

Universidad de Panamá
Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología
Vicerrectoría de Investigación y Postgrado
Programa de Maestría en Microbiología Ambiental

**“Evaluación de inhibidores de cinasas aprobadas por la FDA como
potenciales antivirales contra el virus Mayaro”**

Código de tesis CE-PT-327-07-04-24-36

Dalel Issa Zegarra Ledezma

Director de tesis, PhD José González Santamaría

**Trabajo de Graduación
presentado para optar por el
Título de Maestría en
Microbiología Ambiental**

2024

TRIBUNAL EXAMINADOR

Título:

**“Evaluación de inhibidores de cinasas aprobadas por la FDA como
potenciales antivirales contra el virus Mayaro”**

Por:

**Dalel Issa Zegarra Ledezma
4-803-1655**

Trabajo de Graduación presentado a consideración de la Escuela de Biología
como requisito parcial para optar por el título de Maestría en Microbiología
Ambiental.

Aprobado por

Dr. José González Santamaría

Director de tesis

Dr. Jordi Querol Audi

Jurado

Dr. Alex O. Martínez

Jurado

Panamá, República de Panamá

DEDICATORIA

A los pilares de mi vida, mis padres, Daniel e Itabé, por su apoyo inquebrantable. Este logro es, sin duda, el reflejo de su sacrificio y amor incondicional.

A mis hermanos, mis mejores amigos y compañeros de vida, Danelys y David por brindarme su apoyo incondicional en cada paso y celebrar mis logros como suyos, los quiero más de lo que las palabras pueden expresar.

A mi dulce Polly, por llegar a mi vida y con sus cuatro patas llenarla de alegría y amor incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A mi director José González Santamaría, por permitirme ser partícipe de su proyecto, por ser mi guía en mi formación profesional, por sus enseñanzas, su experiencia y consejos.

A mi familia, por brindarme su fuerza en cada paso del camino, su amor constante y su fe en mí.

A mis compañeros de laboratorio, por su ayuda desinteresada y permitir un buen ambiente laboral.

A mis amigas María Virginia, Diana y Alexandra, que su amistad ha sido una fuente constante de energía positiva e inspiración. Gracias por escucharme, por su paciencia y brindarme tanto cariño.

Al convenio entre la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología y la Universidad de Panamá, de la 6ta promoción del Programa de Maestría en Microbiología Ambiental (Convenio UP-SENACYT 014-2021).

A la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT), que a través del proyecto “Evaluación de inhibidores de cinasas celulares como potenciales tratamientos antivirales contra arbovirus emergentes”, proyecto FID2021-113, financió este proyecto de tesis.

Al Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud y todos sus colaboradores, por abrirme las puertas y permitirme realizar todo el proceso investigativo dentro de su institución.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ABREVIATURAS	XI
RESUMEN	1
ABSTRACT	4
CAPÍTULO I:	7
INTRODUCCIÓN.....	8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	12
1.1 Mayaro virus	12
1.1.1 Genoma y estructura Viral.....	12
1.1.2 Replicación del virus	13
1.1.3 Filogenia.....	15
1.1.4 Epidemiología y distribución.....	17
1.1.5 Modos de transmisión	18
1.1.6 Manifestaciones clínicas.....	19
1.1.7 Tratamientos	21
1.2 Cinasas	21
1.2.1 Inhibidores de cinasas	23
OBJETIVOS	25
CÁPITULO II:	27
METODOLOGÍA.....	27
2.1 Líneas celulares y reactivos	28
2.2 Inhibidores de cinasas.....	28
2.3 Cepas de virus y propagación.....	31
2.4 Análisis de citotoxicidad	31
2.5 Ensayo de formación de placas de virus.....	32
2.6 Análisis de proteínas.....	32
2.7 Citometría.....	33
CAPÍTULO III:	34
RESULTADOS	35

3.1	Análisis de citotoxicidad de los inhibidores de las cinasas.....	35
3.2	Inhibidores de cinasa reducen la replicación del MAYV en células HeLa ..	36
3.3	Inhibidores de cinasas también inhiben a MAYV en HDFs	37
3.4	Los inhibidores de EGFR reducen los títulos virales de otros alfavirus ..	40
3.5	El efecto de los inhibidores de EGFR sobre el MAYV es dependiente de la dosis ..	41
3.6	Inhibidores de EGFR reducen los niveles de las proteínas virales E1 y nsP1 del MAYV	42
3.7	Los inhibidores de EGFR actúan durante las etapas tempranas de la infección del MAYV	43
3.8	Tucatinib y Osimertinib también afectan la replicación de VSV, IAV y HCMV ..	44
3.9	Efecto de los inhibidores Tucatinib y Osimertinib en la expresión de las proteínas virales de VACV, VSV, IAV (Flu) y HCMV	47
	DISCUSIÓN.....	49
	CÁPITULO IV:	53
	CONCLUSIONES.....	53
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
	ANEXOS	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Familias pertenecientes al grupo Arbovirus.....	8
Figura 2. Esquema general del proceso de descubrimiento y desarrollo de un fármaco.....	11
Figura 3. Representación esquemática de la partícula y la organización genómica del MAYV..	12
Figura 4. El ciclo replicativo y la estructura genómica de MAYV..	14
Figura 5. Filogenia de los alfavirus.....	16
Figura 6. Número total de casos por país de MAYV.....	17
Figura 7. Ciclo de transmisión del MAYV..	19
Figura 8. Hallazgos clínicos en CHIKV, DENV, MAYV y ZIKV..	20
Figura 9. Diagrama del proceso de fosforilación de proteínas.....	22
Figura 10. Señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) La unión del ligando al EGFR activa su actividad intrínseca tirosina cinasa.....	24
Figura 11. Análisis de la citotoxicidad de los inhibidores de cinasas..	36
Figura 12. Inhibición en la replicación del MAYV por los inhibidores de cinasas..	37
Figura 13. Validación de la actividad de los inhibidores de cinasas en fibroblastos dérmicos humanos (HDFs)..	39
Figura 14. Inhibidores de EGFR afectan la replicación del CHIKV y ZIKV.....	40
Figura 15. Inhibidores de EGFR son dependiente de la dosis.....	42
Figura 16. La inhibición de EGFR disminuye los niveles de las proteínas E1 y nsP1 de MAYV..	43
Figura 17. Ensayo de tiempo de adición..	44
Figura 18. Análisis de la toxicidad celular de los inhibidores Tucatinib y Osimertinib.. ...	45
Figura 19. Tucatinib y Osimertinib reducen la intensidad de GFP de VSV, IAV y HCMV..	46
Figura 20. Evaluación de la expresión de las proteínas E3L, proteína G, NS1 y CCH2-DDG9 para VACV, VSV FLU y HCMV, respectivamente mediante Western Blot.....	48

ABREVIATURAS

AAD - Antivirales de acción directa

ATP - Trifosfato de adenosina

CHIKV - Chikungunya virus

EGFR - Factor de crecimiento epidérmico

FDA – Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos

HDFs - Fibroblastos dérmicos humanos

HCMV - Citomegalovirus humano

ORF - Marcos de lectura abiertos

PK – Proteínas cinasas

PTM - Modificación postraducciona

MAYV - Mayaro virus

VACV - Vaccinia virus

VSV - Virus de la estomatitis vesicular

ZIKV - Zika virus

RESUMEN

El virus Mayaro (MAYV) es un arbovirus emergente transmitido principalmente por mosquitos silvestres del género *Haemagogus*. El MAYV, como otros virus, manipula y secuestra la maquinaria celular para replicarse con éxito. Numerosos informes indican que la actividad de las cinasas es esencial en diferentes etapas del ciclo de vida viral. Las cinasas son enzimas que catalizan la fosforilación de varios sustratos, controlando funciones celulares esenciales, como el metabolismo, el ciclo celular, la inflamación y la transducción de señales, entre otras. Una estrategia emergente para identificar posibles tratamientos antivirales consiste en reutilizar fármacos ya aprobados para el tratamiento de diversas enfermedades crónicas. Este enfoque presenta varias ventajas; al existir estudios previos de toxicidad, dosificación y farmacocinética, se acortan los plazos para la aplicación clínica del fármaco y se reducen los costes de desarrollo. Así pues, el objetivo del presente estudio fue evaluar la posible actividad antiviral de una serie de inhibidores de cinasas aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer y otras patologías. En primer lugar, evaluamos la toxicidad de 20 inhibidores de cinasas en células HeLa mediante el método MTT, donde el 25% resultó ser tóxico en células HeLa por lo que fueron excluidos del estudio. A continuación, se cuantificó la producción de partículas de MAYV en sobrenadantes celulares de células HeLa infectadas mediante un ensayo de formación de placas. Aquellos inhibidores que presentaron actividad antiviral en el análisis inicial (87%), se validaron en la línea celular humana primaria HDFs. En HDFs con excepción de Bosutinib, los demás inhibidores bloquean la actividad de una o más isoformas del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Por lo tanto, nos enfocamos en este grupo de compuestos: Afatinib, Gefitinib, Lapatinib, Osimertinib y Tucatinib, para caracterizar su efecto sobre MAYV. Además, se evaluaron otros virus tales como, ZIKV, CHIKV, VSV, IAV y HCMV. Se realizaron ensayos de tiempos de adición en HDFs infectados con MAYV y tratados con inhibidores del EGFR. La expresión de proteínas virales en los HDFs tratados o no tratados con inhibidores del EGFR, se evaluó mediante Western blot. Los inhibidores del EGFR fueron bien tolerados en dosis que oscilaron entre 2,5 y 10 μ M en células HeLa, HDFs, A549

e IMR90. Todos los inhibidores del EGFR redujeron el rendimiento de la progenie MAYV en células HeLa y HDF, y este efecto fue dosis-dependiente. Los ensayos de adición revelaron que los inhibidores de EGFR eran capaces de bloquear la replicación de MAYV hasta 4 h después del inicio de la infección. Además, los inhibidores del EGFR también reducen la producción de progenie de CHIKV, ZIKV VSV, IAV y HCMV. Por último, los inhibidores del EGFR reducen la expresión de las proteínas virales de MAYV, CHIKV, VSV, IAV, VAVC y HCMV. En conjunto, nuestros datos sugieren que el EGFR es una posible diana para combatir diferentes arbovirus y aportan pruebas de que los fármacos contra el cáncer aprobados por la FDA pueden reutilizarse como tratamientos antivirales.

Palabras claves: MAYV, antivirales, cinasas, arbovirus, reutilización.

