciones de 0, 1 y 10, μM , y después analizamos la viabilidad celular utilizando el ensayo de MTT. En estas líneas celulares a la dosis máxima de 10 μM no se observó toxicidad celular (Figura 18).

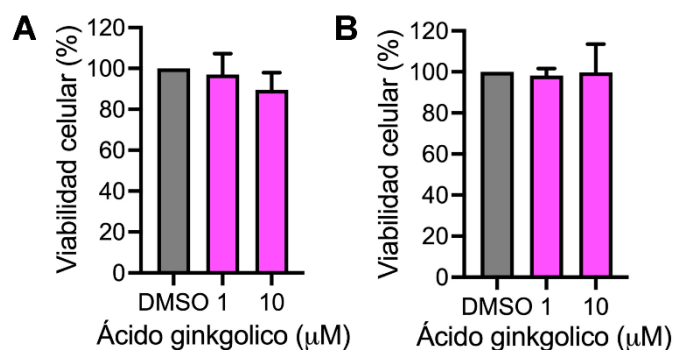


Figura 18. El ácido ginkgólico no mostró citotoxicidad en las células Vero o HeLa. Las células Vero (A) o HeLa (B) fueron cultivadas en platos de 96 pocillos y se trataron con el compuesto ácido ginkgólico a las concentraciones indicadas durante 24 horas. Posteriormente, las células se incubaron con 50 μl de MTT durante 4 horas a 37°C, los cristales de formazán se solubilizaron y la solución coloreada se cuantificó con un espectrofotómetro de microplatos a 590 nm. Los datos se analizaron con el programa estadístico GraphPad con la prueba de ANOVA de una vía.

- **El ácido ginkgólico afecta la producción de partículas virales de los Alfavirus CHIKV, MAYV y UNAV**

Para evaluar si el ácido ginkgólico afecta la replicación de los virus CHIKV, MAYV o UNAV, llevamos a cabo una cinética de infección en donde células Vero o HeLa se infectaron con lo virus y tras 1h de absorción del virus, se agregó ácido ginkgólico o DMSO como control. A los tiempos indicados después del tratamiento, recolectamos los sobrenadantes y cuantificamos la progenie viral producida por las células infectadas mediante el ensayo de formación de placas. Como se muestra en la **(Figura 19)**, observamos un aumento dependiente del tiempo en los títulos virales en las células tratadas con DMSO. No obstante, en las células tratadas con ácido ginkgólico encontramos una reducción significativa en la producción de progenie viral de todos los virus ya mencionados **(Figura 19 A-C)**.

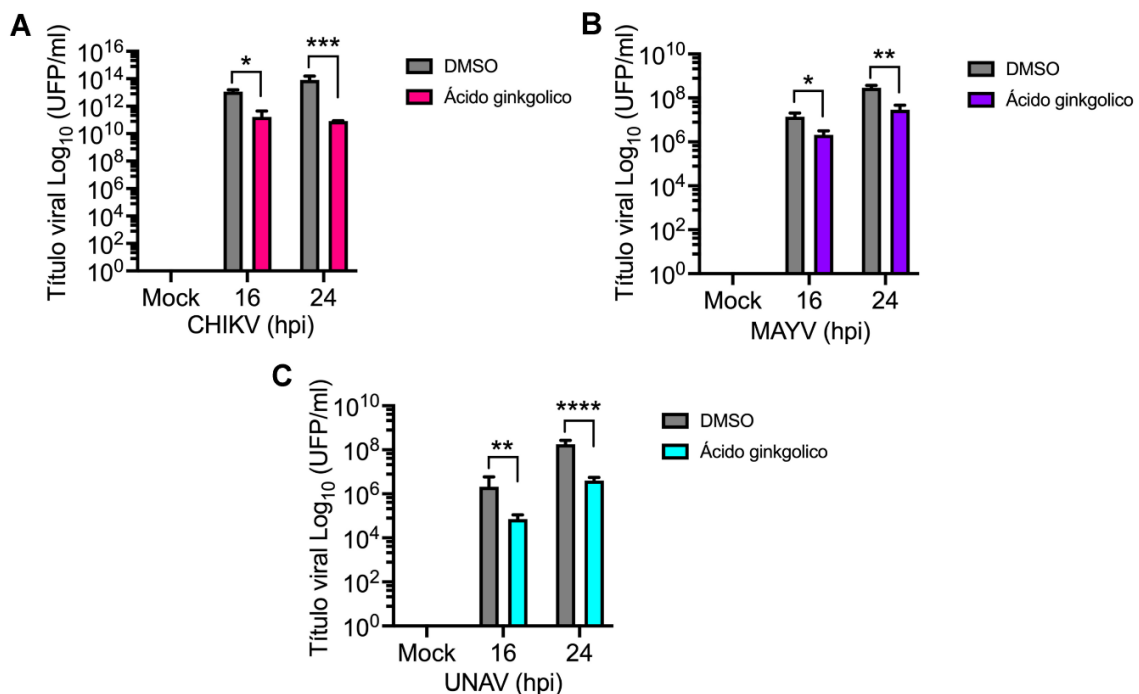


Figura 19. El ácido ginkgólico inhibe la producción de progenie viral de CHIKV, MAYV y UNAV. Las células Vero (A) o HeLa (B, C) fueron pretratadas con ácido ginkgólico e infectadas con CHIKV, MAYV o UNAV durante 1 h. Después se añadió ácido ginkgólico o DMSO y las células se incubaron durante 16 o 24 horas después de la infección (hpi). Los datos se analizaron con la prueba de ANOVA de dos vías. Las diferencias estadísticamente significativas se denotan como: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

● **El ácido ginkgólico disminuye el número de células positivas para los antígenos virales de CHIKV, MAYV y UNAV**

Para verificar los resultados anteriores, llevamos a cabo una tinción por inmunofluorescencia de células infectadas que fueron tratadas o no tratadas con ácido ginkgólico. Estos ensayos demuestran que el tratamiento con ácido ginkgólico ocasiona una disminución considerable en el porcentaje de células que muestran una tinción positiva para los antígenos virales (Figura 20 A-B). Estos resultados indican que efectivamente el ácido ginkgólico afecta la replicación de CHIKV, MAYV y UNAV.

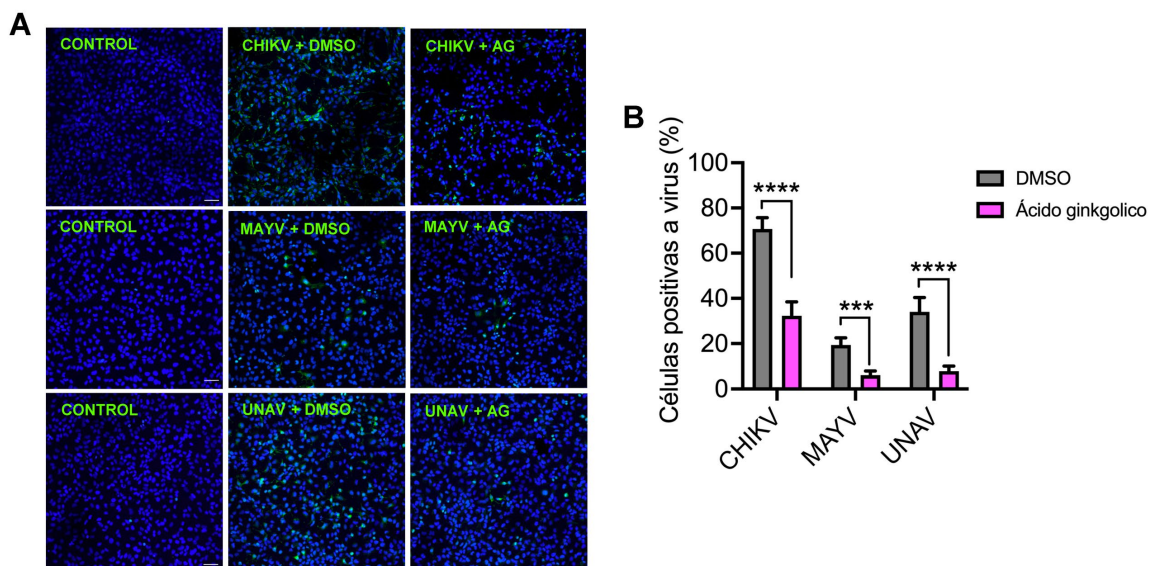


Figura 20. El ácido ginkgólico disminuye el porcentaje de células positivas para antígenos de CHIKV, MAYV y UNAV. (A, B) Células Vero o Hela fueron pre-tratadas con ácido ginkgólico o DMSO e infectadas con los distintos virus a una MOI de 1. Después, las células fueron tratadas o no con ácido ginkgólico. Tras 24 horas de incubación con el tratamiento, las células se fijaron y tiñeron con anticuerpos primarios de ratón anti-CHIKV, anti-MAYV o anti-UNAV, seguidos de un anticuerpo secundario de ratón Alexa-Flour 488. Los núcleos celulares se tiñeron con Dapi (en azul). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal y se analizaron con el software ImageJ. El porcentaje de células virales positivas para el antígeno se evaluó en al menos 10 campos para cada condición experimental. Estos datos se analizaron con la prueba ANOVA de dos vías. Se muestran diferencias estadísticamente significativas: *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$. Barra de escala, 50 μm .

- **La disminución del título de los alfavirus se produce de forma dependiente a la concentración de ácido ginkgólico**

Para investigar si la reducción de la progenie de los virus CHIKV, MAYV y UNAV podría verse afectada por la concentración del compuesto, decidimos infectar células Vero o HeLas con los distintos virus y tratarlas con dosis crecientes de ácido ginkgólico. Después, la progenie viral en los sobrenadantes celulares se cuantificó mediante el ensayo de formación de placas como se describió anteriormente. Los rendimientos de la progenie viral en las células tratadas con DMSO alcanzaron entre 10^8 y 10^{12} UFP/ml, dependiendo del virus analizado (**Figura 21**). Sin embargo, en las células tratadas con ácido ginkgólico, encontramos una disminución significativa dependiente de la concentración en los títulos virales (**Figura 21**).

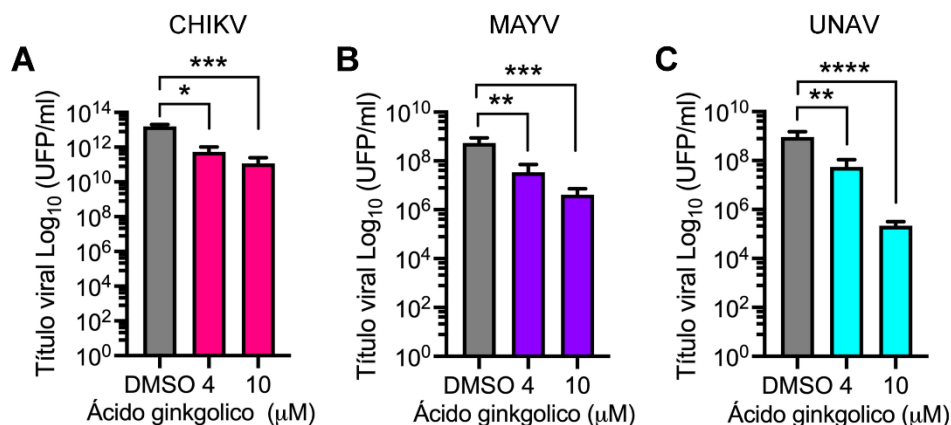


Figura 21. El ácido ginkgólico reduce la producción de la progenie viral de manera dependiente de la concentración. Células Vero (A) o HeLa (B, C) fueron pretratadas con dosis creciente de ácido ginkgólico y después, se infectaron con CHIKV, MAYV o UNAV como se describió anteriormente. Después, se trataron con ácido ginkgólico a las concentraciones indicadas y tras 24 horas de incubación, la producción de partículas virales infecciosas se cuantificó. Los títulos virales se representaron como unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml). Los datos experimentales se analizaron con la prueba ANOVA de una vía. Se muestran diferencias estadísticamente significativas: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

- **El ácido ginkgólico tiene un efecto virucida contra los alfavirus CHIKV, MAYV y UNAV**

Con el objetivo de analizar si el ácido ginkgólico tiene un efecto directo sobre las partículas de los alfavirus, incubamos 10⁶ UFP de CHIKV, MAYV o UNAV con ácido ginkgólico o DMSO en medio MEM sin SFB a 37 °C durante 1 h. Luego, el virus restante de cada condición experimental, se cuantificó como se indicó anteriormente. En la (Figura 22) se observa que el ácido ginkgólico provocó una fuerte reducción de los títulos virales, que oscilaba entre 4 a 5 logaritmos. Estos resultados sugieren que el ácido ginkgólico posee un efecto virucida sobre los alfavirus.

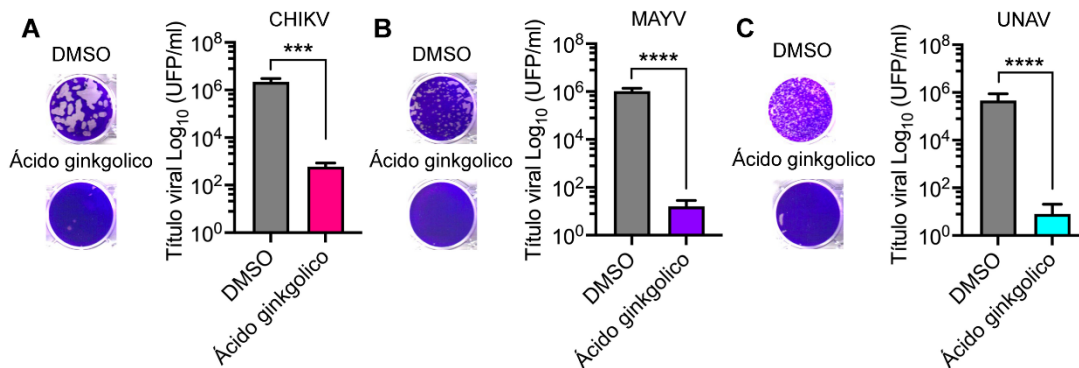


Figura 22. El ácido ginkgólico altera la infectividad de las partículas de los alfavirus Aproximadamente, 10⁶ UFP de CHIKV (A), MAYV (B) o UNAV (C) se incubaron en un medio sin suero con ácido ginkgólico a 10 μM o 0,1% DMSO como control durante 1 h a 37°C. Luego, los alfavirus se titularon directamente en las células Vero o Vero-E6 mediante el ensayo de formación de placas. Los títulos virales se representaron como unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml). Los datos se analizaron mediante la prueba de Mann & Whitney. Se muestran diferencias estadísticamente significativas: *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

- **El ácido ginkgólico interrumpe una etapa temprana del ciclo de replicación de los alfavirus**

Hasta ahora nuestros resultados indicaban que el ácido ginkgólico tiene un efecto antiviral cuando las células se pretratan o cuando se incuban directamente con el virus. Para determinar si este compuesto era capaz de inhibir la replicación de estos arbovirus luego de su absorción, decidimos realizar un experimento de tiempo de adición, en el que se añadió ácido ginkgólico o DMSO en diferentes momentos después de 1 h de absorción del virus (tiempo 0 hpi), y a las 24 horas de infección, evaluamos la producción de progenie viral en los sobrenadantes celulares. En este ensayo encontramos que el ácido ginkgólico solo afectó la replicación viral cuando se aplicó en las primeras 2 hpi (Figura 23 A-C). En el caso de UNAV aún a las 4

hpi se observa una leve disminución (**Figura 23C**). En conjunto, estos datos sugieren que el ácido ginkgólico afecta en una etapa temprana la replicación de CHIKV, MAYV y UNAV.