ABSTRACT

Mayaro virus (MAYV) is an emerging arbovirus transmitted primarily by wild mosquitoes of the genus *Haemagogus*. MAYV, like other viruses, manipulates and hijacks cellular machinery to facilitate its replication. A preponderance of evidence indicates that kinase activity plays a pivotal role at various stages of the viral life cycle. Kinases are enzymes that catalyze the process of phosphorylation on various substrates, which plays a critical role in regulating a wide range of essential cellular functions, including metabolism, cell cycle, inflammation, and signal transduction. A novel approach to identifying potential antiviral treatments involves the repurposing of pharmaceutical agents that are already approved for the treatment of various chronic diseases. This approach offers several advantages. First, prior toxicity, dosing, and pharmacokinetic studies facilitate accelerated clinical application of the drug, thereby reducing development costs. The objective of the present study was to evaluate the potential antiviral activity of several kinase inhibitors that have been approved by the FDA for the treatment of cancer and other pathological conditions. In the first phase of the study, the toxicity of 20 kinase inhibitors was evaluated in HeLa cells using the MTT method. A total of 20 compounds were tested and 25% of these compounds were found to be toxic to HeLa cells and were excluded from further analysis. Subsequently, the production of MAYV particles in the cell supernatants of infected HeLa cells was quantified using a plaque-forming assay. The initial assay identified several inhibitors with antiviral activity, which were subsequently validated in a primary human cell line (HDFs). In HDFs, the remaining inhibitors, with the exception of bosutinib, were found to block the activity of one or more epidermal growth factor receptor (EGFR) isoforms. Consequently, our research is currently focused on this specific group of compounds. The objective of this study was to characterize the effect of afatinib, gefitinib, lapatinib, osimertinib, and tucatinib on MAYV. Furthermore, an evaluation of additional viruses, including ZIKV, CHIKV, VSV, IAV, and HCMV, was conducted. In addition, time-of-addition assays were performed on MAYV-infected HDFs treated with EGF receptor (EGFR) inhibitors. Finally, an assessment of viral protein expression in EGFR inhibitor-treated and untreated HDFs was performed

using Western blotting. EGFR inhibitors were well tolerated at doses ranging from 2.5 to 10 μ M in HeLa, HDFs, A549 and IMR90 cells. A dose-dependent effect was observed with all EGFR inhibitors, resulting in a reduction of MAYV progeny yield in HeLa and HDF cells. Drug timing assays have shown that EGFR inhibitors can block Mayaro virus (MAYV) replication for up to four hours after infection. In addition, EGFR inhibitors have been shown to decrease the production of progeny viruses, including chikungunya virus (CHIKV), zika virus (ZIKV), vesicular stomatitis virus (VSV), influenza A virus (IAV), and human cytomegalovirus (HCMV). Finally, EGFR inhibitors have been shown to reduce the expression of viral proteins from several notable pathogens, including Mayaro virus (MAYV), chikungunya virus (CHIKV), vesicular stomatitis virus (VSV), influenza A virus (IAV), Venezuelan equine encephalitis virus (VEE), and human cytomegalovirus (HCMV). Collectively, our data indicate that EGFR represents a potential target for the treatment of a range of RNA and DNA viruses. Moreover, our findings provide evidence that FDA-approved anticancer drugs can be repurposed as antiviral treatments.

Keywords: MAYV, antivirals, kinases, arbovirus, repurposing.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

INTRODUCCIÓN

Los arbovirus son virus que se propagan mediante vectores artrópodos. Taxonómicamente, son un grupo heterogéneo que se compone de más de 500 virus y de estos, alrededor de 150 causan enfermedad en humanos o animales. Estos virus son transmitidos entre vertebrados susceptibles a través de una gran variedad de artrópodos hematófagos, entre ellos mosquitos y garrapatas, principalmente (Arredondo-García et al., 2016; Beckham & Tyler, 2015). La arbovirosis se ha convertido en un dilema mundial difícil de controlar, debido a los cambios en los factores antropogénicos, a las mutaciones virales y a que los vectores transmisores de estas enfermedades se encuentran distribuidos por todo el mundo, siendo muy complejo limitar su reproducción y distribución (Arévalo-Cepeda et al., 2017). La mayoría de los arbovirus clínicamente significativos provienen de tres familias principales: *Togaviridae*, *Flaviviridae* y *Bunyaviridae* (Figura 1).

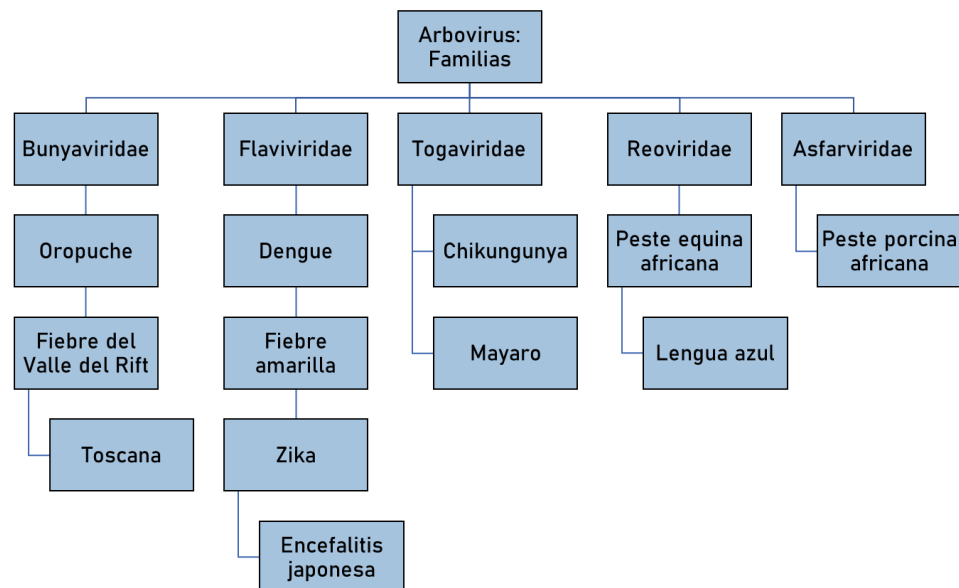


Figura 1. Familias pertenecientes al grupo Arbovirus. Adaptado de (Arredondo-García et al., 2016)

En las últimas décadas, los virus de la familia *Togaviridae*, género *Alfavirus* (distribuidos en todos los continentes, exceptuando la Antártida), son responsables de frecuentes brotes de virus emergentes y reemergentes. La emergencia y reemergencia de estos virus está asociado a mutaciones ocurridas entre hospederos, factores antropogénicos, cambio climático, crecimiento demográfico, malas condiciones sanitarias, alteración de los ecosistemas, deforestación, migración humana, así como la invasión de humanos y animales domésticos en los hábitats de los artrópodos transmisores (Liang et al., 2015).

El virus Mayaro (MAYV) tiene un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo de 11,5 kb, con dos marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican tanto para las proteínas no estructurales (nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4), que están implicadas en la transcripción y replicación del ARN viral, como para las proteínas estructurales (C, E3, E2, 6k y E1), algunas de las cuales forman parte de la partícula viral (Esposito & Fonseca, 2017). El MAYV fue aislado por primera vez del suero de trabajadores forestales en 1954 en el condado de Mayaro en Trinidad y Tobago, desde entonces ha sido reportado en América Central y del Sur, circulando a través de bosques tropicales de alta densidad (Anderson et al., 1957). Se detectó un caso de MAYV en un estudio realizado entre 1966 y 1967 en Panamá, un ciudadano de los Estados Unidos de América (EEUU) que estaba efectuando estudios para evaluar la factibilidad de rutas para un nuevo canal a nivel del mar en Panamá o Colombia mostró un aumento significativo de anticuerpos contra el MAYV. Desafortunadamente, debido al cruce de grupos de estudio, no estaba claro si el virus se adquirió en Panamá o Colombia (Srihongse et al., 1973).

Debido a sus similitudes antigénicas, el MAYV está agrupado dentro del complejo Semliki Forest, que consta de otros siete virus: Bebaru (BEBV), Chikungunya (CHIKV), Getah, río Ross (RRV), O'nyong-nyong (ONNV), Semliki Forest virus (SFV) y Una (UNAV) (Esposito & Fonseca, 2017), formando un grupo serológico dentro del género *Alfavirus* que comparte algunos sitios antigénicos

comunes, generando así reactividad cruzada con sueros inmunes policlonales entre las especies. El complejo de Semliki Forest generalmente se asocia con los siguientes síntomas: fiebre, cefalea, dolor ocular, dolor muscular, diarrea, erupción cutánea y artralgia (Esposito & Fonseca, 2017).

El MAYV se transmite a través de la picadura de mosquitos, principalmente miembros de la familia *Culicidae* (Diptera: Nematocera) de hábito selvático, en especial, especies pertenecientes al género *Haemagogus* (Azar et al., 2020). Sin embargo, evidencias de laboratorio han revelado que el vector urbano *Aedes aegypti* es capaz de transmitir este virus (Long et al., 2011).

La infección por MAYV es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) una enfermedad tropical desatendida (De O'Mota et al., 2019), ya que actualmente no existen terapias o vacunas aprobadas por la FDA para uso humano contra este alfavirus del Nuevo Mundo (Muñoz & Navarro, 2012), lo que lo convierte en una prioridad para las agencias gubernamentales de financiación y salud pública (Mercorelli et al., 2018).

Los medicamentos antivirales actualmente aprobados tratan pocas infecciones virales y la mayoría son antivirales de acción directa (AAD), quiere decir que se dirigen a proteínas codificadas por virus individuales. Como tal, este enfoque proporciona un espectro estrecho de cobertura y, por lo tanto, no puede abordar la gran necesidad clínica actual. Además, como se muestra en **la Figura 2** pueden pasar en promedio de 12 a 16 años antes de que se descubra y apruebe un nuevo medicamento que pueda tratar una determinada enfermedad o condición para su uso en humanos (Nosengo, 2016). La primera fase, el descubrimiento, puede tomar de 3 a 6 años. A esto le siguen estudios preclínicos, generalmente en modelos animales. Estos estudios, que tienen como objetivo probar la eficacia y seguridad de las moléculas en modelos adecuados antes de probarlas en humanos, pueden durar unos 3 años. Si una molécula ha mostrado resultados prometedores hasta aquí, entonces pasan a la fase de ensayos clínicos en humanos. Estos ensayos van desde la Fase I a la Fase III y normalmente duran

alrededor de 5 años. Finalmente, si la molécula pasa con éxito todos los procesos, debe recibir la aprobación de las agencias correspondientes. Se estima que solo alrededor del 5 % de las moléculas candidatas pasan con éxito este proceso (DiMasi et al., 2016).

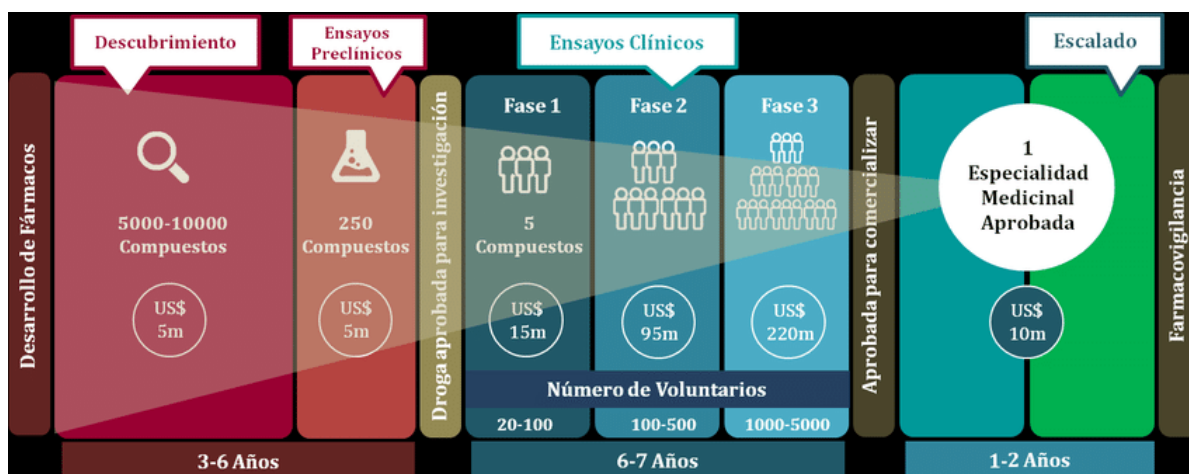


Figura 2. Esquema general del proceso de descubrimiento y desarrollo de un fármaco (Di Ianni, 2015).

La estrategia de descubrir antivirales de amplio espectro dirigidos a blancos del huésped representa una solución potencial (Geraghty et al., 2021). Los virus dependen de las proteínas celulares para cada paso de su ciclo de vida. Dirigirse a las proteínas del huésped requeridas por múltiples virus puede, por lo tanto, proporcionar una cobertura de amplio espectro con un posible beneficio adicional de una alta barrera genética a la resistencia.

Una alternativa efectiva es la reutilización de medicamentos existentes, que se dirigen a las proteínas del huésped y que podrían ser requeridas por múltiples virus. Este enfoque podría acelerar la aprobación de tratamientos terapéuticos seguros, efectivos y menos costosos (Mercorelli et al., 2018). Además, acorta el camino a la clínica al permitir la utilización de los datos disponibles, por ejemplo, toxicidad, farmacocinética, dosificación, etc

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Mayaro virus

1.1.1 Genoma y estructura Viral

El genoma de MAYV (**Figura 3**) está compuesto por un ARN de cadena positiva de ~11,5 kb que contiene dos marcos de lectura abiertos (ORF). El ORF proximal en 5' codifica para las proteínas no estructurales, mientras que el ORF proximal en 3' codifica para las proteínas estructurales. Las proteínas no estructurales se traducen directamente del ARN genómico en una poliproteína, que se escinde en cuatro péptidos no estructurales (nsP1, 2, 3 y 4). Las proteínas estructurales se traducen a partir de un ARNm subgenómico (ARNm 26S), codificando así una poliproteína que da lugar a 5 proteínas: envoltura (E) E1, E2, E3, 6K y cápside (C) (Esposito & Fonseca, 2017).

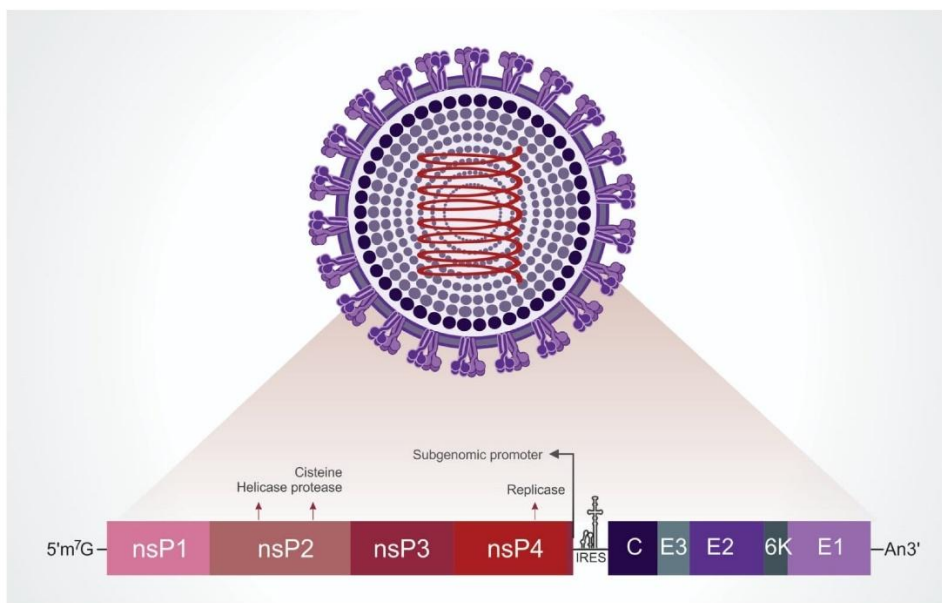


Figura 3. Representación esquemática de la partícula y la organización genómica del MAYV. Datos de microscopía electrónica muestran que la partícula viral tiene un diámetro de unos 70 nm. Las proteínas estructurales (en escala de color púrpura C:

cápside; E1: glicoproteínas de la envoltura 1; E2: glicoproteínas de la envoltura 2; E3: glicoproteínas de la envoltura 3; 6K: proteína que asocia E1 y E2) y las proteínas no estructurales del 1 a 4 (en escala de color rojo) (Franca et al., 2022).

1.1.2 Replicación del virus

En el ciclo de replicación de MAYV (**Figura 4**) los receptores de las células diana que median la entrada del virus no se conocen completamente. Sin embargo, la molécula de adhesión Mxra8 (también conocida como DICAM, ASP3 o limitrina, un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas) fue descrita recientemente como un receptor para el MAYV y otros alfavirus artritogénicos, como CHIKV, RRV, ONNV y Barmah Forest virus (R. Zhang et al., 2018). Es importante mencionar que la absorción de la partícula viral está estrechamente relacionada con las balsas lipídicas de las membranas celulares, donde el colesterol es el componente principal y la endocitosis ocurre a través de clatrina o caveola, la primera vía es la más utilizada por el MAYV. Estudios previos han demostrado que el agotamiento del colesterol de la membrana celular o el bloqueo de la endocitosis mediada por clatrina conduce a una fuerte inhibición de la infección viral (Carvalho et al., 2017). Después de que el virus ingresa a la célula huésped, se produce el desensamblaje de la partícula viral y la liberación del ARN genómico. Una vez en el citoplasma, el ARN genómico se traduce en proteínas no estructurales. Luego, estas proteínas permiten el procesamiento del ARN genómico en ARNm subgenómico y su posterior traducción en proteínas estructurales. Después estos se procesan y ensamblan en una nucleocápside y glicoproteínas que, en asociación con la membrana plasmática, dan como resultado la gemación de las nuevas partículas de virión (Andreolla et al., 2022).

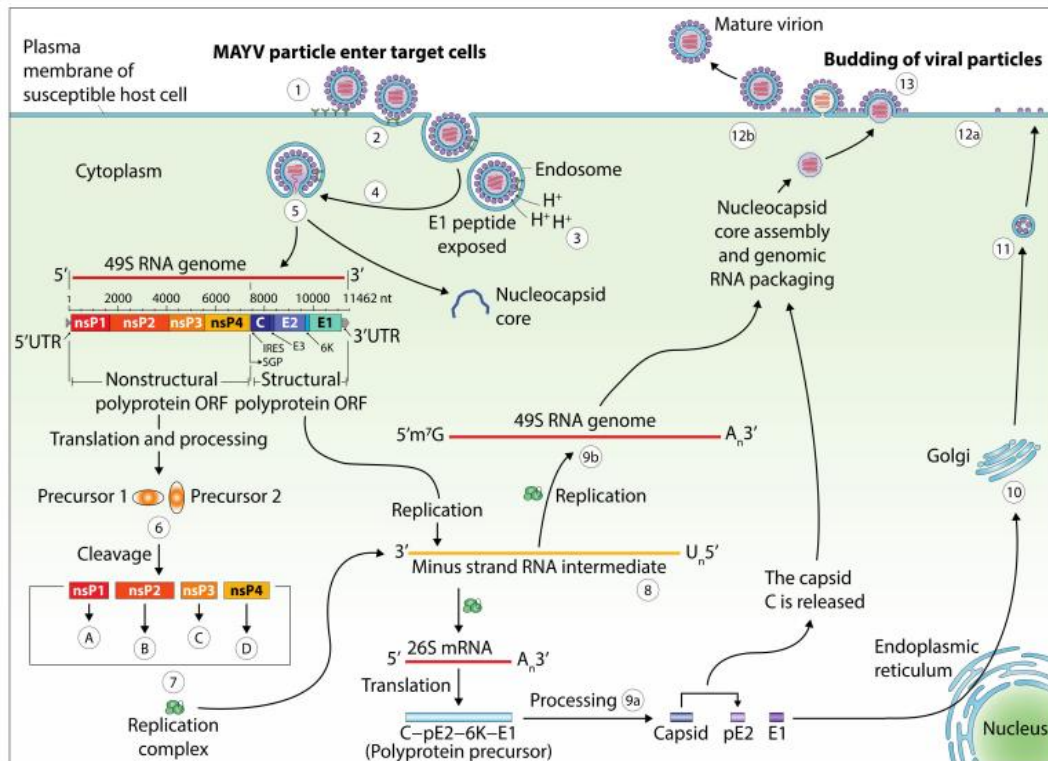


Figura 4. El ciclo replicativo y la estructura genómica de MAYV. E: envoltura; nsP: proteína no estructural; UTR: región no traducida; nt: nucleótidos. A: nsP1 es necesaria en la formación del ARN viral y en el procesamiento de la cubierta del ARN; B: nsP2 presenta varias actividades enzimáticas necesarias en la transcripción; C: nsP3 es un elemento del complejo de replicación; D: nsP4 es conocida como la ARN polimerasa viral. 1: La entrada del MAYV a la célula esta mediada por endocitosis a través de una vesícula recubierta de clatrina o de caveolina; 2: La internalización del virus inicia por la unión de la proteína E2 con receptores de la célula huésped, posiblemente Mxra8; 3: El bajo pH obtenido tras la formación del endosoma conduce a modificaciones estructurales (acidificación) en la envoltura del virus, exponiendo la proteína E1; 4: Fusión de la membrana celular endosomal y el virus; 5: Liberación de la nucleocápside y el genoma viral en el citoplasma de la célula; 6: El genoma es reconocido por los ribosomas y se generan un par de precursores de nsP a partir del ARNm viral generado; 7: A partir de la interacción de las proteínas nsP se produce el complejo de replicación quien cataliza la síntesis de un ARN de cadena negativa; 8: Este ARN será la plantilla para generar ARN genómicos (49S) y subgenómicos (26S);

9a: Se genera la poliproteína estructural 26S, una serina proteasa autoproteolítica; 9b: La proteína de la cápside se libera mediante la acción de la serina proteasa autoproteolítica y en conjunto con el ARN 49S participa en el ensamblaje del núcleo de la nucleocápside y en el empaquetamiento del ARN genómico; 10: El resto de la poliproteína (pE2 y E1) se dirige al procesamiento y maduración de las glicoproteínas; 11: En el Golgi, Las glicoproteínas maduras se asociarán y serán transportadas a la membrana celular; 12a: En la membrana celular, la pE2 se divide en E2 y E3; 12b: La asociación del ARN viral con la cápside en la membrana permite el reclutamiento de E1, iniciando el proceso de ensamblaje viral; 13: Las partículas de MAYV asociadas al núcleo son liberadas fuera de la célula huésped a través de la membrana (Diagne et al., 2020).