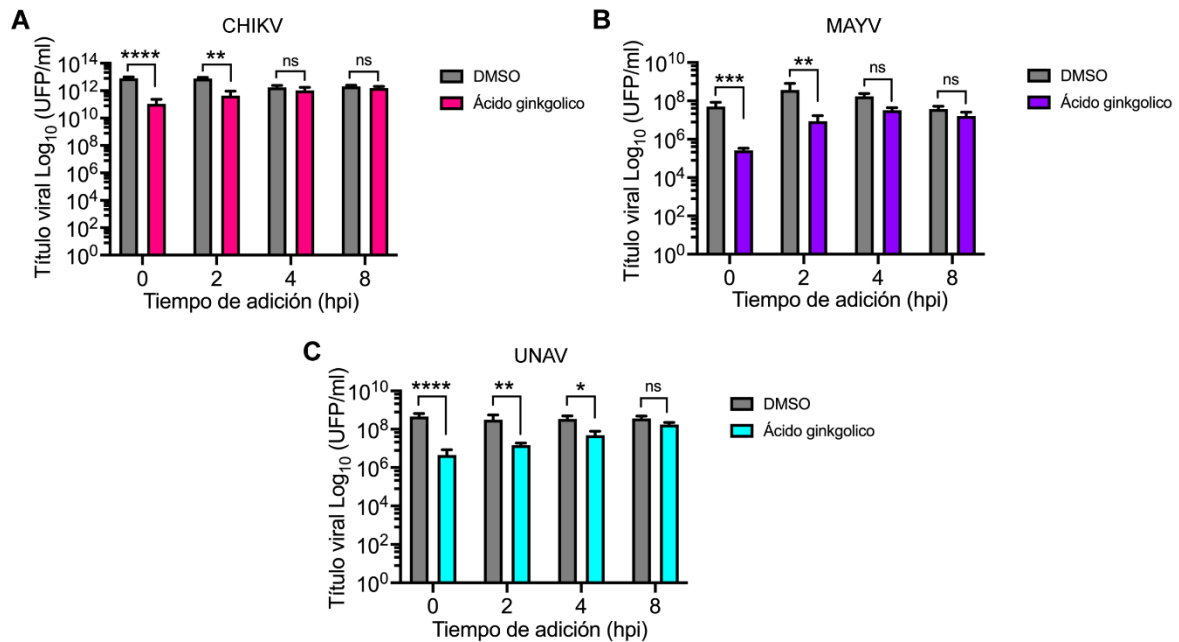


Figura 23. El ácido ginkgólico reduce la replicación del arbovirus en una etapa temprana del ciclo viral. Las células Vero (**A**) o HeLa (**B**, **C**) se infectaron con CHIKV, MAYV o UNAV y después de 1 hora de absorción del virus, se aplicaron ácido Ginkgólico o DMSO a las células en los momentos indicados. Luego, la producción de progenie viral se midió en los sobrenadantes celulares después de 24 horas de incubación, como se indicó anteriormente. Los títulos virales se expresaron como unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml). Los datos se analizaron con la prueba ANOVA bidireccional. Se muestran diferencias estadísticamente significativas: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns: no significativa.

- **El ácido ginkgólico disminuyó la expresión de las proteínas E1 y NSP1 de CHIKV, MAYV y UNAV**

Con el objetivo de evaluar otros posibles mecanismos mediante los cuales el ácido ginkgólico reduce la replicación de los alfavirus, decidimos evaluar la expresión de

las proteínas virales E1 y nsP1, obtenidas de células infectadas con CHIKV, MAYV y UNAV, y tratadas con ácido ginkgólico o DMSO. Como se muestra en la **Figura 24**, en las células control infectadas durante 24h se detecto una fuerte expresión de las proteínas E1 y nsP1. Por el contrario, el tratamiento con ácido ginkgólico dio lugar a una supresión notable de la expresión de ambas proteínas virales (**Figura 24A, C, E**). Un análisis densitométrico de las bandas reveló diferencias estadísticamente significativas en la expresión de las proteínas E1 y nsP1 entre las células tratadas y no tratadas (**Figura 24B, D, F**). Estos hallazgos indican que el tratamiento con ácido ginkgólico disminuye notablemente la expresión de las proteínas virales de los alfavirus estudiados.

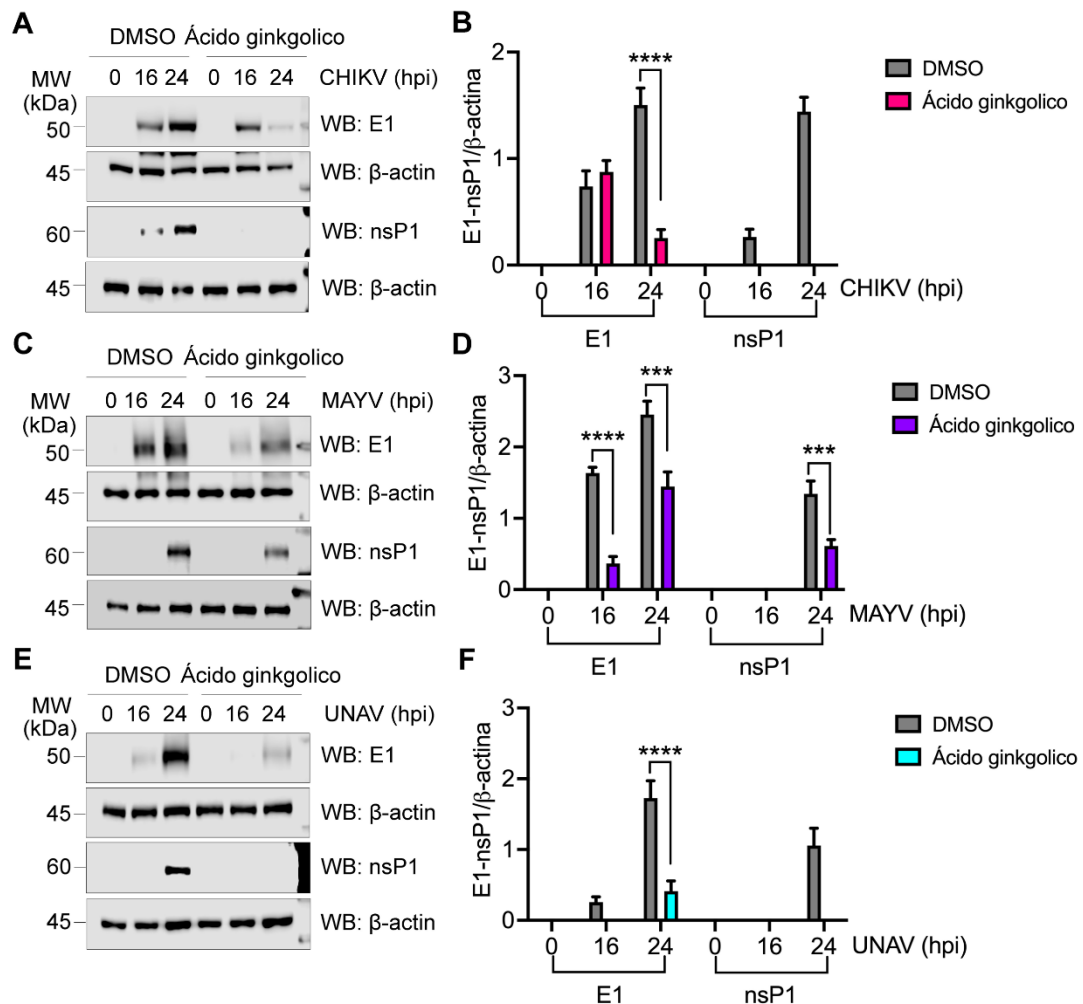


Figura 24. El ácido ginkgólico afecta a la expresión de las proteínas de los alfavirus. Las células Vero o HeLa se infectaron con CHIKV (**A**), MAYV (**C**) o UNAV (**E**) con un MOI de 10. Después de 1 hora de absorción del virus, se aplicó ácido Ginkgólico o DMSO a las células. En diferentes momentos después de la infección, los niveles de proteínas E1 y nsP1 fueron evaluados por Western blot (WB). La proteína de β -actina se utilizó como control de carga. MW: Peso molecular. kDa: kilodaltons. **B, D, F.** La intensidad de las bandas de las proteínas E1 y nsP1 se densitometraron utilizando el software ImageJ y se normalizaron con la proteína β -actina. Los datos se analizaron con la prueba ANOVA bidireccional. Se muestran diferencias estadísticamente significativas: *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

● **El ácido ginkgólico también bloquea la replicación del virus Zika**

Hasta ahora nuestros resultados sugerían que el ácido ginkgólico era capaz de afectar la replicación de diversos miembros del género *Alfavirus*. Para verificar si la actividad de este compuesto podría ser de amplio espectro, decidimos evaluar el efecto de ácido ginkgólico en el virus Zika (ZIKV), un importante miembro del género *Flavivirus*. Para ello, pretratamos las células con ácido ginkgólico o DMSO y las infectamos con los distintos virus. En diferentes períodos de tiempo, cuantificamos la producción de partículas de ZIKV. En este experimento observamos una clara reducción de los títulos virales en ambos tiempos de infección, en las células tratadas con ácido ginkgólico (Figura 25A). Además, este efecto fue dependiente de la concentración del compuesto (Figura 25B). Para corroborar si la actividad virucida observada con los alfavirus también ocurría en ZIKV, incubamos 10^5 UFP del virus con ácido ginkgólico o DMSO disuelto en MEM durante 1h a 37° , y después cuantificamos las partículas virales de cada condición experimental. Nuestros resultados revelan que el ácido ginkgólico también afecta fuertemente la infectividad de ZIKV (Figura 25C). Finalmente, llevamos a cabo un experimento de tiempo de adición como explicamos previamente, para determinar la etapa en el ciclo de vida

de ZIKV, que podría estar afectando el ácido ginkgólico. Tal y como observamos con los alfavirus, el ácido ginkgólico solo inhibe la replicación de ZIKV cuando es agregado en las primeras 2h, indicando que el compuesto afecta una etapa temprana de la replicación (Figura 25D). En su conjunto, estos resultados indican que el ácido ginkgólico también afecta la replicación de ZIKV y podría tener una actividad antiviral de amplio espectro.

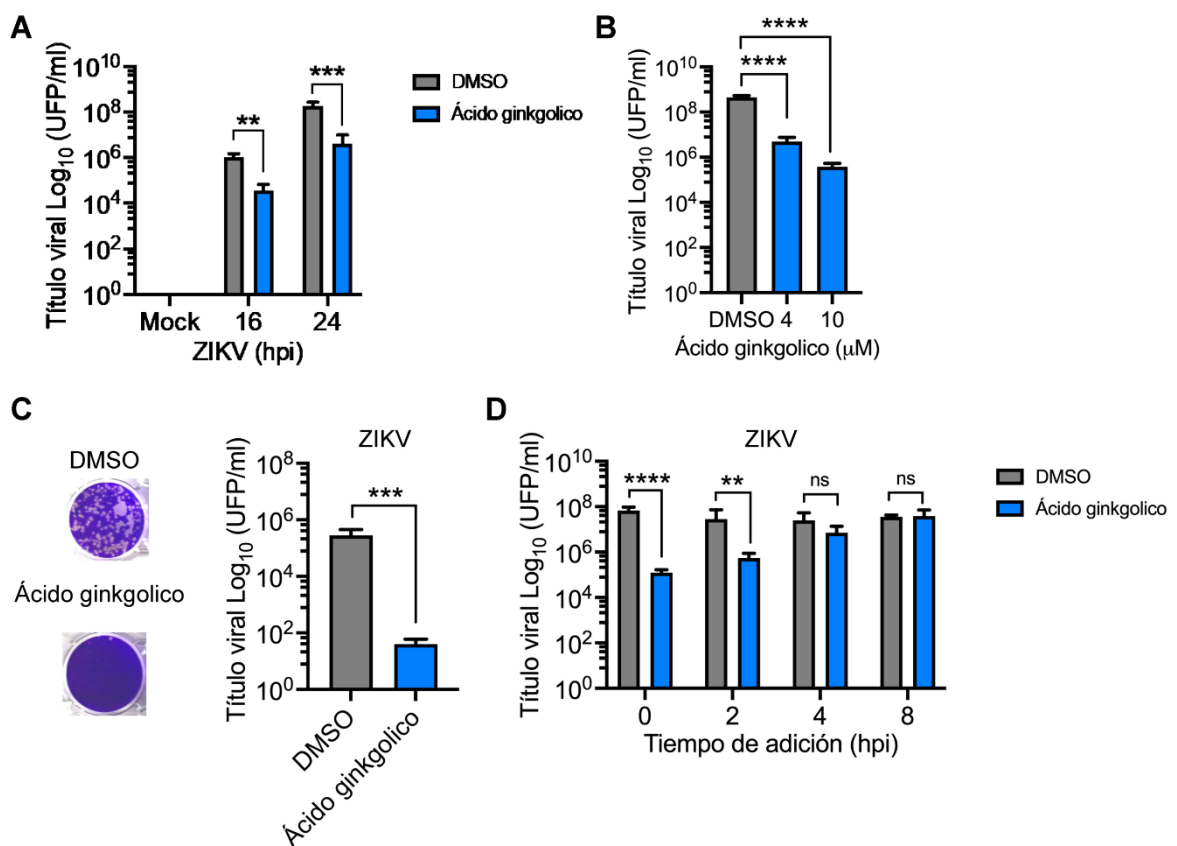
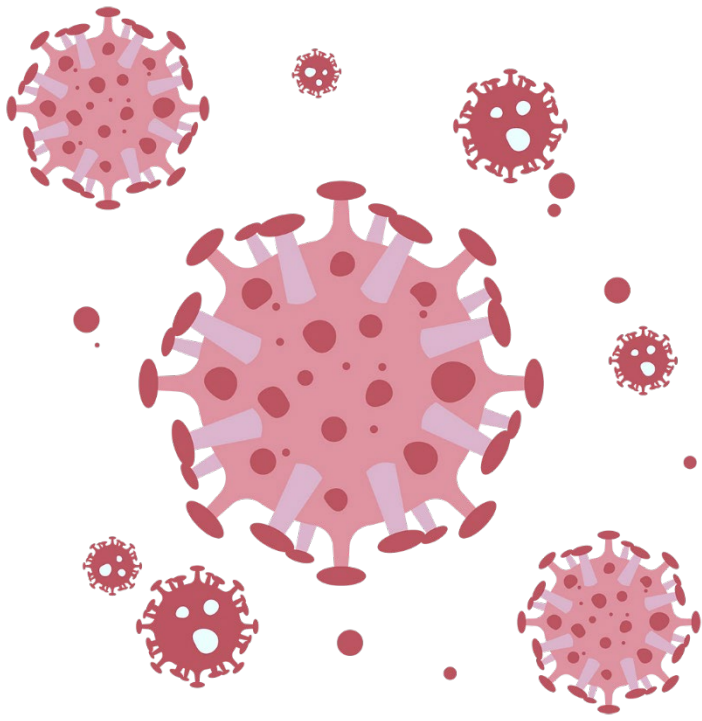


Figura 25. El ácido ginkgólico también inhibe la replicación del virus del Zika. (A) Las células Vero se trataron previamente con 10 μM de ácido Ginkgólico o 1 % DMSO. Después de 1 hora de incubación, se retiró el medio de tratamiento y las células se infectaron con ZIKV con una multiplicidad de infección (MOI) de 10. Luego, se añadió medio fresco con ácido Ginkgólico o DMSO a las células y se incubaron durante 16 o 24 hpi. La producción de progenie viral en los sobrenadantes celulares se midió como se mencionó anteriormente. **(B)** Las células Vero se trataron previamente con concentraciones crecientes de ácido Ginkgólico y luego se infectaron con ZIKV como se mencionó anteriormente. Los títulos

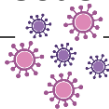
virales en los sobrenadantes celulares se cuantificaron como se describió anteriormente. **(C)** 10^5 UFP de ZIKV se incubaron en un medio libre de suero con ácido Gínggólico o DMSO como se describió anteriormente. El virus restante en ambas condiciones experimentales se cuantificó mediante un ensayo de formación de placa. **(D)** Las células Vero se infectaron con ZIKV; después de 1 hora de absorción del virus, se añadió ácido Gínggólico a las células en los momentos indicados. La producción viral se evaluó como se describió anteriormente. Los títulos virales se expresaron como unidades formadoras de placa por mililitro (PFU/ml). Los datos se analizaron con la prueba ANOVA unidireccional o bidireccional y la prueba Mann & Whitney. Se muestran diferencias estadísticamente significativas: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns: no significativas.



CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

Discusión



Los virus transmitidos por artrópodos constituyen un importante problema de salud pública a nivel mundial, ya que se han relacionado con factores como las actividades humanas, interacción vector-huésped, aumento del comercio, los viajes aéreos intercontinentales y un aumento en la tasa de recombinación viral. Al no existir un tratamiento específico contra estos virus y tampoco vacuna para combatirlos tenemos como consecuencia que las enfermedades causadas por estos arbovirus han surgido en nuevas regiones del mundo debido a que las cepas son más adaptables y en su gran mayoría adquiridas en países tropicales (Gómez-Calderón et al., 2017). Debido a la amenaza que esto representa para la salud pública es fundamental la identificación de potenciales moléculas antivirales que permitan combatir estas infecciones.

Es por ello que el objetivo primordial de este trabajo de investigación era explorar la posible actividad antiviral del ácido ginkgólico contra los arbovirus MAYV, UNAV, CHIKV y ZIKV. Nuestros resultados indican que el ácido ginkgólico es capaz de reducir la replicación de todos los virus estudiados de manera dependiente de la dosis. Estudios previos revelan que este compuesto tiene múltiples actividades biológicas, como un aumento en la actividad apoptótica y antiproliferativa en una gran cantidad de modelos de cáncer (ZHAO et al., 2013), efecto antibacteriano (Hua et al., 2017) y antiinflamatorio (Li et al., 2018). Además, existe evidencia que funciona como ansiolítico y antiestrés ya que inhibe la actividad de la enzima

monoamino oxidasa y eleva las concentraciones de serotonina (White et al., 1996; Satyan et al., 1998).

La eficacia de estos compuestos depende, entre otras cosas, de obtener concentraciones inhibitorias en el sitio de la infección (Romero et al., 2016). Es por ello que inicialmente decidimos realizar un ensayo de viabilidad celular con MTT en donde probamos la citotoxicidad del fármaco a diferentes concentraciones para descartar cualquier efecto adverso sobre nuestras líneas celulares utilizadas. Es evidente que con la concentración máxima estudiada (10 μ M), no había una disminución en la viabilidad de las líneas celulares HeLa y Vero.

Para evaluar el efecto de estos compuestos sobre los virus estudiados, realizamos una cinética de infección y en diferentes períodos de tiempo, tras el tratamiento con ácido ginkgólico o DMSO, se evaluó la producción de progenie viral. Nuestros resultados indican que hay una reducción significativa en los rendimientos virales para todos los virus probados. Para confirmar estos resultados, evaluamos la presencia de antígenos virales en las células que fueron infectadas con los tres virus, tratadas o no tratadas con ácido ginkgólico mediante un ensayo de inmunofluorescencia. Estos ensayos revelaron que efectivamente el tratamiento con ácido ginkgólico promueve una disminución considerable en el porcentaje de células que muestran una tinción positiva para los antígenos virales. Además, encontramos que el efecto del ácido ginkgólico era dependiente de la dosis.

En vista de que este compuesto de origen natural mediante su mecanismo de acción podría interferir en alguna de las fases de la infección y la replicación de los arbovirus estudiados (Romero et al., 2016), decidimos investigar el efecto virucida de ácido ginkgólico sobre MAYV, UNAV, CHIKV y ZIKV. En estos experimentos

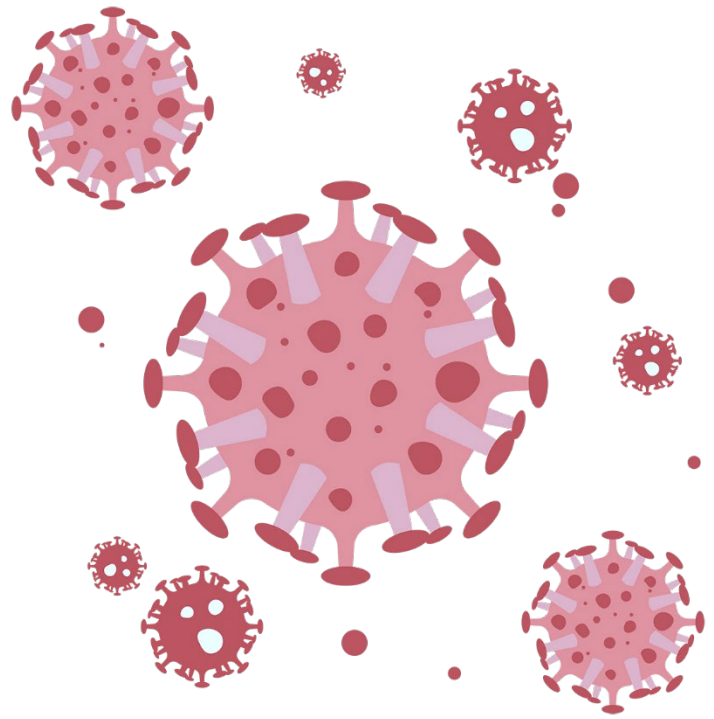
observamos que efectivamente el ácido ginkgólico tiene un fuerte efecto en la capacidad infectiva de las partículas virales. Otros trabajos han demostrado que algunos compuestos naturales también son capaces de inhibir a través de una actividad directa (Bryan et al., 2017) (Wenchun et al., 2017) (Weber et al., 2015). (Jiménez-Posada et al., 2021) (Pretell et al., 2016).

Debido a que los ensayos anteriormente realizados habían sido solo con pre-tratamiento decidimos determinar que ocurría si tratábamos las células a distintos tiempos después que el virus había entrado a la célula, y para ello realizamos un ensayo de tiempo adición. En estos experimentos observamos que en el caso de MAYV y CHIKV solamente había un efecto cuando las células se trataban hasta 2 horas después de la infección lo que quiere decir que el ácido ginkgólico podría estar actuando en una etapa temprana, sin embargo, con UNAV se observó una pequeña diferencia, pero significativa aun tratando cuatro horas después.

Debido a que observamos un efecto antiviral aún después de la absorción viral, quisimos explorar si esos compuestos estaban afectando la expresión de las proteínas virales E1 y nsP1. Nuestros resultados revelan que cuando tratamos con ácido ginkgólico en había una bajada muy fuerte de la expresión de las proteínas virales de MAYV, UNAV y CHIKV. Esto se ha observado previamente con otros virus (Borenstain et al., 2020).

Hasta ahora nuestros resultados indican que el compuesto ácido ginkgólico era capaz de inhibir a miembros de un mismo grupo dentro de la familia *Togaviridae* los *Alphavirus*, así nos preguntamos si este compuesto podría tener una actividad sobre otros virus. Para ello probamos específicamente el virus Zika perteneciente a la familia *Flaviviridae*. En estos experimentos observamos que el ácido ginkgólico

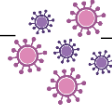
también era capaz de disminuir la progenie viral de ZIKV, y este efecto fue dosis dependiente. Además, este compuesto tiene un efecto directo sobre las partículas de ZIKV ya que se observa una fuerte disminución de los títulos virales. Finalmente, al igual que lo observado con los Alfavirus, notamos que el ácido ginkgólico afecta una etapa temprana de la replicación. Todos estos resultados sugieren que el ácido ginkgólico podría ser un antiviral de amplio espectro.



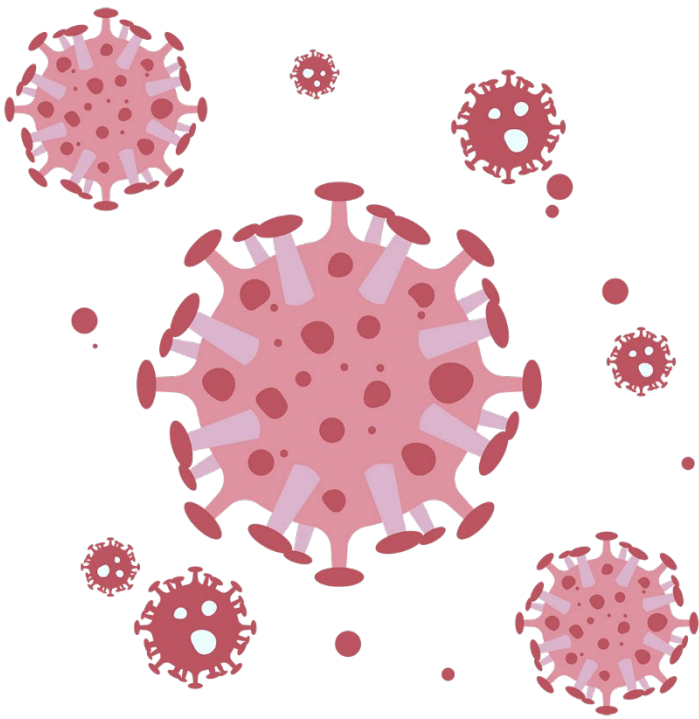
CAPÍTULO V

CONCLUSIÓN

CONCLUSIÓN



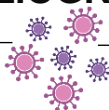
- El ácido ginkgólico no es toxico para las células Vero o HeLa.
- El ácido ginkgólico inhibe la replicación de los 3 alfavirus CHIKV, MAYV y UNAV.
- La disminución en los títulos de los Alfavirus es dependiente de la concentración del ácido ginkgólico.
- El ácido ginkgólico tiene un efecto directo sobre la infectividad de las partículas de los distintos virus.
- El ácido ginkgólico inhibe la replicación de todos los virus en una etapa temprana.
- El ácido ginkgólico afecta la expresión de las proteínas virales E1 y NSP1 de los alfavirus estudiados.
- El ácido ginkgólico también afecta la replicación del flavivirus Zika.



CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

BIBLIOGRAFÍA



- Abdelnabi, R., Staveness, D., Near, K. E., Wender, P. A., Delang, L., Neyts, J., & Leyssen, P. (2016). Comparative analysis of the anti-chikungunya virus activity of novel bryostatin analogs confirms the existence of a PKC-independent mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 120, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.020>
- Acosta-Ampudia, Y., Monsalve, D. M., Rodríguez, Y., Pacheco, Y., Anaya, J. M., & Ramírez-Santana, C. (2018). Mayaro: an emerging viral threat? In *Emerging Microbes and Infections* (Vol. 7, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0163-5>
- Acosta-Reyes, J., Navarro-Lechuga, E., & Martínez-Garcés, J. C. (2015). Enfermedad por el virus del Chikungunya: historia y epidemiología Chikungunya fever: history and epidemiology. *Barranquilla (Col.)*, 31(3), 621–630. <https://doi.org/10.14482/sun.31.3.7486>
- Aguilar, E. C., Troyo, A., & Arguedas, Ó. C. (2020). Chikungunya: un virus que nos acecha. *Acta Médica Costarricense*, 57(1), 7–15. <https://doi.org/10.51481/amc.v57i1.863>
- Ai, J. W., Zhang, Y., & Zhang, W. (2016). Zika virus outbreak: “A perfect storm.” *Emerging Microbes and Infections*, 5(2016), 6–9. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.42>
- ANDERSON, C. R., DOWNS, W. G., WATTLEY, G. H., AHIN, N. W., & REESE, A. A. (1957). Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation

- from blood of patients in Trinidad, B.W.I. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 6(6), 1012–1016.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1957.6.1012>
- Arredondo-García, J., Méndez-Herrera, A., Medina-Cortina, H., & H, M.-C. (2016). Arbovirus in Latin America. *Acta Pediatr Mex*, 37(2), 111–131.
<https://doi.org/111-131>
 - Barba Evia, J. R. (2015). Fiebre chikungunya. Es acaso la próxima amenaza? *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*, 62(1), 20–32.
 - Berg, K., Braun, C., Krug, I., & Schrenk, D. (2015). Evaluation of the cytotoxic and mutagenic potential of three ginkgolic acids. *Toxicology*, 327, 47–52.
<https://doi.org/10.1016/J.TOX.2014.10.001>
 - Bilia, A. R. (2002). Ginkgo biloba L. *Fitoterapia*, 73(3), 276–279.
[https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00071-0](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00071-0)
 - Bogotá-sierra, M. A., Cortés-pirazán, L. J., Sierra-vargas, A. C., & M, J. (2017). *Virus mayaro : un arbovirus que amenaza a Colombia*. 5, 98–108.
 - Bunney, P. E., Zink, A. N., Holm, A. A., Billington, C. J., & Kotz, C. M., Daniel E Shumer, Natalie J Nokoff, N. P. S., Bunney, P. E., Zink, A. N., Holm, A. A., Billington, C. J., & Kotz, C. M., & O'connor. (2017). HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.008.Zika>
 - Cabezas, C., & García, P. (2017). Diagnosis of Zika virus infection. *Anales de La Facultad de Medicina*, 78(1), 89.

- Campos, G. S., Bandeira, A. C., & Sardi, S. I. (2015). Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 21(10), 1885–1886. <https://doi.org/10.3201/eid2110.150847>
- Cao-Lormeau, V. M. (2014). RE: Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerging Infectious Diseases*, 20(11), 1960. <https://doi.org/10.3201/eid2011.141380>
- Carrera, J. P., Díaz, Y., Denis, B., Barahona de Mosca, I., Rodriguez, D., Cedeño, I., Arauz, D., González, P., Cerezo, L., Moreno, L., García, L., Sáenz, L. E., Atencio, M. A., Rojas-Fermin, E., Vizcaino, F., Perez, N., Moreno, B., López-Vergès, S., Valderrama, A., & Armién, B. (2017). Unusual pattern of chikungunya virus epidemic in the Americas, the Panamanian experience. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(2), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005338>
- CAUSEY, O. R., CASALS, J., SHOPE, R. E., & UDOMSAKDI, S. (1963). Aura and Una, Two New Group a Arthropod-Borne Viruses. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 12, 777–781. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1963.12.777>
- Cervantes-Acosta, G., & Sanjuán-Vergara, H. (2016). Virus chikungunya: Características virales y evolución genética. *Salud Uninorte*. <https://doi.org/10.14482/sun.32.2.8834>
- Chen, S. X., Wu, L., Jiang, X. G., Feng, Y. Y., & Cao, J. P. (2008). Anti-Toxoplasma gondii activity of GAS in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, 118(3), 503–507. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.05.023>

- Coronell, W., Arteta, C., Suárez, A., Burgos, C., Rubio, T., Sarmiento, M., & Corzo, C. (2016). Infección por virus del Zika en el embarazo, impacto fetal y neonatal. *Revista Chilena de Infectología*, 33(6), 665–673.
- De Oliveira Mota, M. T., Ribeiro, M. R., Vedovello, D., & Nogueira, M. L. (2015). Mayaro virus: A neglected arbovirus of the Americas. *Future Virology*, 10(9), 1109–1122. <https://doi.org/10.2217/fvl.15.76>
- Diamond, B. J., Shiflett, S. C., Feiwel, N., Matheis, R. J., Noskin, O., Richards, J. A., & Schoenberger, N. E. (2000). Ginkgo biloba extract: Mechanisms and clinical indications. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 81(5), 668–678. <https://doi.org/10.1053/mr.2000.3840>
- Didier Musso et. al. (2016). City of New Orleans Zika Virus Plan. *Nature*, 11(1), 10–20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15.Address>
- Ehsani, N., Vihinen, H., Kujala, P., & Ika, A. (2001). Biogenesis of the Semliki Forest Virus RNA Replication Complex. *Society*, 75(8), 3873–3884. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.8.3873>
- Engla, N. E. W., & Journal, N. D. (2016). *New engla nd journal*. 601–604.
- Espinal, M. A., Andrus, J. K., Jauregui, B., Waterman, S. H., Morens, D. M., Santos, J. I., Horstick, O., Francis, L. A., & Olson, D. (2019). Emerging and reemerging aedes-transmitted arbovirus infections in the region of the americas: Implications for health policy. *American Journal of Public Health*, 109(3), 387–392. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2018.304849>
- Espinoza, M. M. (2017). Aspectos clínicos de la infección por el virus zika
Clinical manifestations of the Zika virus infection. *An Fac Med*, 78(1), 79–82.