1.1.3 Filogenia

El MAYV se encuentra en el complejo serológico Semliki Forest, junto con otros virus como CHIKV, UNAV, BEBV, GETV, ONNV, RRV y SFV (Henss et al., 2019). Todos estos virus comparten sitios antigénicos comunes, lo que dificulta su diagnóstico y genera reactividad cruzada (Acosta-Ampudia et al., 2018).

El MAYV se clasifica filogenéticamente en tres genotipos: Disperso (D), Limitado (L) y Nuevo (N) (**Figura 5**). El genotipo D fue reportado por primera vez en Trinidad y Tobago en 1955 y es el genotipo de mayor distribución, ya que se ha extendido por América del Sur, incluyendo a Perú, Guyana Francesa, Surinam, Brasil, Trinidad y Tobago, Argentina, Colombia, Venezuela y Bolivia. El genotipo L fue identificado por primera vez en Pará, Brasil, en 1955 y desde entonces se ha reportado tanto en Brasil como en Haití. El genotipo N menos prevalente que consiste en un solo caso que emergió en Perú durante el 2010 en la región de Madre de Dios (Auguste et al., 2015; Mavian et al., 2017).

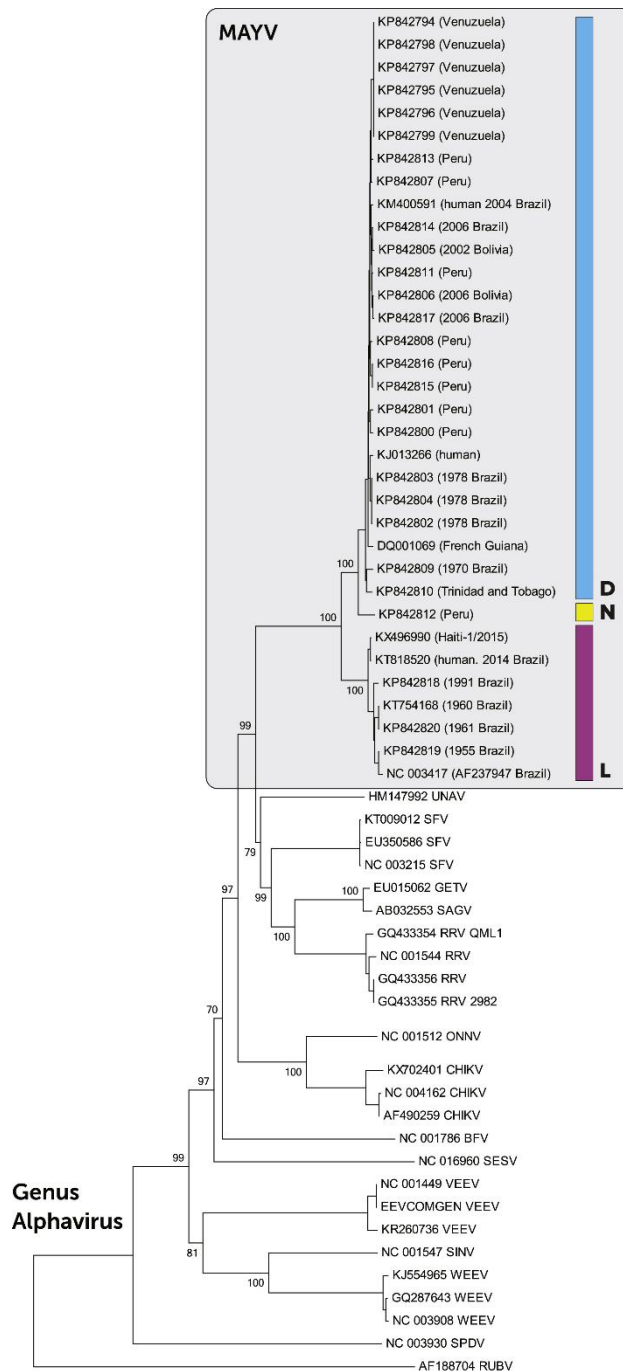


Figura 5. Filogenia de los alfavirus. Las relaciones genéticas entre las variantes del MAYV y algunos otros miembros del género Alphavirus (Mackay & Arden, 2016).

1.1.4 Epidemiología y distribución

El MAYV se aisló por primera vez en Trinidad y Tobago en 1954, desde entonces, se han notificado brotes y pequeñas epidemias en regiones tropicales de Centroamérica y Sudamérica. Existe una subestimación del número real de casos de fiebre de Mayaro debido a los síntomas compartidos con el dengue y la fiebre de Chikungunya, la aparición de casos asintomáticos no notificados y la vigilancia inadecuada en áreas endémicas. Las situaciones antes mencionadas dan como resultado el diagnóstico erróneo y, en consecuencia, la notificación del MAYV con otras fiebres virales, principalmente el dengue (Weaver & Reisen, 2010), ya que se estima que el 1% de todas las enfermedades febriles similares al dengue en el norte de Sudamérica son causadas por el MAYV (Forshey et al., 2010).

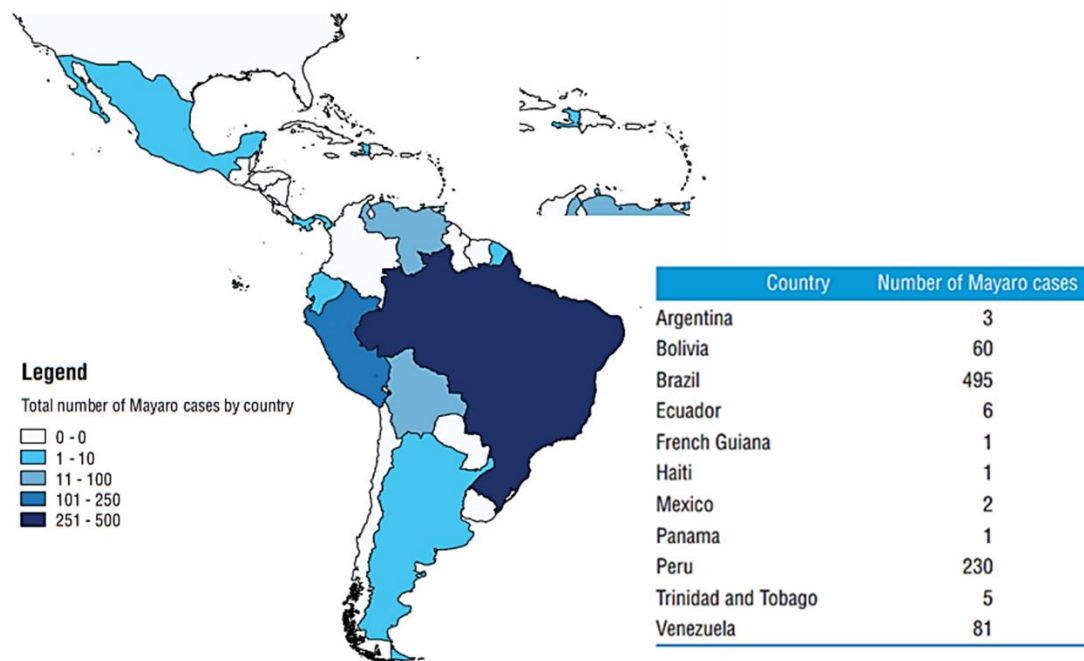


Figura 6. Número total de casos por país de MAYV. Casos confirmados y presuntos acumulados informados en la literatura y por las autoridades sanitarias, desde su descubrimiento en 1954 hasta mayo de 2019 (Ganjian & Riviere-Cinnamond, 2020).

Como se muestra en la **Figura 6**, se han reportado casos de MAYV en Latinoamérica, donde Brasil y Perú tienen el mayor número de casos notificados de fiebre de Mayaro.

1.1.5 Modos de transmisión

Los mosquitos son responsables de la transmisión de una variedad de patógenos mortales, incluido el MAYV, que afectan la vida y el sustento de millones de personas en todo el mundo cada año. La transmisión del MAYV (**Figura 7**) ocurre cuando los mosquitos hembra pertenecientes al género *Haemagogus*, principalmente *Haemagogus janthinomys*, adquieren sangre de un huésped infectado con altas concentraciones del MAYV en su sangre (Navarro et al., 2012). El MAYV se ha aislado de otros géneros de mosquitos, incluidos *Culex*, *Mansonia*, *Aedes*, *Psorophora* y *Sabethes* (Groot et al., 1961). También se ha detectado en huéspedes vertebrados, como primates no humanos, roedores, aves, perezosos y otros mamíferos pequeños (De Thoisy et al., 2003).