- Esposito, D. L. A., & Fonseca, B. A. L. da. (2017). Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 21(5), 540–544. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.06.002>
- Forrester, N. L., Palacios, G., Tesh, R. B., Savji, N., Guzman, H., Sherman, M., Weaver, S. C., & Lipkin, W. I. (2012). Genome-Scale Phylogeny of the Alphavirus Genus Suggests a Marine Origin. *Journal of Virology*, 86(5), 2729–2738. <https://doi.org/10.1128/JVI.05591-11>
- Frias Salcedo, J. A. (2014). Artículo de revisión aspectos clínico epidemiológicos de la infección por Virus Chikungunya. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 34(4), 149–154.
- Friedman, R. M., Levin, J. G., Grimley, P. M., & Berezsky, I. K. (1972). Membrane-associated replication complex in arbovirus infection. *Journal of Virology*, 10(3), 504–515.
- Froshauer, S., Kartenbeck, J., & Helenius, A. (1988). on the RNA Replicase Is Located Alphavirus of Endosomes Surface and Lysosomes Cytoplasmic. *The Journal of Cell Biology*, 107(6), 2075–2086. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050220>
- Galindo, P., Srihongse, S., De Rodaniche, E., & Grayson, M. A. (1966a). An ecological survey for arboviruses in Almirante, Panama, 1959-1962. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1966.15.385>

- Galindo, P., Srihongse, S., De Rodaniche, E., & Grayson, M. A. (1966b). An ecological survey for arboviruses in Almirante, Panama, 1959-1962. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1966.15.385>
- Gillespie, L. K., Hoenen, A., Morgan, G., & Mackenzie, J. M. (2010). The Endoplasmic Reticulum Provides the Membrane Platform for Biogenesis of the Flavivirus Replication Complex. *Journal of Virology*, *84*(20), 10438–10447. <https://doi.org/10.1128/jvi.00986-10>
- Gomatos, P. J., Kaariainen, L., Keranen, S., Ranki, M., & Sawicki, D. L. (1980). Semliki Forest virus replication complex capable of synthesizing 42S and 26S nascent RNA chains. *Journal of General Virology*, *49*(1), 61–69. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-1-61>
- Gómez-Calderón, C., Mesa-Castro, C., Robledo, S., Gómez, S., Bolivar-Avila, S., Diaz-Castillo, F., & Martínez-Gutierrez, M. (2017). 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*, *17*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1562-1>
- Gonzales Collantes, S. (2017). Situación epidemiológica del virus zika. Epidemiological situation of the Zika virus. *Anales de La Facultad de Medicina*, *78*(1), 73–78.
- González-Santamaría, J., Campagna, M., García, M. A., Marcos-Villar, L., González, D., Gallego, P., Lopitz-Otsoa, F., Guerra, S., Rodríguez, M. S.,

- Esteban, M., & Rivas, C. (2011a). Regulation of vaccinia virus E3 protein by small ubiquitin-like modifier proteins. *Journal of Virology*, 85(24). <https://doi.org/10.1128/JVI.05628-11>
- González-Santamaría, J., Campagna, M., García, M. A., Marcos-Villar, L., González, D., Gallego, P., Lopitz-Otsoa, F., Guerra, S., Rodríguez, M. S., Esteban, M., & Rivas, C. (2011b). Regulation of vaccinia virus E3 protein by small ubiquitin-like modifier proteins. *Journal of Virology*, 85(24). <https://doi.org/10.1128/JVI.05628-11>
 - Grimley, P. M., Berezesky, I. K., & Friedman, R. M. (1968). Cytoplasmic structures associated with an arbovirus infection: loci of viral ribonucleic acid synthesis. *Journal of Virology*, 2(11), 1326–1338.
 - Haddow, A. D., Nasar, F., Guzman, H., Ponlawat, A., Jarman, R. G., Tesh, R. B., & Weaver, S. C. (2016). Genetic Characterization of Spondweni and Zika Viruses and Susceptibility of Geographically Distinct Strains of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to Spondweni Virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(10), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005083>
 - Hayes, E. B. (2009). Zika virus outside Africa. *Emerging Infectious Diseases*, 15(9), 1347–1350. <https://doi.org/10.3201/eid1509.090442>
 - Hefti, E., Bishop, D. H., Dubin, D. T., & Stollar, V. (1975). 5' nucleotide sequence of sindbis viral RNA. *Journal of Virology*, 17(1), 149–159.
 - Hennessey, M., Fischer, M., & Staples, J. E. (2016). Zika Virus Spreads to New Areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016. *MMWR*.

Morbidity and Mortality Weekly Report, 65(3), 1–4.

<https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6503e1er>

- Helen L. White, Philip W. Scates, Barrett R. Cooper, Extracts of ginkgo biloba leaves inhibit monoamine oxidase, *Life Sciences*, Volume 58, Issue 16, 1996, Pages 1315-1321, ISSN 0024-3205, [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(96\)00097-5](https://doi.org/10.1016/0024-3205(96)00097-5).
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0024320596000975>)
- Holland Cheng, R., Kuhn, R. J., Olson, N. H., Rossmann[^]Hok-Kin Choi, M. G., Smith, T. J., & Baker, T. S. (1995). Nucleocapsid and glycoprotein organization in an enveloped virus. *Cell*, 80(4), 621–630. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90516-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90516-2)
- Hua, Z., Wu, C., Fan, G., Tang, Z., & Cao, F. (2017). The antibacterial activity and mechanism of ginkgolic acid C15:1. *BMC Biotechnology*, 17(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0324-3>
- Huang, Y. J. S., Higgs, S., Horne, K. M. E., & Vanlandingham, D. L. (2014). Flavivirus-Mosquito interactions. *Viruses*, 6(11), 4703–4730. <https://doi.org/10.3390/v6114703>
- Ibrahim, M. A., Ramadan, H. H., & Mohammed, R. N. (2021). Evidence that Ginkgo Biloba could use in the influenza and coronavirus COVID-19 infections. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 32(3), 131–143. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2020-0310>
- Janeiro, R. De, Grande, R., & Paulo, S. (2015). Epidemiological Update - Zika Virus Infection. *Emerging Infectious Diseases*, October, 1–7.

- Jiménez-Posada, E. V., Robledo, S., & Martínez-Gutiérrez, M. (2021). Identificación de compuestos antiarbovirus mediante bioprospección de plantas nativas colombianas de la familia solanaceae y análisis metabólico de la respuesta celular frente al efecto antiviral. *Iatreia*, 34, S-21-S-22.
- Johnson, A. J., Martin, D. A., Karabatsos, N., & Roehrig, J. T. (2000). Detection of anti-arboviral immunoglobulin G by using a monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(5), 1827–1831. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.5.1827-1831.2000>
- Kuno, G., & Chang, G. J. J. (2007). Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Archives of Virology*, 152(4), 687–696. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0903-z>
- Laureti, M., Narayanan, D., Rodriguez-Andres, J., Fazakerley, J. K., & Kedzierski, L. (2018). Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. *Frontiers in Immunology*, 9(September), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02180>
- Levinson, R. S., Strauss, J. H., & Strauss, E. G. (1990). Complete sequence of the genomic RNA of O'nyong-nyong virus and its use in the construction of alphavirus phylogenetic trees. *Virology*, 175(1), 110–123.
- Li, J., Li, A., Li, M., Liu, Y., Zhao, W., & Gao, D. (2018). Ginkgolic acid exerts an anti-inflammatory effect in human umbilical vein endothelial cells induced by ox-LDL. *Pharmazie*, 73(7), 408–412. <https://doi.org/10.1681/ph.2018.8397>

- Liu, Z. H., & Zeng, S. (2009). Cytotoxicity of ginkgolic acid in HepG2 cells and primary rat hepatocytes. *Toxicology Letters*, 187(3), 131–136. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2009.02.012>
- Llamas-González, Y. Y., Campos, D., Pascale, J. M., Arbiza, J., & González-Santamaría, J. (2019a). A Functional Ubiquitin-Proteasome System is Required for Efficient Replication of New World Mayaro and Una Alphaviruses. *Viruses*, 11(4), 370. <https://doi.org/10.3390/v11040370>
- Llamas-González, Y. Y., Campos, D., Pascale, J. M., Arbiza, J., & González-Santamaría, J. (2019b). A Functional Ubiquitin-Proteasome System is Required for Efficient Replication of New World Mayaro and Una Alphaviruses. *Viruses*, 11(4), 370. <https://doi.org/10.3390/v11040370>
- Lü, J. M., Yan, S., Jamaluddin, S., Weakley, S. M., Liang, Z., Siwak, E. B., Yao, Q., & Chen, C. (2012). Ginkgolic acid inhibits HIV protease activity and HIV infection in vitro. *Medical Science Monitor*, 18(8), 293–298. <https://doi.org/10.12659/MSM.883261>
- Ludert, J. E., Pujol, F. H., & Arbiza, J. (2017). Human virology in Latin America: From biology to control. In *Human Virology in Latin America: From Biology to Control* (pp. 1–474). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-54567-7>
- Ma, J., Duan, W., Han, S., Lei, J., Xu, Q., Chen, X., Jiang, Z., Nan, L., Li, J., Chen, K., Han, L., Wang, Z., Li, X., Wu, E., & Huo, X. (2015). Ginkgolic acid suppresses the development of pancreatic cancer by inhibiting pathways driving lipogenesis. *Oncotarget*, 6(25), 20993–21003. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3663>

- Macias, J. C., López, M., Fletes, A., & Cambero, E. (2014). Virus de Chikungunya, una amenaza latente para la salud pública de México. *Salud Jalisco*, 1(2), 118–127.
- Mayer, S. V, Tesh, R. B., & Vasilakis, N. (2017). Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information. *Acta Tropica*, 166(January), 155–183.
- Mejía, C.-R., & López-Vélez, R. (2018). Alfavirus tropicales artritogénicos. *Reumatología Clínica*, 14(2), 97–105.
<https://doi.org/10.1016/j.reuma.2017.01.006>
- Metz, S. W., Geertsema, C., Martina, B. E., Andrade, P., Heldens, J. G., Van Oers, M. M., Vlak, J. M., & Pijlman, G. P. (2011). Functional processing and secretion of Chikungunya virus E1 and E2 glycoproteins in insect cells. *Virology Journal*, 8(1), 353. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-353>
- Monteagudo, J. L. G. (2020). *Vegetales Antivirales*. 1–51.
- Morabito, K. M., & Graham, B. S. (2017). Zika Virus Vaccine Development. *Journal of Infectious Diseases*, 216(Suppl 10), S957–S963.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jix464>
- Mota, M. T. O., Vedovello, D., Estofolete, C., Malossi, C. D., Araújo, J. P., & Nogueira, M. L. (2015). Complete Genome Sequence of Mayaro Virus Imported from the Amazon Basin to São Paulo State, Brazil. *Genome*

Announcements, 3(6), e01341-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01341-15>

- MsC. Yaima Esperanza Pérez Campos,. (2014). 18(10), 1467–1474.
- Muñoz, M., & Navarro, J. C. (2012). Virus Mayaro: un arbovirus reemergente en Venezuela y Latinoamérica. *Biomédica*, 32(2), 288–302. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i2.647>
- Murray, N. E. A., Quam, M. B., & Wilder-Smith, A. (2013). Epidemiology of dengue: Past, present and future prospects. *Clinical Epidemiology*, 5(1), 299–309. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S34440>
- Navarrete-espinosa, J., & Gómez-dantés, H. (2006). *Arbovirus causales de fiebre hemorrágica en pacientes del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 347–353.
- Navarro, J. C., Ponce, P., & Cevallos, V. (2013). Dos nuevos registros de vectores potenciales de Fiebre Amarilla selvática y Mayaro para el Ecuador. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 53(1), 77–81.
- Navarro, P., Antonia de la Parte, M., Dentale, L., Medina, S., Reyes, H. H., Lobatón, K., Chang, A., & Reyes, H. E. (2016). Mayaro: La cuarta arbovirosis de relevancia médica descrita en Venezuela TRABAJO ORIGINAL RESUMEN. *Bol Venez Infectol*, 27, 2016.
- Noelia, J. A. (n.d.). *Artículo original Estudios serológicos de Virus Una y Mayaro (Alphavirus), en humanos de la localidad de Orán, Salta Argentina*. 1–8.

- Oliveira Melo, A. S., Malinger, G., Ximenes, R., Szejnfeld, P. O., Alves Sampaio, S., & Bispo De Filippis, A. M. (2016). Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: Tip of the iceberg? *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 47(1), 6–7. <https://doi.org/10.1002/uog.15831>
- OPS, C. (2016). *Zika - Actualización Epidemiológica*.
- Organización Panamericana de la salud (OPS)/ Organización Mundial de la Salud (OMS)/Proyecto Integración y Desarrollo Mesoamérica (PM).(2016). *Plan maestro estratégico de gestión integrada para el control y prevención del Dengue, Chikungunya, Zika en Panamá, 1-52*.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2002). Estrategias de la OMS sobre Medicina Tradicional 2002-2005. *Organización Mundial de La Salud*, 1–65.
- Pando, V., Ortega, A., & Huerta, H. (2020). Mosquitos vectores de arbovirus. *Ciencia*, 71(1), 24–33.
- Pauff, S. M., & Miller, S. C. (2012). NIH Public Access. *Bone*, 78(2), 711–716. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.07.004>.Chikungunya
- Peralta, P. H., & Shelokov, A. (1966). Isolation and characterization of arboviruses from Almirante, Republic of Panama. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 15(3), 369–378. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1966.15.369>

- Pialoux, G., Gaüzère, B.-A., Jauréguiberry, S., & Strobel, M. (2007). Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 7(5), 319–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70107-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70107-X)
- Pielnaa, P., Al-Saadawe, M., Saro, A., Dama, M. F., Zhou, M., Huang, Y., Huang, J., & Xia, Z. (2020). Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. *Virology*, 543(February), 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.01.015>
- Powers, A. M., Aguilar, P. V., Chandler, L. J., Brault, A. C., Meakins, T. A., Watts, D., Russell, K. L., Olson, J., Vasconcelos, P. F. C., Da Rosa, A. T., Weaver, S. C., & Tesh, R. B. (2006a). Genetic relationships among Mayaro and Una viruses suggest distinct patterns of transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(3), 461–469. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.75.461>
- Powers, A. M., Aguilar, P. V., Chandler, L. J., Brault, A. C., Meakins, T. A., Watts, D., Russell, K. L., Olson, J., Vasconcelos, P. F. C., Da Rosa, A. T., Weaver, S. C., & Tesh, R. B. (2006b). Genetic relationships among Mayaro and Una viruses suggest distinct patterns of transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(3), 461–469.
- Powers, A. M., Aguilar, P. V., Chandler, L. J., Brault, A. C., Meakins, T. A., Watts, D., Russell, K. L., Olson, J., Vasconcelos, P. F. C., Da Rosa, A. T., Weaver, S. C., & Tesh, R. B. (2006c). Genetic relationships among Mayaro

and Una viruses suggest distinct patterns of transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(3), 461–469.

- Powers, A. N. N. M., Brault, A. C., Shirako, Y., Ellen, G., Kang, W., Strauss, J. H., Scott, C., Powers, A. N. N. M., & Strauss, E. G. (2001). Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses. *Journal of Virology*, 75(21), 10118–10131. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.21.10118>
- Pretell, C. M., Serrano, L. N. R., & Salgado, C. C. (2016). Promising new approaches in the treatment against the chikungunya virus. *Salud Uninorte*, 32(2), 276–291. <https://doi.org/10.14482/sun.32.2.8833>
- Qiao, L., Zheng, J., Jin, X., Wei, G., Wang, G., Sun, X., & Li, X. (2017). Ginkgolic acid inhibits the invasiveness of colon cancer cells through AMPK activation. *Oncology Letters*, 14(5), 5831–5838. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6967>
- Renato, I., Carrasco, Z., & Lozano, J. C. (2107). Virus Mayaro: una nueva amenaza para el continente americano. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica, Vm*, 1–13.
- Report, S. (2016). *WHO.Zika virus, microcephaly and Guillain-Barre syndrome. Situation report 05-January-2017. Available from: <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/17-march-2016/en/>. Last Accessed 2017 on 18 January.* 1–13.
- Restrepo-Jaramillo, B. N. (2014). Infección por el virus del Chikungunya. *CES Medicina*, 28(2), 313–324.

- Rey, J. R., & Lounibos, P. (2015). Ecología de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en América y transmisión enfermedades. *Biomedica*, *35*(2), 177–185. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i2.2514>
- Romero, H. R., Rojas, P. N., Parte-pérez, M. A. De, & Villegas, Y. (2016). *Agentes antivirales*. *27*, 65–78.
- Ross, R. W. (1956). The newala epidemic: III. The virus: Isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *Journal of Hygiene*, *54*(2), 177–191. <https://doi.org/10.1017/S0022172400044442>
- Saisawang, C., Saitornuang, S., Sillapee, P., Ubol, S., Smith, D. R., & Ketterman, A. J. (2015). Chikungunya nsP2 protease is not a papain-like cysteine protease and the catalytic dyad cysteine is interchangeable with a proximal serine. *Scientific Reports*, *5*(October), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep17125>
- Salonen, A., Vasiljeva, L., Merits, A., Magden, J., Jokitalo, E., & Kääriäinen, L. (2003). Properly folded nonstructural polyprotein directs the semliki forest virus replication complex to the endosomal compartment. *Journal of Virology*, *77*(3), 1691–1702. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.3.1691>
- Salud, O. P. de la. (2017). *Salud de las Américas*. *2017*, *22*(c), 260.
- Schlesinger, M. J., & Schlesinger, S. (1973). Large-molecular-weight precursors of sindbis virus proteins. *J Virol*, *11*(6), 1013–1016.
- Schlesinger, S., & Schlesinger, M. J. (1972). Formation of Sindbis virus proteins: identification of a precursor for one of the envelope proteins. *J Virol*, *10*(5), 925–932.

- Shirako, Y., & Strauss, J. H. (1994). Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis. *Journal of Virology*, 68(3), 1874–1885.
- Silva, L. A., & Dermody, T. S. (2017). Chikungunya virus: Epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *Journal of Clinical Investigation*, 127(3), 737–749. <https://doi.org/10.1172/JCI84417>
- Simizu, B., Yamamoto, K., Hashimoto, K., & Ogata, T. (1984). Structural proteins of Chikungunya virus. *J Virol*, 51(1), 254–258.
- Sirohi, D., & Kuhn, R. J. (2017). Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *Journal of Infectious Diseases*, 216(Suppl 10), S935–S944. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix515>
- Smith, J. L., Pugh, C. L., Cisney, E. D., Keasey, S. L., Guevara, C., Ampuero, J. S., Comach, G., Gomez, D., Ochoa-Diaz, M., Hontz, R. D., & Ulrich, R. G. (2018). Human Antibody Responses to Emerging Mayaro Virus and Cocirculating Alphavirus Infections Examined by Using Structural Proteins from Nine New and Old World Lineages. *MSphere*, 3(2), 1–14. <https://doi.org/10.1128/msphere.00003-18>
- Song, B. H., Yun, S. I., Woolley, M., & Lee, Y. M. (2017). Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *Journal of Neuroimmunology*, 308, 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.03.001>

- Spuul, P., Salonen, A., Merits, A., Jokitalo, E., Kaariainen, L., & Ahola, T. (2007). Role of the Amphipathic Peptide of Semliki Forest Virus Replicase Protein nsP1 in Membrane Association and Virus Replication. *Journal of Virology*, 81(2), 872–883. <https://doi.org/10.1128/JVI.01785-06>
- Srihongse, S., Stacy, H. G., & Gauld, J. R. (1973). A Survey to Assess Potential Human Disease Hazards Along Proposed Sea Level Canal Routes in Panamá and Colombia. IV. Arbovirus Surveillance in Man. *Military Medicine*, 138(7), 422–426. <https://doi.org/10.1093/milmed/138.7.422>
- Strauss, J. H., & Strauss, E. G. (1994). The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiological Reviews*, 58(3), 491–562. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.090936>
- Strauss, J. H., & Strauss, E. G. (2020). *Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . January.*
- Suhrbier, A., Jaffar-Bandjee, M. C., & Gasque, P. (2012). Arthritogenic alphaviruses-an overview. *Nature Reviews Rheumatology*, 8(7), 420–429. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.64>
- Torres, J. R., Russell, K. L., Vasquez, C., Barrera, R., Tesh, R. B., Salas, R., & Watts, D. M. (2004). Family cluster of Mayaro fever, Venezuela. In *Emerging Infectious Diseases* (Vol. 10, Issue 7, pp. 1304–1306). <https://doi.org/10.3201/eid1007.030860>

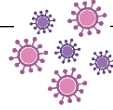
- Torres, J. R., Russell, K. L., Vasquez, C., Barrera, R., Tesh, R. B., Salas, R., Watts, D. M., Cluster of Mayaro Fever, F., Azevedo, R. S., Silva, E. V., Carvalho, V. L., Rodrigues, S. G., Nunes Neto, J. P., Monteiro, H. A., Peixoto, V. S., Chiang, J. O., Nunes, M. R., & Vasconcelos, P. F. (2010). Alerta epidemiológica: Brote de fiebre mayaro en las Américas. *Clinical Infectious Diseases*, 28(1), 67–73.
- Valdés, M. Á. S. (2016). Fiebre por virus Mayaro: Una alerta necesaria. In *Revista Habanera de Ciencias Medicas* (Vol. 15, Issue 4, pp. 494–496).
- Van Beek, T. A., & Wintermans, M. S. (2001). Preparative isolation and dual column high-performance liquid chromatography of ginkgolic acids from *Ginkgo biloba*. *Journal of Chromatography A*, 930(1–2), 109–117. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01194-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01194-3).
- Walder, R., Suarez, O. M., & Calisher, C. H. (1984). Arbovirus studies in the Guajira region of Venezuela: Activities of eastern equine encephalitis and Venezuelan equine encephalitis viruses during an interepizootic period. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 33(4), 699–707. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1984.33.699>.
- Weaver, S. C. (2014). Arrival of Chikungunya Virus in the New World: Prospects for Spread and Impact on Public Health. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(6), 6–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002921>.
- Weber Christopher, Katja Sliva, Christine von Rhein, Beate M. Kümmerer, Barbara S. Schnierle, The green tea catechin, epigallocatechin gallate inhibits

chikungunya virus infection, *Antiviral Research*, Volume 113, 2015, Pages 1-3, ISSN 0166-3542, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.11.001>.

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354214003118>)

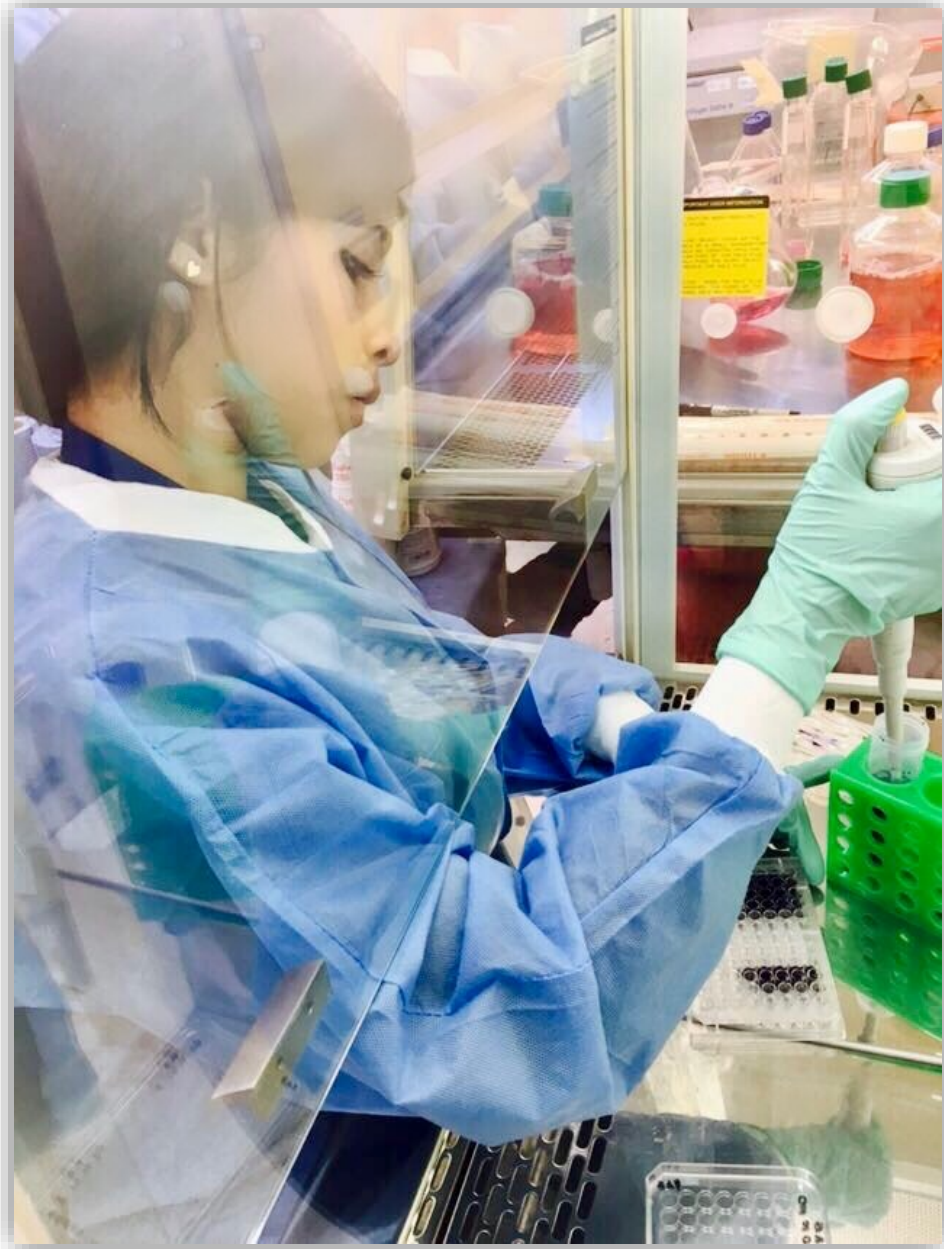
- Zanluca, C., De Melo, V. C. A., Mosimann, A. L. P., Dos Santos, G. I. V., dos Santos, C. N. D., & Luz, K. (2015). First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(4), 569–572. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150192>
- Zhang, W., Mukhopadhyay, S., Pletnev, S. V, Baker, T. S., Kuhn, R. J., Michael, G., & Rossmann, M. G. (2002). Placement of the Structural Proteins in Sindbis Virus Placement of the Structural Proteins in Sindbis Virus. *Journal of Virology*, 76(22), 11645–11658. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.22.11645>
- ZHAO, X.-D., DONG, N., MAN, H.-T., FU, Z.-L., ZHANG, M.-H., KOU, S., & MA, S.-L. (2013). Antiproliferative effect of the Ginkgo biloba extract is associated with the enhancement of cytochrome P450 1B1 expression in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Biomedical Reports*, 1(5), 797–801. <https://doi.org/10.3892/br.2013.150>
- Сулейманова, З. Н. (2009). Адаптация Ginkgo biloba при интродукции в Ботаническом саду-институте УНЦ РАН. *Аграрная Россия*, 6–II, 105–107. <https://doi.org/10.30906/1999-5636-2009-0-105-107>

ANEXOS



Este trabajo de tesis forma parte de la siguiente publicación:




Campos, D., Navarro, S., Llamas-González, Y.Y., Sugasti, M. and González-Santamaría, J. **2020**. Broad antiviral activity of ginkgolic acid against Chikungunya, Mayaro, Una y Zika viruses. *Viruses*, 12 (4), 449.



“Todos tus sueños pueden hacerse realidad si tienes el coraje de perseguirlos”

Article

Broad Antiviral Activity of Ginkgolic Acid against Chikungunya, Mayaro, Una, and Zika Viruses

Dalkiria Campos ¹, Susana Navarro ¹, Yessica Yadira Llamas-González ^{1,2} ,
Madelaine Sugasti ¹  and José González-Santamaría ^{1,*} 

¹ Grupo de Biología Celular y Molecular de Arbovirus, Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Panamá 0816-02593, Panamá; dcampos@gorgas.gob.pa (D.C.); nsusana09@gmail.com (S.N.); qfb.y.llamas@gmail.com (Y.Y.L.-G.); madelaine313@gmail.com (M.S.)

² Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad de la República, Montevideo 11200, Uruguay

* Correspondence: jgonzalezsantamaria@gorgas.gob.pa; Tel.: +507-527-4814

Received: 26 March 2020; Accepted: 12 April 2020; Published: 15 April 2020



Abstract: The alphaviruses Chikungunya (CHIKV), Mayaro (MAYV), Una (UNAV), and the flavivirus Zika (ZIKV) are emerging or re-emerging arboviruses which are responsible for frequent epidemic outbreaks. Despite the large impact of these arboviruses on health systems, there are no approved vaccines or treatments to fight these infections. As a consequence, there is an urgent need to discover new antiviral drugs. Natural products are a rich source of compounds with distinct biological activities, including antiviral properties. Thus, we aimed to explore the potential antiviral activity of Ginkgolic acid against the arboviruses CHIKV, MAYV, UNAV, and ZIKV. Viral progeny production in supernatants from cells treated or not treated with Ginkgolic acid was quantified by plaque-forming assay. Ginkgolic acid's direct virucidal activity against these arboviruses was also determined. Additionally, viral protein expression was assessed using Western blot and immunofluorescence. Our results reveal that Ginkgolic acid promotes a dose-dependent decrease in viral titers in all tested viruses. Moreover, the compound demonstrated strong virucidal activity. Finally, we found that viral protein expression was affected by treatment with this drug. Collectively, these findings suggest that Ginkgolic acid could have broader antiviral activity.

Keywords: alphaviruses; chikungunya; Mayaro; Una; flavivirus; zika; ginkgolic acid; replication; inhibition

1. Introduction

The *Alphavirus* (*Togaviridae* family) and *Flavivirus* (*Flaviviridae* family) genera are arthropod-borne viruses (arboviruses) with a widespread distribution in tropical and subtropical countries [1]. Both genera are enveloped single-stranded RNA viruses of positive polarity with genomes ranging from 10 to 12 kilobases in length [2,3]. Some members of these genera, including the Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV), and Zika (ZIKV) viruses, are efficiently transmitted by the same vector, mosquitoes of the *Aedes* genus [4,5]. Furthermore, in recent years, several members of these viral genera have emerged as important human pathogens that have caused severe epidemic outbreaks at a regional or global level [6].

Within the *Alphavirus* genus, 31 species of viruses have been identified and classified into 11 different complexes based on their antigenic characteristics [7,8]. According to this classification, CHIKV, Mayaro (MAYV) and Una (UNAV) have been grouped within the Selimki Forest antigenic complex [8]. Typically, these arthritogenic viral infections are associated with symptoms such as fever, headache, myalgia, retro-orbital pain, rash, joint pain and in some cases, limiting and long-lasting polyarthralgia [9,10]. Recently, severe clinical manifestations, including fatal outcomes, have been

observed in patients infected with CHIKV, suggesting that some *Alphavirus* infections have the potential to produce serious disease [11,12].

On the other hand, the *Flavivirus* genus includes medically important pathogens such as DENV, Yellow fever virus (YFV), West Nile virus (WNV), Japanese encephalitis virus (JEV) and ZIKV [13]. Before its introduction in Brazil in 2015, ZIKV was thought to only cause mild infection [14]. However, following the outbreak in Brazil, ZIKV infection was correlated with serious neurological disorders, including microcephaly in newborns and the appearance of Guillain-Barré syndrome in adults [15]. Despite the large impact of these arbovirus infections on the health systems of affected countries and the frequent emergence of new viral pathogens, there are currently no approved treatments or vaccines to combat these infections. As a result, there is an urgent need to identify new broad-acting antiviral drugs.