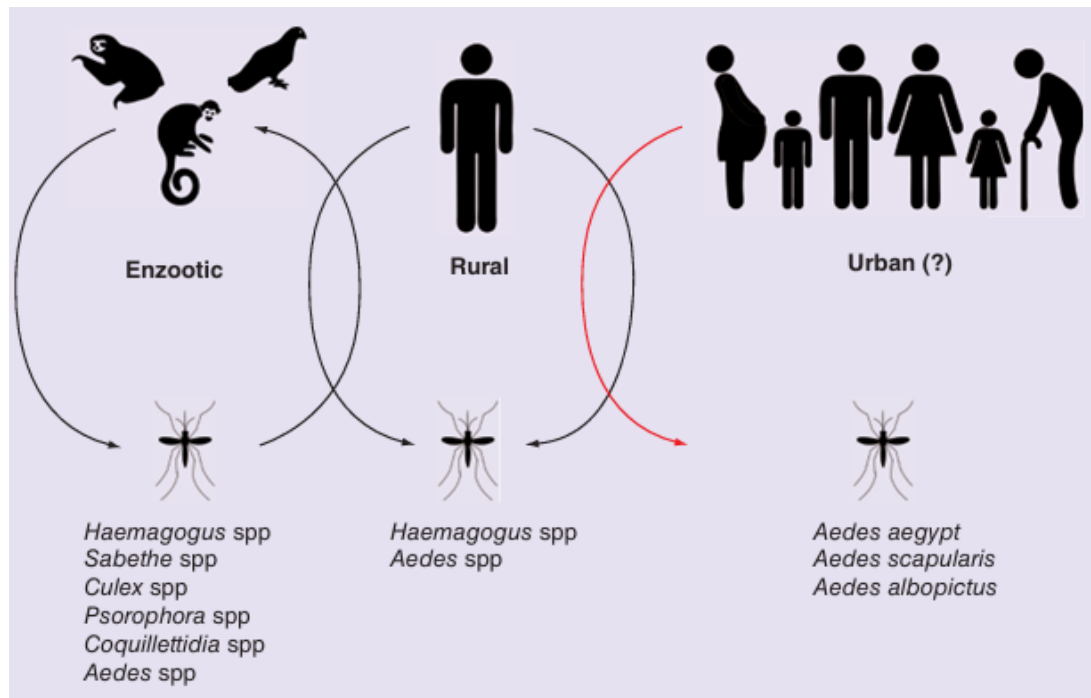


Figura 7. Ciclo de transmisión del MAYV. Basado en los hallazgos en vectores y vertebrados, el MAYV suele circular en un ciclo selvático de mosquitos y vertebrados del bosque. Sin embargo, también se ha encontrado en lugares más urbanos junto a insectos vectores antropófilos (prefiriendo a los humanos). Si la transmisión a través de mosquitos antropófilos se vuelve más eficiente después de un cambio viral, o si los vectores existentes cambian su hábitat y hábitos de picadura, aumentará el riesgo de establecimiento urbano y mayor propagación a áreas no boscosas (De Oliveira Mota et al., 2015).

1.1.6 Manifestaciones clínicas

En los seres humanos, las infecciones por el MAYV clínicamente agudas se caracterizan por una enfermedad febril generalmente no mortal e inespecífica, a menudo acompañada de artralgia. Otros síntomas que también se reportan son dolor de cabeza, el dolor ocular, escalofríos, la erupción cutánea y tos, pero estos son informados con menos frecuencia (Diagne et al., 2020; Silva-Ramos et al., 2023). Estudios longitudinales han demostrado que algunos pacientes continúan

experimentando dolor en las articulaciones hasta un año después de la infección, de manera similar a los infectados por el CHIKV (Halsey et al., 2013). Debido a síntomas inespecíficos, los casos de fiebre de Mayaro pueden parecerse a los casos de fiebre del dengue o casos de otras enfermedades tropicales (**Figura 8**), como la malaria, la poliomielitis, la rabia, el sarampión, la rubéola, la hepatitis, la leptospirosis, la fiebre de Oropouche (De Oliveira Mota et al., 2015). Esto hace que el diagnóstico clínico de MAYV sea un desafío en regiones donde múltiples arbovirus circulan simultáneamente. Actualmente, no existe una vacuna aprobada o un tratamiento específico para la infección por el MAYV, aunque se han desarrollado al menos tres vacunas candidatas (Choi et al., 2019; Weise et al., 2014).

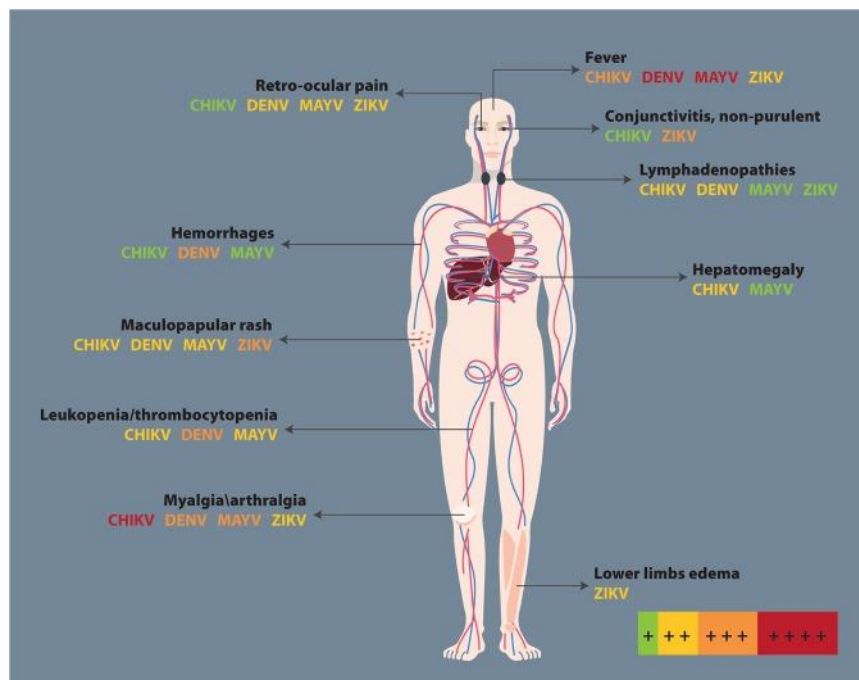


Figura 8. Hallazgos clínicos en CHIKV, DENV, MAYV y ZIKV. La figura incluye un código de colores para indicar la intensidad de los síntomas producidos por cada arbovirus: el rojo corresponde a +++++, el naranja a +++, el amarillo a ++, el verde a +, y la ausencia del nombre del arbovirus significa que no hay síntomas (Acosta-Ampudia et al., 2018).

1.1.7 Tratamientos

No hay medicamentos antivirales específicos disponibles para tratar una infección por el MAYV, al igual que ocurre con otros arbovirus y solo se dispone de cuidados de apoyo (Halsey et al., 2013). El tratamiento se basa en el alivio del dolor y la fiebre mediante analgésicos como paracetamol, además se utilizan antiinflamatorios no esteroideos, principalmente, ibuprofeno, diclofenaco o naproxeno (De Figueiredo & Figueiredo, 2014). La cloroquina (150 mg de base/día), un fármaco antipalúdico, resultó eficaz para tratar la artralgia persistente e incapacitante asociada a la fiebre de Mayaro (Savarino et al., 2003).

1.2 Cinasas

Las proteínas cinasas (PK), miembros de la familia de las fosfotransferasas, son enzimas que catalizan la reacción de fosforilación de una amplia variedad de sustratos (lípidos, carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos). La fosforilación de proteínas es una de las modificaciones postraduccionales más importantes, ya que gobierna la propagación de señales, este mecanismo es reversible y ocurre a través de las PK y consiste en la adición de un grupo fosfato (PO_4), a partir de una molécula de ATP, al grupo polar R de aminoácidos, como serina, treonina o tirosina de una proteína sustrato específica (Ardito et al., 2017; Sacco et al., 2012). Se ha encontrado que la distribución de los sitios pSer, pThr, pTyr en el proteoma humano es de alrededor del 79.3 %, 16.9 % y 3.8 % respectivamente (Olsen et al., 2006).

La fosforilación reversible por PK se considera un mecanismo clave mediante el cual se regulan diversas actividades de las células eucariotas, incluida la proliferación, la división celular, la expresión génica, el transporte de iones, el metabolismo, la motilidad, el transporte en la membrana, la apoptosis y las respuestas hormonales (**Figura 9**) (Castelo-Soccio et al., 2023). En conjunto,

estas funciones hacen que la regulación de la función enzimática y celular mediante fosforilación sea un medio ideal para responder apropiadamente a las señales extracelulares e intracelulares. Además, los perfiles de fosforilación aberrantes se correlacionan con enfermedades como el cáncer, la diabetes y los trastornos neurodegenerativos o inflamatorios (Cohen & Alessi, 2013).

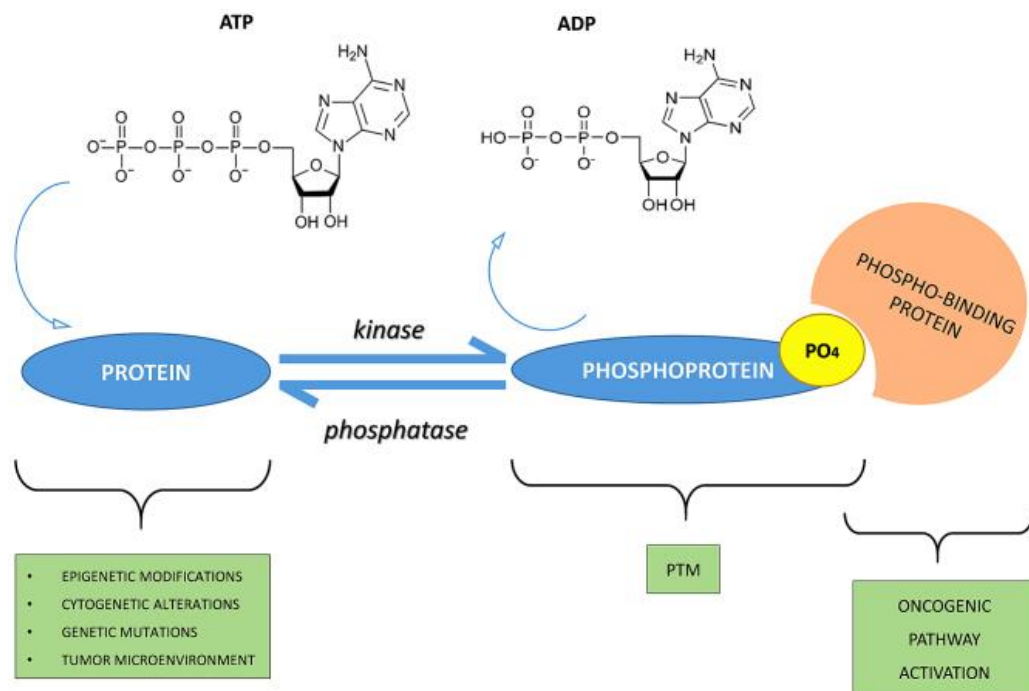


Figura 9. Diagrama del proceso de fosforilación de proteínas. El mecanismo de regulación de la fosforilación está formado por cinasas, fosfatasas y sus sustratos (proteínas de unión a fosfatos). La fosforilación se activa por estímulos como modificaciones epigenéticas, alteraciones citogenéticas, mutaciones genéticas o el microambiente tumoral. En consecuencia, la proteína recibe un grupo fosfato por hidrólisis de trifosfato de adenosina (ATP) y debido a la actividad enzimática de la cinasa. Este es un mecanismo de regulación a través de una modificación postraduccional (PTM). Además, la fosforilación es un proceso reversible debido a la actividad de la fosfatasa. Imagen adaptada de (Ardito et al., 2017).