With regard to identifying new potential drugs, natural products are a rich source of molecules with diverse biological activities [16]. Ginkgolic acid is a natural compound isolated from the seed coats or leaves of *Ginkgo biloba*, a plant that is widely used in traditional Chinese medicine [17]. Earlier reports have shown that Ginkgolic acid has antitumoral [18,19], antibacterial [20] and antiparasitic activity [21], as well as antiviral activity against human immunodeficiency virus (HIV) [22]. Moreover, this compound is able to inhibit SUMOylation, a post-translational protein modification that regulates key processes in the cell [23]. Nonetheless, Ginkgolic acid's ability to disrupt arbovirus replication remains unexplored. The aim of this study was to evaluate the antiviral activity of Ginkgolic acid against the arboviruses CHIKV, MAYV, UNAV, and ZIKV.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Line Cultures and Reagents

Vero (CCL-81), Vero-E6 (CRL-1586, both obtained from ATCC, Manassas, VA, USA) and HeLa cells (kindly provided by Dr. Carmen Rivas, CIMUS, Spain) were grown in Minimal Essential Medium (MEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM of L-Glutamine and 1% penicillin-streptomycin antibiotic solution (Gibco, Waltham, MA, USA). Cell lines were cultured at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere. Ginkgolic acid C15:1 [(Z)-6-(Pentadec-8-enyl)-2-hydroxybenzoic acid, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA] was dissolved in Dimethyl sulfoxide (DMSO) at a 10 mM concentration and stored at -20 °C until use. Working solutions of Ginkgolic acid were prepared in MEM at the indicated concentrations.

2.2. Virus Strains and Propagation

Mayaro (MAYV, AVR0565, San Martin, Peru) [24] and Una (UNAV, BT-1495-3, Bocas del Toro, Panama) [25] strains were obtained from the World Reference Center for Emerging Viruses and Arboviruses (WRCEVA) at University of Texas Medical Branch (UTMB), USA, and kindly provided by Dr. Scott Weaver. Chikungunya (CHIKV, Panama_256137_2014) [26] and Zika (ZIKV, 259249) strains were isolated from patient sera during Chikungunya and Zika outbreaks in Panama in 2014 and 2015, respectively. Virus strains were propagated, titrated, aliquoted and stored as previously described [27].

2.3. Cytotoxicity Analysis

Ginkgolic acid toxicity was assessed following the procedures of a previous study [27]. Briefly, 2.5×10^4 Vero or HeLa cells grown in 96-well plates in MEM without phenol red were treated with DMSO or Ginkgolic acid at a concentration of 0, 1 or 10 µM for 24 h. Then, 5 mg/mL of 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, Aldrich, Saint Louis, MI, USA) was added to the cells, and they were incubated for 4 h. Formazan crystals were dissolved in a solution of 4 mM HCl and 10% Triton X-100 in isopropanol, and absorbance was determined at 570 nm using a microplate reader spectrophotometer (BioTek, Winooski, VT, USA). Results are shown as the percentage of viable cells relative to untreated control cells.

2.4. Virus Plaque-Forming Assay

Viral titers in cell supernatants were quantified by plaque-forming assay as previously reported [27]. Briefly, 10-fold serial dilutions of infected cell supernatants were used to infect Vero-E6 (MAYV and UNAV) or Vero cells (CHIKV and ZIKV) grown in 6-well plates and incubated for 1 h at 37 °C. After virus absorption, the viruses were removed and the cells were overlaid with a solution of agar (1%) in MEM supplemented with 2% FBS and incubated for 3 days at 37 °C. Then, the agar was removed and the cells were fixed with 4% formaldehyde solution in PBS and stained with 2% crystal violet prepared in 30% methanol. Finally, the number of plaques was counted, and the viral titers were reported as plaque-forming units per milliliter (PFU/mL).

2.5. Viral Infection Assays

Viral infection experiments were performed in HeLa or Vero cells seeded in 12- or 24-well plates pre-treated with DMSO or Ginkgolic acid. We used a multiplicity of infection (MOI) of 1 or 10 for each virus tested, and the cells were incubated with DMSO or Ginkgolic acid at the indicated concentrations and times. Cell supernatants were harvested to quantify the viral titers using a plaque-forming assay. For the virucidal activity experiments, approximately 10^5 or 10^6 PFU of CHIKV, MAYV, UNAV or ZIKV were incubated in serum-free MEM with 10 μ M of Ginkgolic acid for 1h at 37 °C. Then, the virus particles were quantified as stated above. Additionally, protein extracts from infected cells under the different experimental conditions were obtained for protein analysis.

2.6. Immunofluorescence Assay

Vero or HeLa cells cultivated on glass coverslips were infected with CHIKV, MAYV or UNAV at an MOI of 1. Following 24 h of infection, cells were fixed with 2% paraformaldehyde in PBS buffer for 20 min and permeabilized with 0.25% Triton-X100. Then, the cells were blocked in 2% bovine serum albumin solution in PBS for 20 min and stained overnight at 4 °C with anti-CHIKV, anti-MAYV or anti-UNAV mouse ascitic fluid (kindly provided by Dr. Scott Weaver, WRCEVA-UTMB, USA). Afterward, cells were incubated with a Goat anti-mouse secondary antibody (Alexa Flour 488, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 1 h in the dark. Finally, coverslips were mounted on slides with Prolong Diamond Antifade Mountant with Dapi (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and the images were captured with an FV1000 Flowview Confocal microscope (Olympus, Lombard, IL, USA). The pictures were analyzed with ImageJ software. The number of virus-positive cells were estimated in at least 10 fields and denoted as the percentage of positive cells.

2.7. Protein Analysis

Viral protein expression was assessed by Western blot as previously described [27]. Briefly, Vero or HeLa cells were infected with CHIKV, MAYV or UNAV and after 1 h of virus absorption, 10 μ M Ginkgolic acid or 0.1% DMSO, both dissolved in fresh MEM, were added to the cells. Then, at different times post-infection, protein extracts were obtained in Laemmli buffer with 10% Dithiothreitol (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Proteins were fractionated in SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blocked in a 5% non-fat milk solution in T-TBS buffer for 30 min. Membranes were incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: rabbit polyclonal anti-E1, rabbit polyclonal anti-nsP1 (both of which were previously validated against alphaviruses in our laboratory [27]), and mouse monoclonal anti- β -actin (8H10D10, Cat. # 3700, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Next, the membranes were washed 3 times in T-TBS buffer and incubated with HRP-conjugated goat anti-rabbit (Cat. # 926-80011) or goat anti-mouse (Cat. # 926-80010) secondary antibodies (LI-COR, Lincoln, NE, USA) at room temperature for 1 h. Finally, the membranes were incubated with SignalFire™ ECL Reagent (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) for 5 min and the quimioluminescent signal was detected with a C-Digit scanner (LI-COR, Lincoln, NE, USA).

2.8. Statistical Analysis

Data were analyzed with the Mann & Whitney test and One- or Two-way ANOVA test using GraphPad Prism Software version 8.4.0 for Mac. A p value < 0.05 was considered as statistically significant. All experiments were performed at least 3 times with 3 replicates. For each experiment, mean and standard deviation are shown.

3. Results

3.1. Ginkgolic Acid Reduces Alphavirus Progeny Yield

To examine the effect of Ginkgolic acid on alphavirus replication, we performed a kinetic infection in Vero or HeLa cells. The cells were pre-treated with Ginkgolic acid or DMSO for 1 h; then we removed the medium with the treatments, and the cells were infected with CHIKV, MAYV or UNAV. After 1 h of virus absorption, we added Ginkgolic acid or DMSO in fresh medium and viral progeny production in the cell supernatants was quantified by plaque-forming assay at the indicated times post-infection. As shown in Figure 1A–C, we observed a time-dependent increase in viral titers in DMSO-treated cells. On the other hand, in Ginkgolic acid-treated cells we found a significant reduction in viral yields for all tested viruses (Figure 1A–C). In order to confirm these results, we evaluated the presence of viral antigens in infected cells treated or not treated with Ginkgolic acid using immunofluorescence. These assays revealed that Ginkgolic acid treatment promotes a considerable decrease in the percentage of cells that demonstrate positive staining for the viral antigens (Figure 1D–E). To discard the possibility that the observed effect of Ginkgolic acid on viral replication was due to drug cytotoxicity, we assessed cell viability in Vero or HeLa cells incubated with different concentrations of the compound using the MTT method. In these experiments, we did not see a significant decline in cell viability after 24 h of incubation with Ginkgolic acid (Figure S1). Taken together, these results indicate that Ginkgolic acid affects the alphaviruses' progeny yields.

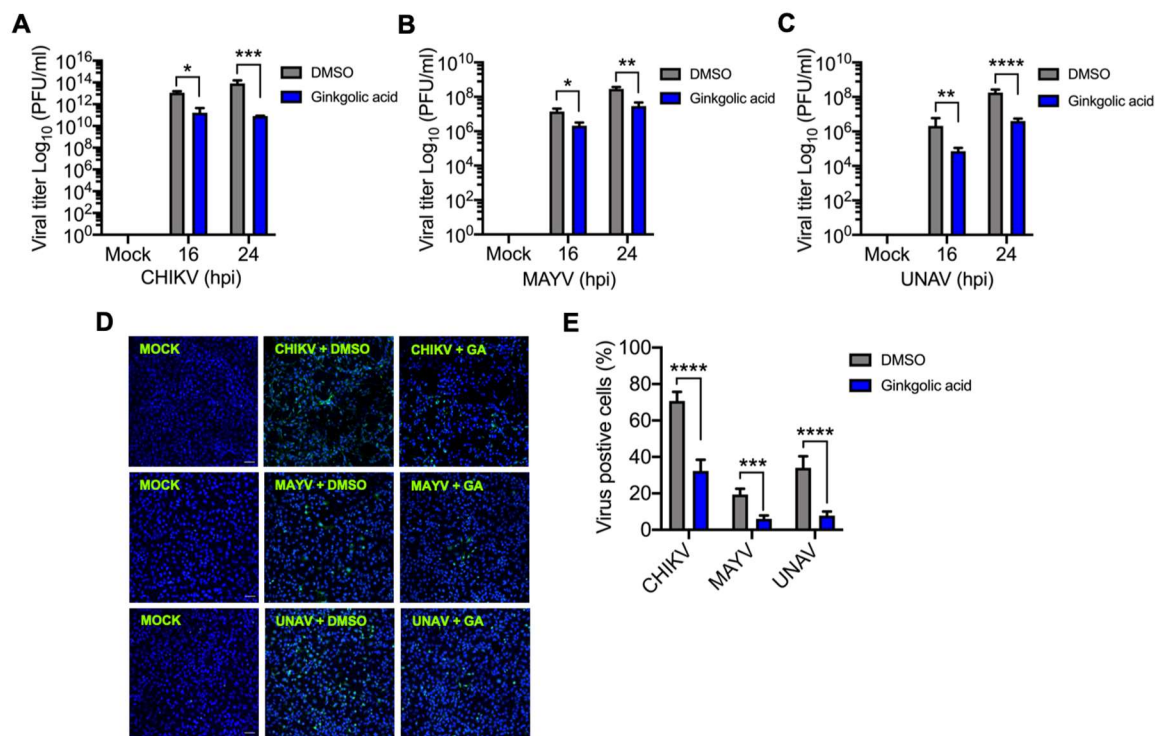


Figure 1. Ginkgolic acid impairs *Alphavirus* progeny production. Vero (A) and HeLa (B,C) cells were pre-treated with Ginkgolic acid at 10 μ M or 0.1% DMSO as a control for 1 h. Then, the medium with the treatment was removed and the cells were infected with CHIKV, MAYV or UNAV at an MOI of 10. After 1 h of virus absorption, fresh medium was added with Ginkgolic acid or DMSO and the cells were incubated for 16 or 24 h post-infection (hpi). Viral progeny yield in cell supernatants collected at indicated times were quantified by plaque-forming assay. Viral titers were represented as plaque-forming units per milliliter (PFU/mL). Statistically significant differences were assessed with the Two-way ANOVA test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$. (D,E) Vero or HeLa cells grown on glass cover slips were pre-treated with Ginkgolic acid or DMSO and then infected with the *Alphavirus* at an MOI of 1. After 24 h of incubation with the treatment, cells were fixed and stained with anti-CHIKV, anti-MAYV or anti-UNAV mouse primary antibodies, followed by an Alexa-Fluor 488 mouse secondary antibody. Cell nuclei were stained with Dapi (in blue). Images were obtained with a confocal microscope and analyzed with ImageJ software. The percentage of viral antigen-positive cells was evaluated in at least 10 fields for each experimental condition. These data were analyzed with the Two-way ANOVA test. Statistically significant differences are shown: *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$. Scale bar, 50 μ m.

3.2. *Alphavirus* Titer Decrease Is Ginkgolic Acid Concentration-Dependent

To evaluate whether *Alphavirus* progeny reduction is affected by drug concentration, we pre-treated Vero or HeLa cells with different concentrations of Ginkgolic acid before being infected with CHIKV, MAYV or UNAV, and the viral progeny production was measured as above. The viral progeny yields in DMSO-treated cells reached between 10^8 and 10^{12} PFU/mL, depending on the *Alphavirus* being tested (Figure 2). However, in Ginkgolic acid-treated cells, we found a significant dose-dependent decrease in viral titers (Figure 2).

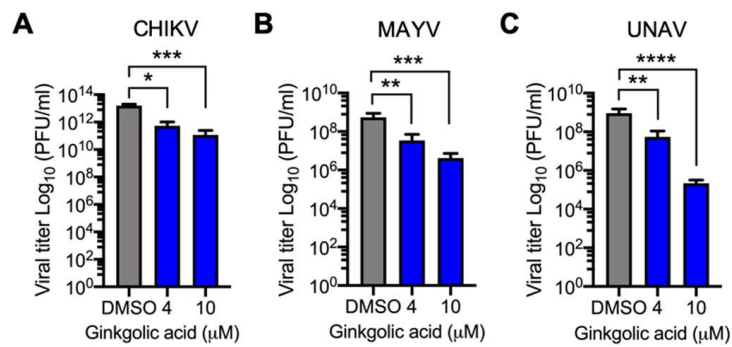


Figure 2. Ginkgolic acid's effect on viral yield is concentration-dependent. Vero (A) and HeLa (B,C) cells were pre-treated with increasing concentrations of Ginkgolic acid and infected with CHIKV, MAYV or UNAV as previously described. After 24 h of incubation with the treatment or DMSO, production of infectious viral particles was quantified as previously described. Viral titers were represented as plaque-forming units per milliliter (PFU/mL). Experimental data were analyzed with the One-way ANOVA Test. Statistically significant differences are shown: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

3.3. Virucidal Activity of Ginkgolic Acid against Alphavirus

In order to analyze if Ginkgolic acid has a direct effect on the infectivity of *Alphavirus* particles, we incubated 10⁶ PFU of CHIKV, MAYV or UNAV in serum-free medium with the Ginkgolic acid or DMSO at 37 °C for 1 h. Subsequently, the remaining virus in each experimental condition was quantified as previously indicated. As shown in Figure 3, Ginkgolic acid had a strong effect on viral infectivity; we found significant decreases of 4 to 5 logs in viral titers. These results suggest that Ginkgolic acid impairs the infectivity of *Alphavirus* particles.

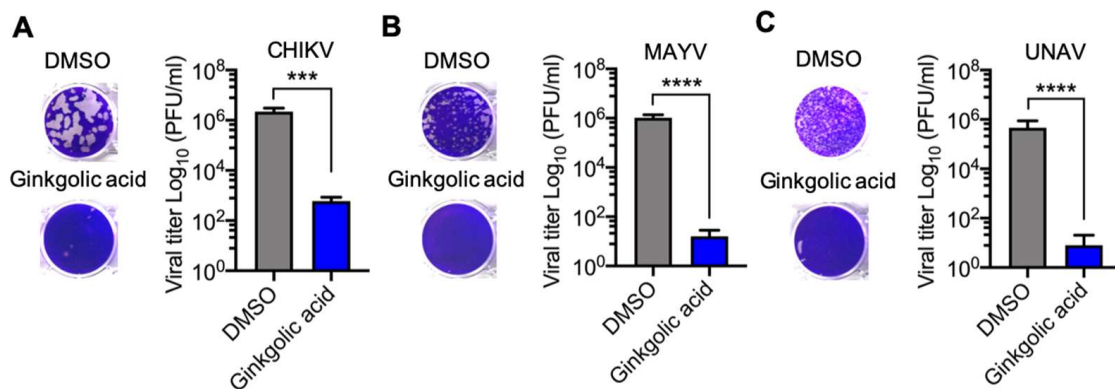


Figure 3. Ginkgolic acid alters *Alphavirus* particles' infectivity. Approximately, 10⁶ PFU of CHIKV (A), MAYV (B) or UNAV (C) were incubated in serum-free medium with Ginkgolic acid at 10 μM or 0.1% DMSO as a control for 1 h at 37 °C. Then, the alphaviruses were directly titrated in Vero or Vero-E6 cells and the remaining virus was quantified using a plaque-forming assay. Viral titers were represented as plaque-forming units per milliliter (PFU/mL). Data were analyzed using the Mann & Whitney test. Statistically significant differences are shown: *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

3.4. Ginkgolic Acid Disrupts an Early Stage in the Alphavirus Replication Cycle

Given that we observed an antiviral effect when we pre-treated the cells or directly incubated the viruses with Ginkgolic acid, we decided to determine if this molecule is able to block *Alphavirus* replication after virus absorption. To investigate this, we performed time addition experiments in which we added Ginkgolic acid or DMSO at indicated times after 1 h of virus absorption (time 0 hpi); then we collected the cell supernatants at 24 hpi to measure viral progeny yields. These assays revealed that Ginkgolic acid only promoted a decline in *Alphavirus* progeny yields when the drug was applied

in the first 2 hpi (Figure 4A–C). In the case of UNAV, we still noted a modest inhibitory effect at 4 hpi (Figure 4C). Altogether, these findings suggest that Ginkgolic acid inhibits *Alphavirus* replication at an early stage of the viral cycle.

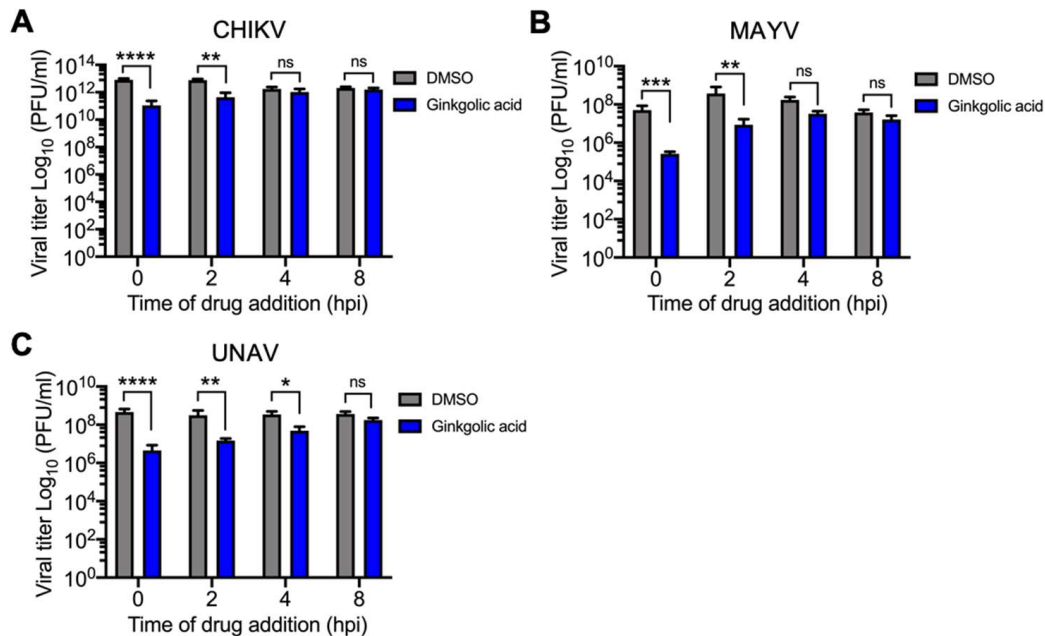


Figure 4. Ginkgolic acid prevents *Alphavirus* replication at an early stage of the viral cycle. Vero (A) or HeLa (B,C) cells were infected with CHIKV, MAYV, or UNAV and after 1 h of virus absorption, Ginkgolic acid or DMSO were applied to the cells at the indicated times. Then, the viral progeny production was measured in the cell supernatants after 24 h of incubation with the Ginkgolic acid or DMSO as previously indicated. The viral titers were expressed as plaque-forming units per milliliter (PFU/mL). Data were analyzed with the Two-way ANOVA test. Statistically significant differences are shown: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns: non-significant.

3.5. Ginkgolic acid Suppresses the Expression of *Alphavirus* Proteins

The previous results suggest that Ginkgolic acid could also have a negative effect on a post-entry step in the *Alphavirus* cycle. With respect to this, we wanted to explore other possible mechanisms by which Ginkgolic acid inhibits *Alphavirus* replication. Thus, we assessed the expression of viral proteins structural E1 and non-structural nsP1 in cell lysates obtained from cells infected with CHIKV, MAYV, or UNAV and treated with Ginkgolic acid or DMSO at different times. As shown in Figure 5A,C,E, we detected strong expression of both E1 and nsP1 proteins in DMSO-treated cells at 24 hpi for all evaluated alphaviruses. Conversely, Ginkgolic acid treatment resulted in a notable suppression of viral protein expression (Figure 5A,C,E). Furthermore, a semi-quantitative densitometric analysis for both viral proteins confirmed these findings (Figure 5B,D,F). Collectively, these results indicate that Ginkgolic acid affects the expression of *Alphavirus* proteins.

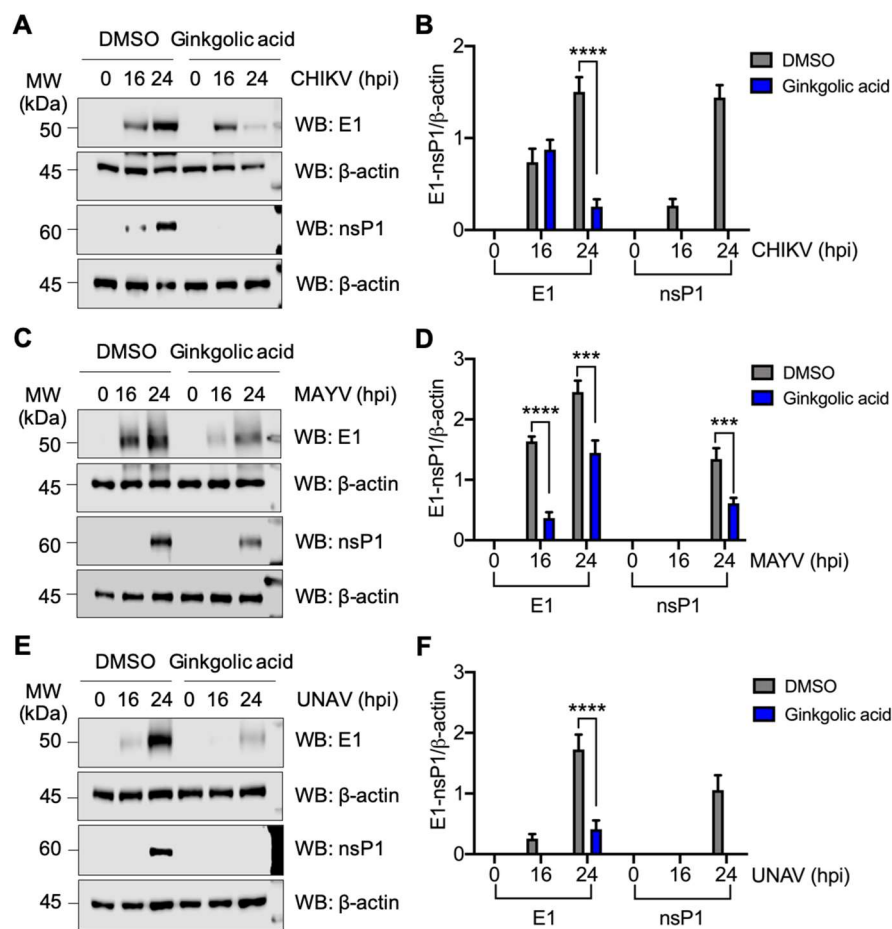


Figure 5. Ginkgolic acid affects alphavirus protein expression. Vero or HeLa cells were infected with CHIKV (A), MAYV (C), or UNAV (E) at an MOI of 10. After 1 h of virus absorption, Ginkgolic acid or DMSO were applied to the cells. At different times post-infection, the levels of E1 and nsP1 proteins were assessed by Western blot (WB). β -actin protein was used as a loading control. MW: Molecular weight. kDa: kilodaltons. B,D,F. Intensity bands for both E1 and nsP1 proteins were quantified using ImageJ software and normalized with β -actin protein. Data were analyzed with the Two-way ANOVA test. Statistically significant differences are shown: *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

3.6. Ginkgolic Acid also Blocks Zika Virus Replication

Since our results suggested that Ginkgolic acid is able to inhibit the replication of different closely related viruses within the *Alphavirus* genus, we tried to determine if this compound has broader antiviral activity. To test this hypothesis, we decided to analyze Ginkgolic acid's ability to affect the replication of the emerging *Flavivirus* ZIKV. To do this, Vero cells were pre-treated with Ginkgolic acid or DMSO as described earlier and infected at different times with ZIKV; then viral progeny production was measured by plaque-forming assay. In DMSO-treated cells, we observed a clear time-dependent increase in viral titers (Figure 6A). In contrast, in the Ginkgolic acid-treated cells, there was an appreciable reduction in viral progeny production in both tested times and this effect was dose-dependent (Figure 6A,B). To verify whether the virucidal activity of Ginkgolic acid observed with CHIKV, MAYV or UNAV also occurred with ZIKV, we incubated 10^5 PFU of the virus in serum-free medium that contained the drug or DMSO as a control. These experiments revealed again that Ginkgolic acid had a potent inhibitory effect on the virus' infectivity capacity (Figure 6C). Finally, we performed a time addition experiment as previously described to evaluate in which stage of the ZIKV life cycle the treatment was affecting. As shown in Figure 6D, we found that Ginkgolic acid only affected ZIKV replication when it was administered in the first 2 hpi as we observed in the experiments

with the alphaviruses. These findings indicate that Ginkgolic acid also exhibits inhibitory activity against ZIKV and suggests that this compound could have broader antiviral activity.

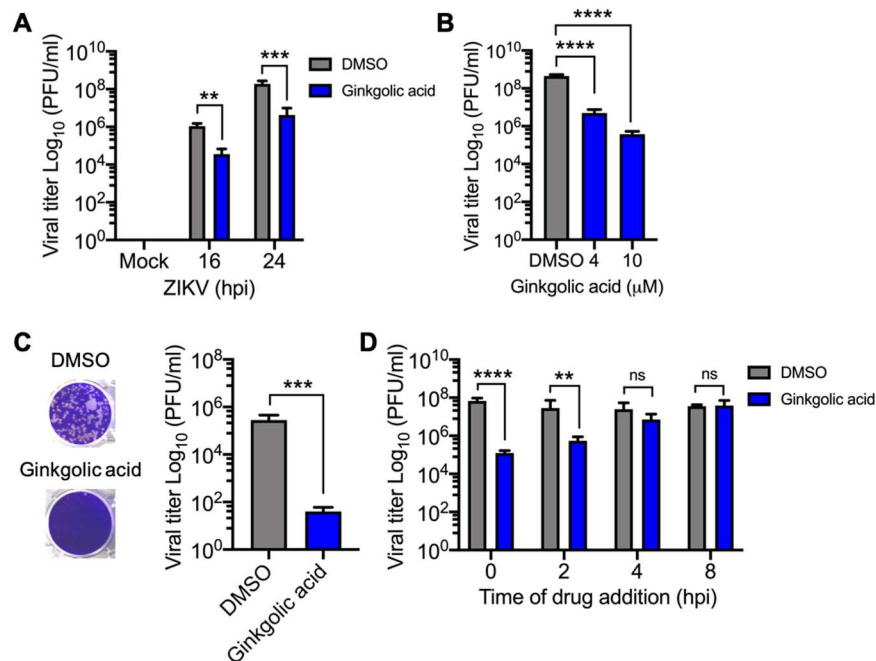


Figure 6. Ginkgolic acid also inhibits Zika virus (ZIKV) replication. (A) Vero cells were pre-treated with 10 μM Ginkgolic acid or 0.1% DMSO. After 1 h of incubation, the treatment medium was removed and the cells were infected with ZIKV at a multiplicity of infection (MOI) of 10. Then, fresh medium with Ginkgolic acid or DMSO was added to the cells and they were incubated for 16 or 24 hpi. Viral progeny production in the cell supernatants was measured as previously mentioned. (B) Vero cells were pre-treated with increasing concentrations of Ginkgolic acid and then infected with ZIKV as above. Viral titers in cell supernatants were quantified as previously described. (C) Nearly 10⁵ PFU of ZIKV were incubated in serum-free medium with Ginkgolic acid or DMSO as described previously. The remaining virus in both experimental conditions was titrated using plaque-forming assay. (D) Vero cells were infected with ZIKV; after 1 h of virus absorption, Ginkgolic acid was added to the cells at the indicated times. Viral production was evaluated as previously described. Viral titers were expressed as plaque-forming units per milliliter (PFU/mL). Data were analyzed with the One- or Two-way ANOVA test and Mann & Whitney test. Statistically significant differences are shown: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns: non-significant.

4. Discussion

Emerging arboviruses represent a serious threat to global public health [28]. To date, there are no FDA-approved antivirals to combat these infections and protective vaccines are still being developed. In addition, the spread of several arboviruses to new territories and the increasing availability of arthropod vectors, frequently promotes outbreaks in high-risk regions [29,30]. As a consequence, there is an imperative demand to find new antivirals with potential broader activity.

In this study, we assessed the possible antiviral activity of the natural compound Ginkgolic acid against CHIKV, MAYV, UNAV, and ZIKV. Our results indicate that this drug is capable of reducing replication in a dose-dependent manner in all tested arboviruses. Previous studies suggest that Ginkgolic acid has diverse biological activities, among them, antibacterial [20], antiparasitic [21,31], anti-inflammatory [32] and antitumoral activity [18,19,33]. In addition, other studies have demonstrated that this molecule can inhibit HIV protease in a cell-free system and HIV infection in human peripheral blood mononuclear cells [22,34].

Given that several natural compounds have the ability to directly affect viral particles' infectivity, we explored the putative virucidal effect of Ginkgolic acid on arboviruses. These experiments show that Ginkgolic acid has a strong effect on infectivity for all the arboviruses evaluated. This is supported by previous reports of other natural molecules, such as Cucurmin, Epigallocatechin gallate, and Luteolin, demonstrating virucidal activity against ZIKV, CHIKV and JEV, respectively [35–37].

Natural molecules can disturb viral replication at different stages of the viral life cycle, including viral entry, viral protein expression, assembly and viral release [38–40]. With this in mind, we performed a time addition experiment to evaluate the impact of Ginkgolic acid on arbovirus life cycles. Our findings suggest that this compound affects the immediate early or early phase of virus replication. In connection with this, we decided to study alternative mechanisms by which Ginkgolic acid could prevent *Alphavirus* replication. Thus, we assessed the expression of viral proteins E1 and nsP1 using Western blot. These analyses suggest that Ginkgolic acid suppresses the expression of both viral proteins. Other studies have shown that natural compounds, such as Harringtonine can inhibit CHIKV replication through the suppression of viral protein expression.