El proyecto del genoma humano ha revelado que el 20% de los aproximadamente 32.000 genes humanos codifican proteínas implicadas en la transducción de señales. Entre estas proteínas se encuentran más de 500 enzimas PK y alrededor de 150 proteínas fosfatasas que ejercen un control estricto sobre la fosforilación de proteínas (Manning et al., 2002).

1.2.1 Inhibidores de cinasas

La desregulación de la función de las cinasas desempeña un papel importante en el cáncer, así como en las enfermedades inmunológicas, inflamatorias, neurodegenerativas, metabólicas, cardiovasculares e infecciosas. Actualmente, importantes avances han llevado a la identificación de inhibidores dirigidos contra cinasas activadas en el cáncer (Singha et al., 2023).

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) pertenece a la familia humana ErbB de receptores tirosina cinasas (RTKs), que son receptores transmembrana. Los ligandos de EGFR son el factor de crecimiento epidérmico (EGF), la anfiregulina (AR), el factor de crecimiento transformante alfa ($TGF-\alpha$), la epiregulina (EREG), el factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), la betacelulina (BTC) y el epígen (EPGN). La unión de estos ligandos con el receptor induce la dimerización y fosforilación de la molécula, en la que los sitios fosforilados con tirosina promueven la activación de cascadas de señalización posteriores y la internalización de EGFR (Mitsudomi & Yatabe, 2010). El EGFR se expresa de manera ubicua en las capas epiteliales del pulmón, el intestino y la piel, y se relaciona con varios cánceres que muestran sobreexpresión y mutaciones en el EGFR (Uribe et al., 2021).

El EGFR también desempeña un papel clave en la regulación homeostática de la proliferación celular, la inhibición de la apoptosis, el aumento de la migración y diferenciación celular, la producción de moco, la activación de la respuesta inflamatoria y el mantenimiento de la supervivencia celular (**Figura 10**) (Yarden &

Sliwkowski, 2001). El EGFR se encuentra en la membrana plasmática y se expresa ampliamente en otros orgánulos intracelulares como los endosomas, las mitocondrias, el núcleo y los lisosomas (Bag et al., 2015).

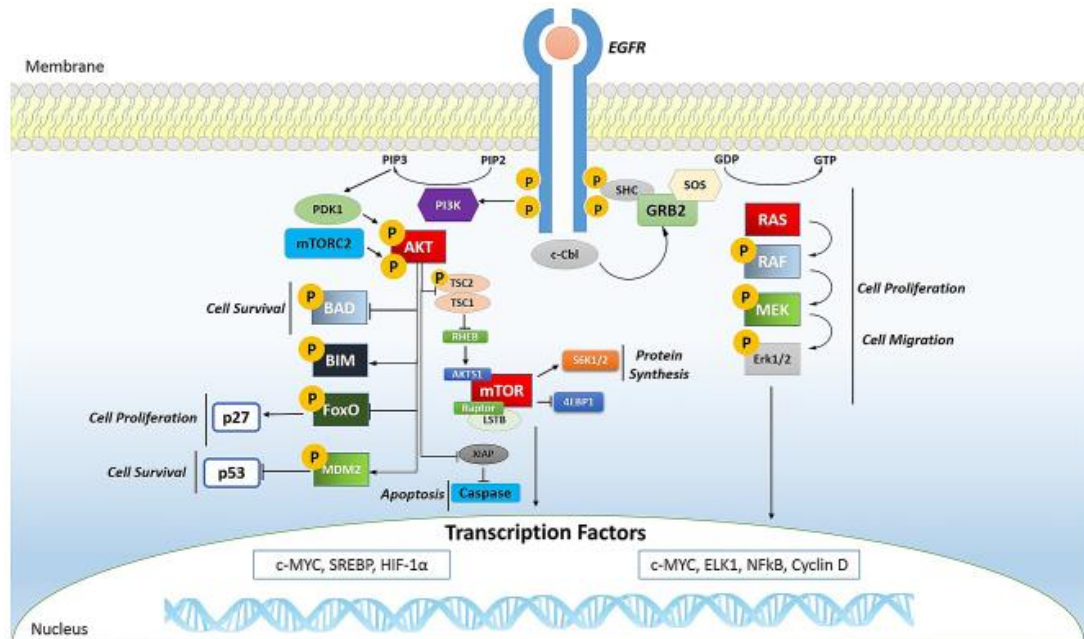


Figura 10. Señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) La unión del ligando al EGFR activa su actividad intrínseca tirosina cinasa. La autofosforilación de EGFR provoca la activación de varias vías de señalización, como PI3K/AKT y RAS/proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK). En ambos, la fosforilación es un evento predominante y juega un papel importante en la supervivencia celular (la activación de AKT fosforila BAD y MDM2), la proliferación celular (la activación de AKT fosforila Foxo, RAS fosforila RAF y fosforila MEK que fosforila Erk1/2), la migración celular (cascada de fosforilación de RAS), la apoptosis (la fosforilación de AKT es capaz de activar la caspasa). Sin embargo, la fosforilación de AKT provoca la activación de mTOR, importante en la síntesis de proteínas (Ardito et al., 2017).

OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar el potencial antiviral de inhibidores de cinasas contra el virus Mayaro.

Objetivos Específicos

- ✚ Analizar la toxicidad de los inhibidores de cinasas en diferentes líneas celulares.
- ✚ Evaluar el efecto de los inhibidores de cinasas en la producción de partículas virales de Mayaro.
- ✚ Validar aquellos inhibidores que presenten actividad en el análisis inicial en al menos dos líneas celulares humanas para verificar su actividad.
- ✚ Efectuar un análisis de dosis respuesta de los inhibidores que presenten actividad en los ensayos preliminares, con cada uno de los virus estudiados.
- ✚ Investigar el efecto de los inhibidores que presenten actividad sobre la expresión de proteínas virales.

Hipótesis de Trabajo

Ha: Inhibidores de cinasas aprobados por la FDA actúan como potenciales antivirales contra el virus Mayaro.

Ho: Inhibidores de cinasas aprobados por la FDA no actúan como potenciales antivirales contra el virus Mayaro.

CÁPITULO II: METODOLOGÍA

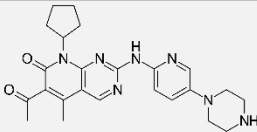
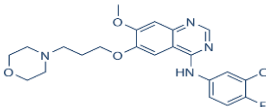
2.1 Líneas celulares y reactivos

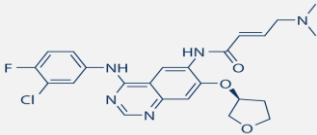
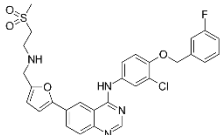
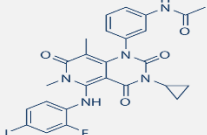
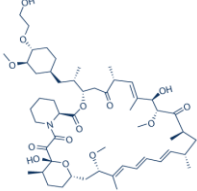
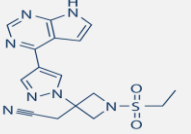
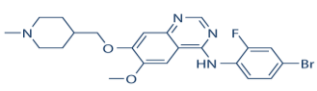
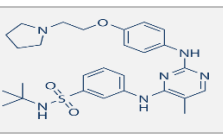
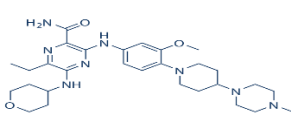
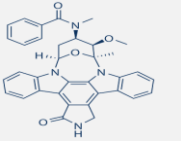
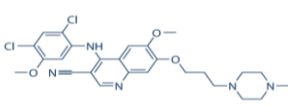
Se cultivaron células HeLa, A549 e IMR90 (cedido amablemente por la Dra. Carmen Rivas, CIMUS, Santiago de Compostela, España) y Vero-E6 (CRL-1586) y fibroblastos dérmicos humanos (HDFs) ambas obtenidas de la American Type Culture Collection, Manassas, VA, EEUU. Las células se crecieron en medio mínimo esencial (MEM) y medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor al 10 %, L-glutamina 2 mM y solución antibiótica de penicilina-estreptomicina al 1% (Gibco, Waltham, MA, EE. UU.) y se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %.

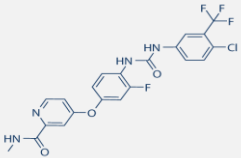
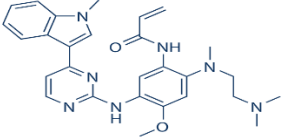
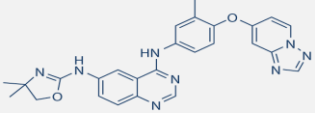
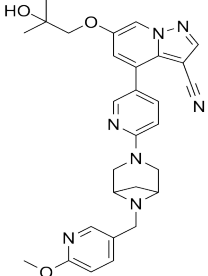
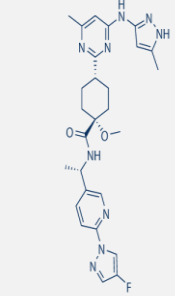
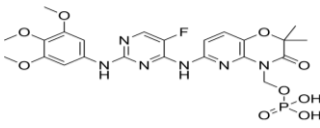
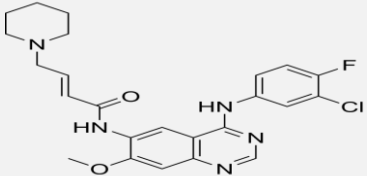
2.2 Inhibidores de cinasas

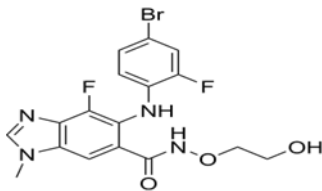
Se adquirió una biblioteca de fármacos aprobados por la FDA de MedChemExpress y Selleckchem (**Tabla 1**). Estos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Tabla 1. Fármacos aprobados por la FDA de MedChemExpress y Selleckchem utilizados como inhibidores de PK.