Although our in vitro results suggest that Ginkgolic acid may have the potential to act as an antiviral drug, its transition toward a therapeutic use presents some important challenges. Some studies have revealed that Ginkgolic acid demonstrates cytotoxic activity at high concentrations in different cell lines [41,42]. Similar findings on cytotoxicity have been reported using animals [43]. However, one pharmacokinetic study showed that Ginkgolic acid can be detected at micromolar levels in rat plasma following oral administration of a small dose (10 mg/kg), suggesting that non-cytotoxic doses of this compound could be used in animal models to evaluate its possible antiviral activity [44]. With respect to this, further detailed studies are required to evaluate the efficacy and safety of this compound as an antiviral drug in an animal infection model. However, to our knowledge, this is the first time that Ginkgolic acid's broader antiviral activity against different arthropod-borne viruses has been demonstrated.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/1999-4915/12/4/449/s1>, Figure S1: Cytotoxicity evaluation of Ginkgolic acid in Vero or HeLa cells.

Author Contributions: Conceptualization, J.G.-S.; methodology, D.C., S.N., Y.Y.L.-G., M.S. and J.G.-S.; validation, D.C. and J.G.-S.; formal analysis, D.C. and J.G.-S.; investigation, D.C., S.N., Y.Y.L.-G., M.S. and J.G.-S.; resources, J.G.-S.; writing—original draft preparation, J.G.-S.; writing—review and editing, D.C., S.N., Y.Y.L.-G., M.S. and J.G.-S.; visualization, D.C. and J.G.-S.; supervision, J.G.-S.; project administration, J.G.-S.; funding acquisition, J.G.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by grants from Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de Panamá (SENACYT), grant FID017-2016, Ministerio de Economía y Finanzas, grant 0090044.060 and Ministerio de Salud (MINSA), Project 17-137. J.G.-S was supported by Sistema Nacional de Investigación (SNI from SENACYT).

Acknowledgments: We thank Scott Weaver (WRCEVA, UTMB, USA) for providing antibodies and Mayaro and Una virus strains. Brechla Moreno and Rodolfo Contreras for their support with the laboratory facilities, Leticia Franco for critical review of the manuscript, and all administrative personnel from ICGES for their assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Weaver, S.C. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: Mechanisms and potential strategies for prevention. *Trends Microbiol.* **2013**, *21*, 360–363. [CrossRef]
2. Leung, J.Y.; Ng, M.M.; Chu, J.J. Replication of alphaviruses: A review on the entry process of alphaviruses into cells. *Adv. Virol* **2011**, *2011*, 249640. [CrossRef] [PubMed]
3. Mazeaud, C.; Freppel, W.; Chatel-Chaix, L. The Multiples Fates of the Flavivirus RNA Genome During Pathogenesis. *Front. Genet.* **2018**, *9*, 595. [CrossRef] [PubMed]
4. Conway, M.J.; Colpitts, T.M.; Fikrig, E. Role of the Vector in Arbovirus Transmission. *Annu. Rev. Virol* **2014**, *1*, 71–88. [CrossRef] [PubMed]
5. Kauffman, E.B.; Kramer, L.D. Zika Virus Mosquito Vectors: Competence, Biology, and Vector Control. *J. Infect. Dis.* **2017**, *216*, S976–S990. [CrossRef]

6. Gould, E.; Pettersson, J.; Higgs, S.; Charrel, R.; de Lamballerie, X. Emerging arboviruses: Why today? *One Health* **2017**, *4*, 1–13. [[CrossRef](#)]
7. Rupp, J.C.; Sokoloski, K.J.; Gebhart, N.N.; Hardy, R.W. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *J. Gen. Virol* **2015**, *96*, 2483–2500. [[CrossRef](#)]
8. Martins, K.A.; Gregory, M.K.; Valdez, S.M.; Sprague, T.R.; Encinales, L.; Pacheco, N.; Cure, C.; Porras-Ramirez, A.; Rico-Mendoza, A.; Chang, A.; et al. Neutralizing Antibodies from Convalescent Chikungunya Virus Patients Can Cross-Neutralize Mayaro and Una Viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2019**, *100*, 1541–1544. [[CrossRef](#)]
9. Suhrbier, A.; Jaffar-Bandjee, M.C.; Gasque, P. Arthritogenic alphaviruses—an overview. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2012**, *8*, 420–429. [[CrossRef](#)]
10. Lwande, O.W.; Obanda, V.; Bucht, G.; Mosomtai, G.; Otieno, V.; Ahlm, C.; Evander, M. Global emergence of Alphaviruses that cause arthritis in humans. *Infect. Ecol. Epidemiol.* **2015**, *5*, 29853. [[CrossRef](#)]
11. Bonifay, T.; Prince, C.; Neyra, C.; Demar, M.; Rousset, D.; Kallel, H.; Nacher, M.; Djossou, F.; Epelboin, L.; Char Chik Working, g. Atypical and severe manifestations of chikungunya virus infection in French Guiana: A hospital-based study. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0207406. [[CrossRef](#)]
12. Brito, C.A.A. Alert: Severe cases and deaths associated with Chikungunya in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2017**, *50*, 585–589. [[CrossRef](#)]
13. Evans, M.V.; Murdock, C.C.; Drake, J.M. Anticipating Emerging Mosquito-borne Flaviviruses in the USA: What Comes after Zika? *Trends Parasitol.* **2018**, *34*, 544–547. [[CrossRef](#)]
14. Weaver, S.C.; Charlier, C.; Vasilakis, N.; Lecuit, M. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. *Annu. Rev. Med.* **2018**, *69*, 395–408. [[CrossRef](#)]
15. Vasconcelos, P.F.; Calisher, C.H. Emergence of Human Arboviral Diseases in the Americas, 2000–2016. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2016**, *16*, 295–301. [[CrossRef](#)]
16. Cragg, G.M.; Newman, D.J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 3670–3695. [[CrossRef](#)]
17. Van Beek, T.A.; Wintermans, M.S. Preparative isolation and dual column high-performance liquid chromatography of ginkgolic acids from Ginkgo biloba. *J. Chromatogr. A* **2001**, *930*, 109–117. [[CrossRef](#)]
18. Qiao, L.; Zheng, J.; Jin, X.; Wei, G.; Wang, G.; Sun, X.; Li, X. Ginkgolic acid inhibits the invasiveness of colon cancer cells through AMPK activation. *Oncol. Lett.* **2017**, *14*, 5831–5838. [[CrossRef](#)]
19. Ma, J.; Duan, W.; Han, S.; Lei, J.; Xu, Q.; Chen, X.; Jiang, Z.; Nan, L.; Li, J.; Chen, K.; et al. Ginkgolic acid suppresses the development of pancreatic cancer by inhibiting pathways driving lipogenesis. *Oncotarget* **2015**, *6*, 20993–21003. [[CrossRef](#)]
20. Hua, Z.; Wu, C.; Fan, G.; Tang, Z.; Cao, F. The antibacterial activity and mechanism of ginkgolic acid C15:1. *BMC Biotechnol.* **2017**, *17*, 5. [[CrossRef](#)]
21. Chen, S.X.; Wu, L.; Jiang, X.G.; Feng, Y.Y.; Cao, J.P. Anti-Toxoplasma gondii activity of GAS in vitro. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *118*, 503–507. [[CrossRef](#)]
22. Lu, J.M.; Yan, S.; Jamaluddin, S.; Weakley, S.M.; Liang, Z.; Siwak, E.B.; Yao, Q.; Chen, C. Ginkgolic acid inhibits HIV protease activity and HIV infection in vitro. *Med. Sci. Monit.* **2012**, *18*, BR293–BR298. [[CrossRef](#)]
23. Fukuda, I.; Ito, A.; Hirai, G.; Nishimura, S.; Kawasaki, H.; Saitoh, H.; Kimura, K.; Sodeoka, M.; Yoshida, M. Ginkgolic acid inhibits protein SUMOylation by blocking formation of the E1-SUMO intermediate. *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 133–140. [[CrossRef](#)]
24. Powers, A.M.; Aguilar, P.V.; Chandler, L.J.; Brault, A.C.; Meakins, T.A.; Watts, D.; Russell, K.L.; Olson, J.; Vasconcelos, P.F.; Da Rosa, A.T.; et al. Genetic relationships among Mayaro and Una viruses suggest distinct patterns of transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *75*, 461–469. [[CrossRef](#)]
25. Causey, O.R.; Casals, J.; Shope, R.E.; Udomsakdi, S. Aura and Una, Two New Group a Arthropod-Borne Viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1963**, *12*, 777–781. [[CrossRef](#)]
26. Carrera, J.P.; Diaz, Y.; Denis, B.; Barahona de Mosca, I.; Rodriguez, D.; Cedeno, I.; Arauz, D.; Gonzalez, P.; Cerezo, L.; Moreno, L.; et al. Unusual pattern of chikungunya virus epidemic in the Americas, the Panamanian experience. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0005338. [[CrossRef](#)]
27. Llamas-Gonzalez, Y.Y.; Campos, D.; Pascale, J.M.; Arbiza, J.; Gonzalez-Santamaria, J. A Functional Ubiquitin-Proteasome System is Required for Efficient Replication of New World Mayaro and Una Alphaviruses. *Viruses* **2019**, *11*, 370. [[CrossRef](#)]

28. Marston, H.D.; Folkers, G.K.; Morens, D.M.; Fauci, A.S. Emerging viral diseases: Confronting threats with new technologies. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 253ps210. [[CrossRef](#)]
29. Huang, Y.S.; Higgs, S.; Vanlandingham, D.L. Emergence and re-emergence of mosquito-borne arboviruses. *Curr. Opin. Virol.* **2019**, *34*, 104–109. [[CrossRef](#)]
30. Liang, G.; Gao, X.; Gould, E.A. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. *Emerg. Microbes Infect.* **2015**, *4*, e18. [[CrossRef](#)]
31. Ugwu, C.E.; Jiang, Y.Y.; Wu, L.; Xu, Y.X.; Yin, J.H.; Duan, L.P.; Chen, S.X.; Liu, H.; Pan, W.; Quan, H.; et al. In vitro Screening of Ginkgolic Acids for Antiparasitic Activity against *Cryptosporidium andersoni*. *Biomed. Environ. Sci.* **2019**, *32*, 300–303. [[CrossRef](#)]
32. Li, J.; Li, A.; Li, M.; Liu, Y.; Zhao, W.; Gao, D. Ginkgolic acid exerts an anti-inflammatory effect in human umbilical vein endothelial cells induced by ox-LDL. *Pharmazie* **2018**, *73*, 408–412. [[CrossRef](#)]
33. Zhou, C.; Li, X.; Du, W.; Feng, Y.; Kong, X.; Li, Y.; Xiao, L.; Zhang, P. Antitumor effects of ginkgolic acid in human cancer cell occur via cell cycle arrest and decrease the Bcl-2/Bax ratio to induce apoptosis. *Chemotherapy* **2010**, *56*, 393–402. [[CrossRef](#)]
34. Lee, J.S.; Hattori, M.; Kim, J. Inhibition of HIV-1 protease and RNase H of HIV-1 reverse transcriptase activities by long chain phenols from the sarcotestas of Ginkgo biloba. *Planta Med.* **2008**, *74*, 532–534. [[CrossRef](#)]
35. Mounce, B.C.; Cesaro, T.; Carrau, L.; Vallet, T.; Vignuzzi, M. Curcumin inhibits Zika and chikungunya virus infection by inhibiting cell binding. *Antivir. Res.* **2017**, *142*, 148–157. [[CrossRef](#)]
36. Fan, W.; Qian, S.; Qian, P.; Li, X. Antiviral activity of luteolin against Japanese encephalitis virus. *Virus Res.* **2016**, *220*, 112–116. [[CrossRef](#)]
37. Weber, C.; Sliva, K.; von Rhein, C.; Kummerer, B.M.; Schnierle, B.S. The green tea catechin, epigallocatechin gallate inhibits chikungunya virus infection. *Antivir. Res.* **2015**, *113*, 1–3. [[CrossRef](#)]
38. Lin, L.T.; Chen, T.Y.; Lin, S.C.; Chung, C.Y.; Lin, T.C.; Wang, G.H.; Anderson, R.; Lin, C.C.; Richardson, C.D. Broad-spectrum antiviral activity of chebulagic acid and punicalagin against viruses that use glycosaminoglycans for entry. *BMC Microbiol.* **2013**, *13*, 187. [[CrossRef](#)]
39. Bertol, J.W.; Rigotto, C.; de Padua, R.M.; Kreis, W.; Barardi, C.R.; Braga, F.C.; Simoes, C.M. Antiherpes activity of glucoevatomonoside, a cardenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata*. *Antivir. Res.* **2011**, *92*, 73–80. [[CrossRef](#)]
40. Schwarz, S.; Sauter, D.; Wang, K.; Zhang, R.; Sun, B.; Karioti, A.; Bilia, A.R.; Efferth, T.; Schwarz, W. Kaempferol derivatives as antiviral drugs against the 3a channel protein of coronavirus. *Planta Med.* **2014**, *80*, 177–182. [[CrossRef](#)]
41. Berg, K.; Braun, C.; Krug, I.; Schrenk, D. Evaluation of the cytotoxic and mutagenic potential of three ginkgolic acids. *Toxicology* **2015**, *327*, 47–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Liu, Z.H.; Zeng, S. Cytotoxicity of ginkgolic acid in HepG2 cells and primary rat hepatocytes. *Toxicol. Lett.* **2009**, *187*, 131–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Qian, Y.; Peng, Y.; Shang, E.; Zhao, M.; Yan, L.; Zhu, Z.; Tao, J.; Su, S.; Guo, S.; Duan, J.A. Metabolic profiling of the hepatotoxicity and nephrotoxicity of Ginkgolic acids in rats using ultra-performance liquid chromatography-high-definition mass spectrometry. *Chem. Biol. Interact.* **2017**, *273*, 11–17. [[CrossRef](#)]
44. Xia, H.; Wang, X.; Li, L.; Wang, S.; Guo, C.; Liu, Y.; Yu, L.; Jiang, H.; Zeng, S. Development of high performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for assay of ginkgolic acid (15:1) in rat plasma and its application to pharmacokinetics study. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2010**, *878*, 2701–2706. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Supplementary material

Broad Antiviral Activity of Ginkgolic Acid Against Chikungunya, Mayaro, Una and Zika Viruses

Dalkiria Campos ¹, Susana Navarro ¹, Yessica Y. Llamas-González ^{1,2}, Madelaine Sugasti ¹ and José González-Santamaría ^{1,*}

¹ Grupo de Biología Celular y Molecular de Arbovirus, Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Panamá 0816-02593, Panamá; dcampos@gorgas.gob.pa (D.C.); nsusana09@gmail.com (S.N.); qfb.y.llamas@gmail.com (Y.Y.L.-G.); madelaine313@gmail.com (M.S.)

² Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad de la República, Montevideo 11200, Uruguay

* Correspondence: jgonzalezsantamaria@gorgas.gob.pa; Tel.: +507-527-4814

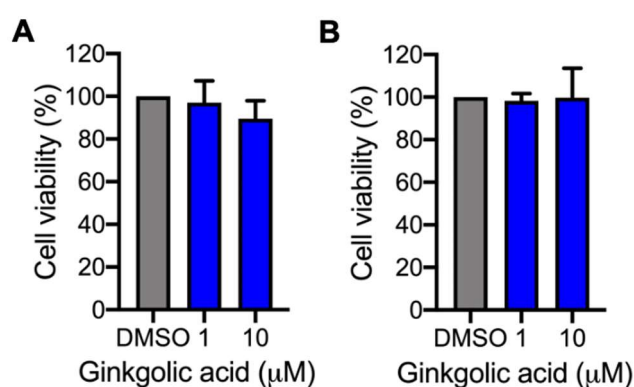


Figure S1. Cytotoxicity evaluation of Ginkgolic acid in Vero or HeLa cells. Vero (A) or HeLa (B) cells were treated with Ginkgolic acid at indicated concentrations for 24 h, and cell viability was determined using the MTT method. Data were analyzed with the One-way ANOVA test using GraphPad software.