Inhibidor de cinasa	Cinasa blanco	Año de aprobación FDA	Estructura química	Indicación original
Palbociclib	CDK4, CDK6	2015		Cáncer de mama
Gefitinib	EGFR	2003		Cáncer no microcítico de pulmón

Afatinib	EGFR, ErbB2 (HER2), ErbB4 (HER4)	2013		Cáncer no microcítico de pulmón metastásico
Lapatinib	EGFR, ErbB2	2007		Cáncer de mama mestastásico
Trametinib	MEK1/2	2013		Melanoma metastásico
Everolimus	mTOR	2009		Cáncer renal, cáncer neuroendocrino de páncreas
Baricitinib	JAK1/2	2018		Artritis reumatoide
Vandetanib	VEGFR2, VEGFR3, EGFR	2011		Cáncer de tiroides
Fedratinib	JAK2, FLT3, c-RET	2019		Mielofibrosis
Gilteritinib	FTL3, AXL	2018		Leucemia mieloide aguda con mutaciones FLT3
Midostaurin	PKCα/β/γ, Syk, Flk-1, Akt, PKA, c-kit, c-Fgr, c-Src, FTL3	2017		Leucemia mieloide aguda positiva para FLT3, leucemia de mastocitos
Bosutinib	Src/Abl, PI3K/AKT/mTOR	2012		Leucemia mieloide

Regorafenib	VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR β , c-Kit, RET, Raf-1	2012		Cáncer colorrectal
Osimertinib	EGFR	2015		Cáncer no microcítico de pulmón metastásico con mutación en EGFR
Tucatinib	ErbB-2	2020		Cáncer de mama metastásico positivo para Her2
Selpercatinib	c-RET	2020		Cáncer de tiroides y cáncer de pulmón
Pralsetinib	c-RET	2020		Cáncer no microcítico de pulmón positivo para fusión de c-RET
Fostamatinib	Syk	2018		Trombocitopenia inmune crónica
Dacomitinib	ErbB2, ErbB4	2018		Cáncer no microcítico de pulmón positivo para EGFR

Binimetinib	MEK1/2	2018		Melanoma
--------------------	--------	------	--	----------

2.3 Cepas de virus y propagación

La cepa del MAYV (AVR0565, San Martín, Perú) fue proporcionada por el Dr. Scott Weaver del Centro Mundial de Referencia para Virus Emergentes y Arbovirus (WRCEVA) de la Universidad de Texas Medical Branch (UTMB), EE. UU. Los virus se propagaron en células Vero-E6 en MEM suplementado con FBS al 2 %. Los sobrenadantes de las células infectadas se recolectaron, aclararon y concentraron utilizando tubos Amicon Ultra (Merck, Kenilworth, NJ, EE. UU.), y luego se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

2.4 Análisis de citotoxicidad

La toxicidad de los inhibidores de cinasas se evaluó mediante el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sembraron $2,5 \times 10^4$ células HeLa y HDFs en placas de 96 pocillos en MEM sin rojo fenol. Luego, las células se trataron con los inhibidores de cinasas a distintas concentraciones (0, 2.5, 5 y 10 μM) y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO_2 al 5%. A las 24 o 48 h después del tratamiento, se añadió 20 μL de MTT y se incubaron durante 3 h más y posteriormente se midió la absorbancia a 570 nm utilizando un espectrofotómetro lector de microplacas (BioTek, Winooski, VT, EE. UU.). Los resultados se expresaron como el porcentaje de células viables en relación con las células control no tratadas.

2.5 Ensayo de formación de placas de virus

Se infectaron monocapas confluentes de células Vero-E6 en placas de 6 pocillos con diluciones de 1:10 de cada muestra de sobrenadante celular. Una hora después de la infección (hpi), se retiró el inóculo y se añadió una solución de medio y agar suplementada con FBS al 4 %. A continuación, las células infectadas se incubaron durante 3 días a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Finalmente, se retiró el agar y las células se fijaron con solución de formaldehído al 4 %, se retiró el agar y las células se tiñeron con cristal violeta al 2 % disuelto en metanol al 30 %. Se contó el número de placas y se expresó como unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL).

2.6 Análisis de proteínas

Las células fibroblastos dérmicos humanos (HDFs) se trataron con inhibidores de cinasas y se infectaron con el MAYV. Las células no tratadas y no infectadas sirvieron como controles. Las monocapas confluentes de las células se lisaron con tampón de carga Laemmli con DTT al 10 % (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron en una solución de leche descremada al 5 % en tampón T-TBS durante 30 minutos. Las membranas se incubaron durante la noche a 4 °C con los siguientes anticuerpos primarios: policlonal de conejo anti-MAYV E1, policlonal de conejo anti-MAYV nsP1 y anti-GAPDH monoclonal de conejo (D16H11, Cat. # 5174, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE. UU.). Después de esto, las membranas se lavaron 3 veces en tampón T-TBS 1X durante 10 minutos y se incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo de cabra conjugado con HRP (Cat. # 926-80011, LI-COR, Lincoln, NE, EE. UU.) a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalmente, las membranas se incubaron con SignalFire™ ECL Reagent (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE.

UU.) durante 3 min y la señal quimioluminiscente se detectó con un escáner C-Digit (LI-COR, Lincoln, NE, EE. UU.).

2.7 Citometría

Células A549 o IMR90 se pretrataron con los inhibidores de cinasas a dosis de 5 o 10 μ M o DMSO al 0,1 % como control durante 2 h. Luego, se retiró el medio y se infectaron las células con los virus GFP-VSV, GFP-HCMV o Flu-GFP a un MOI de 0,5 (MOI baja) o 10 (MOI alta). Después de 2 h de absorción del virus, se añadió a las células medio fresco suplementado con inhibidores de cinasas o DMSO y las células se incubaron durante 24 hpi. El porcentaje de células infectadas o la intensidad de fluorescencia se cuantificó mediante citometría de flujo en CytoFLEX.

2.8 Análisis estadístico

Los datos se analizaron con la prueba de Mann-Whitney y la prueba ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnett utilizando el programa GraphPad Prism versión 8.0.2 para Windows. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. Todos los experimentos se realizaron al menos 3 veces con 3 repeticiones. Para cada experimento, se muestra el promedio y la desviación estándar.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

3.1 Análisis de citotoxicidad de los inhibidores de las cinasas

Para determinar que inhibidores de cinasas aprobados por la FDA eran capaces de inhibir la infección de MAYV se evaluó el efecto citotóxico en células de cáncer de cuello uterino (HeLa) mediante el ensayo de MTT. Las células HeLa se trataron con los inhibidores de cinasas a concentraciones que oscilaban entre 2.5 y 10 μM . Se definieron como tóxicos aquellos inhibidores que mostraban una viabilidad celular menor de 80 %.

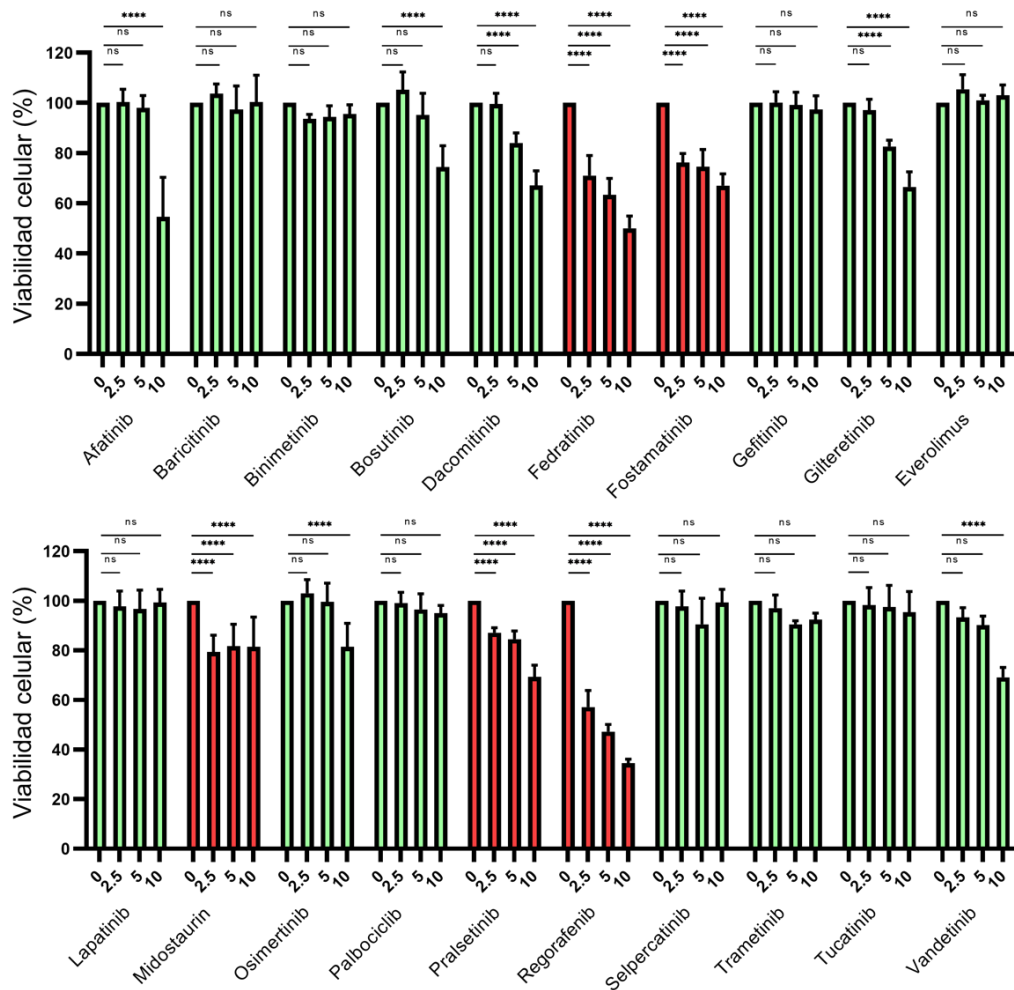


Figura 11. Análisis de la citotoxicidad de los inhibidores de cinasas. Células HeLa fueron tratadas con los inhibidores de cinasas a las concentraciones indicadas o DMSO (0.1 %) como control. Después de 24 h de incubación se analizó la viabilidad celular utilizando el ensayo MTT. Los datos experimentales se analizaron con la prueba ANOVA de una vía. Se muestran las diferencias estadísticamente significativas: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$, ns: no significativo.

Como se observa en la **Figura 11**, hubo una reducción significativa de células viables tras el tratamiento con Fedratinib, Fostamatinib, Midostaurin, Pralsetinib y Regorafenib en todas las concentraciones probadas, por lo que estos inhibidores se descartaron del estudio. El resto de inhibidores estudiados fueron bien tolerados en las distintas dosis ensayadas.

3.2 Inhibidores de cinasa reducen la replicación del MAYV en células HeLa

Para validar si los inhibidores de cinasas que no resultaron tóxicos (75 %) influyen en la replicación de MAYV se cuantificó la producción de partículas virales en sobrenadantes de células HeLa infectadas y tratadas con estos inhibidores, mediante ensayos de formación de placas.

Baricitinib, Everolimus y Palbociclib no tienen un efecto antiviral ya que no inhibieron la producción de progenie viral del MAYV. Es llamativo el fuerte efecto que tuvieron los inhibidores Afatinib y Bosutinib reduciendo los títulos virales alrededor de 4 logaritmos. El resto de los compuestos, entre ellos, Binimetinib, Dacomitinib, Gefitinib, Gilteretinib, Lapatinib, Osimertinib, Selpercatinib, Trametinib, Tucatinib y Vandetinib, mostraron una reducción significativa de los títulos virales (entre 1 y 2 logaritmos) (**Figura 12**). Estos resultados indican que estos inhibidores de cinasas son capaces de afectar la replicación de MAYV.

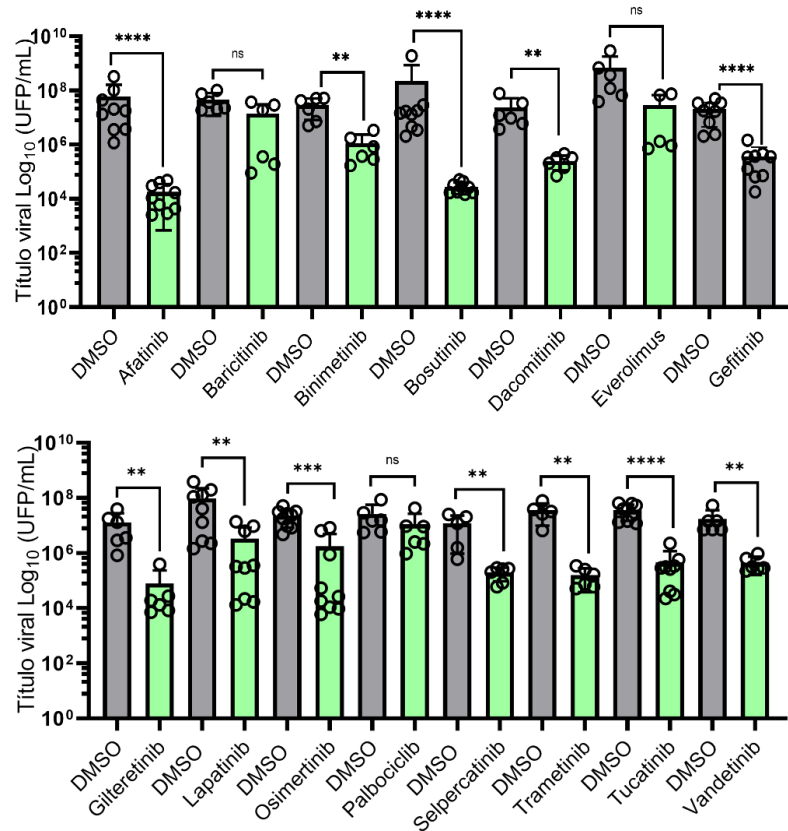


Figura 12. Inhibición en la replicación del MAYV por los inhibidores de cinasas. Las células HeLa se trataron previamente con los inhibidores de cinasas (2,5, 5 o 10 μ M) o DMSO al 0,1% como control durante 1 h. Luego, se eliminó el medio con el tratamiento y las células se infectaron con MAYV a un MOI de 10. Después de 1 h de absorción del virus, se agregó medio fresco con inhibidores de cinasas o DMSO y las células se incubaron durante 24 hpi. Los rendimientos de progenie viral en los sobrenadantes celulares recolectados se cuantificaron mediante el ensayo de formación de placas. Los datos se analizaron utilizando la prueba de Mann-Whitney. Se muestran diferencias estadísticamente significativas: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$, ns: no significativo.

3.3 Inhibidores de cinasas también inhiben a MAYV en HDFs

Aquellos inhibidores que presentaron actividad antiviral en el análisis inicial, se validaron en la línea celular humana primaria, fibroblastos dérmicos (HDFs).

Primero, se llevó a cabo el análisis de citotoxicidad mediante el ensayo de MTT para determinar la concentración de los fármacos a utilizar en los ensayos posteriores. De los inhibidores de cinasas probados en los HDFs, Gilteretinib fue el único que resultó ser tóxico por lo que fue excluido del estudio (**Figura 13 A**) y el resto fue bien tolerado en dosis de 2.5 a 10 μ M. Después, se evaluó el efecto de los inhibidores no tóxicos en la replicación de MAYV. Estos resultados indican que Afatinib, Bosutinib, Osimertinib, Gefitinib, Lapatinib, Dacomitinib y Tucatinib promueven una reducción significativa en los títulos virales de MAYV con respecto a su control (**Figura 13 B**). Es interesante resaltar que con excepción de Bosutinib, los demás inhibidores bloquean la actividad de una o más isoformas del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Por lo tanto, decidimos enfocarnos en este grupo de compuestos para caracterizar su efecto sobre el MAYV.

Diversos estudios han demostrado que la inhibición de EGFR podría tener efectos antivirales, ya que el receptor no solo está involucrado en las respuestas celulares frente a estímulos de crecimiento, sino que distintos virus activan el EGFR para facilitar la entrada, replicación y propagación viral, así como la evasión de la respuesta inmune, incluido el virus de la hepatitis C, el virus Zika, el virus respiratorio sincitial, el virus de la encefalitis japonesa y otros (Noh & Shin, 2023). Sin embargo, aún no se ha estudiado si la replicación del MAYV requiere la actividad del EGFR por lo que comprender su posible impacto en la infección viral representa un posible blanco en el desarrollo de terapias antivirales.

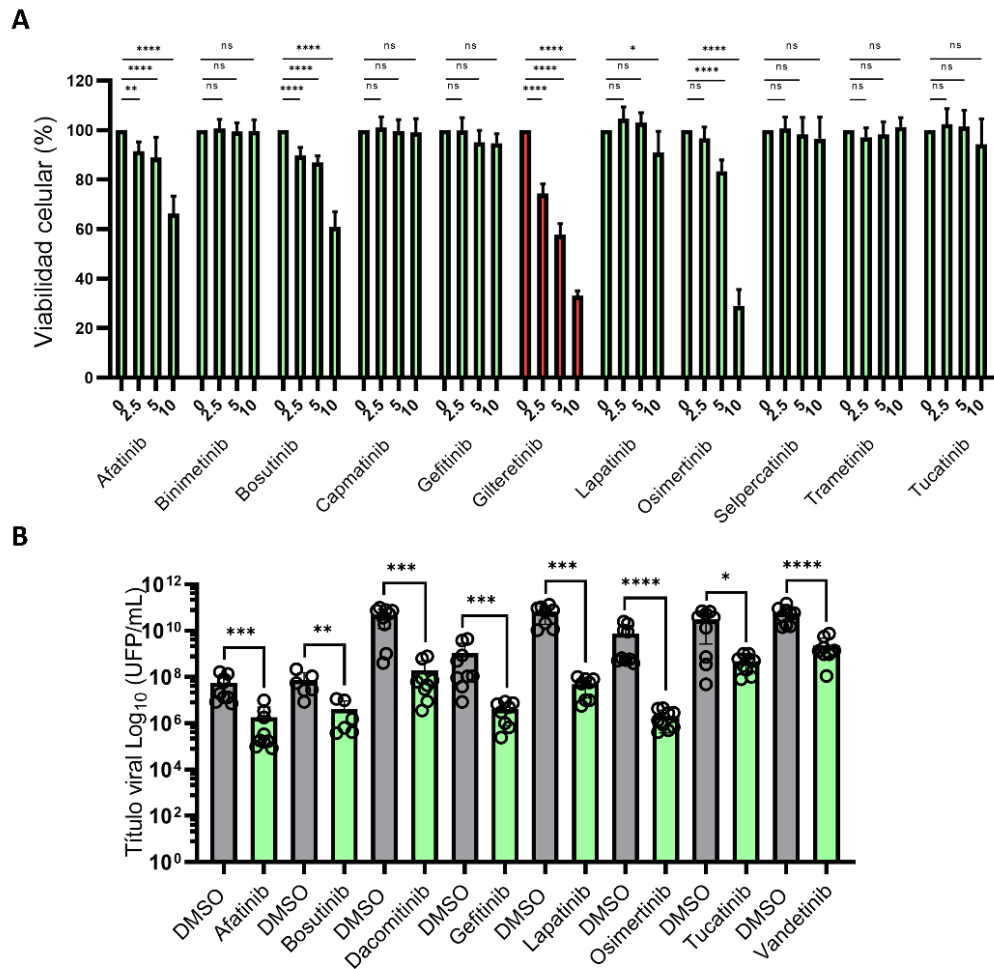


Figura 13. Validación de la actividad de los inhibidores de cinasas en fibroblastos dérmicos humanos (HDFs). El ensayo de citotoxicidad de los inhibidores se realizó como se describió previamente (**A**). Los HDFs se pretrataron con inhibidores de cinasas (2,5, 5 o 10 µM) o DMSO al 0,1% como control durante 1 h. Luego, se retiró el medio y las células se infectaron con el MAYV a un MOI de 1. Después de 1 h de absorción del virus, se agregó medio fresco con inhibidores de cinasas o DMSO y luego las células se incubaron durante 24 hpi. La producción de partículas virales infecciosas se cuantificó como se describió previamente (**B**). Los datos experimentales se analizaron con la prueba de Mann-Whitney. Las diferencias estadísticamente significativas son mostradas: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns: no significativo.

3.4 Los inhibidores de EGFR reducen los títulos virales de otros alfavirus

Para evaluar si el impacto de la inhibición de EGFR afecta la replicación de otros arbovirus, seleccionamos los virus Chikungunya y Zika (ZIKV), un alfavirus y un flavivirus, respectivamente. En la **(Figura 14)** se observa que al bloquear EGFR con los inhibidores Afatinib, Gefitinib, Osimertinib y Tucatinib se redujo significativamente los títulos virales en células infectadas con CHIKV **(Figura 14 A)**. En el caso de ZIKV **(Figura 14 B)**, se observó que los compuestos Afatinib, Gefitinib, Tucatinib, Lapatinib y Osimertinib también mostraron actividad contra este virus. Aunque se observó una tendencia a la bajada de los títulos con Lapatinib para el CHIKV esta no fue estadísticamente significativa **(Figuras 14 A y 14 B)**. En conclusión, los inhibidores de EGFR parecen tener una posible actividad antiviral de amplio espectro.

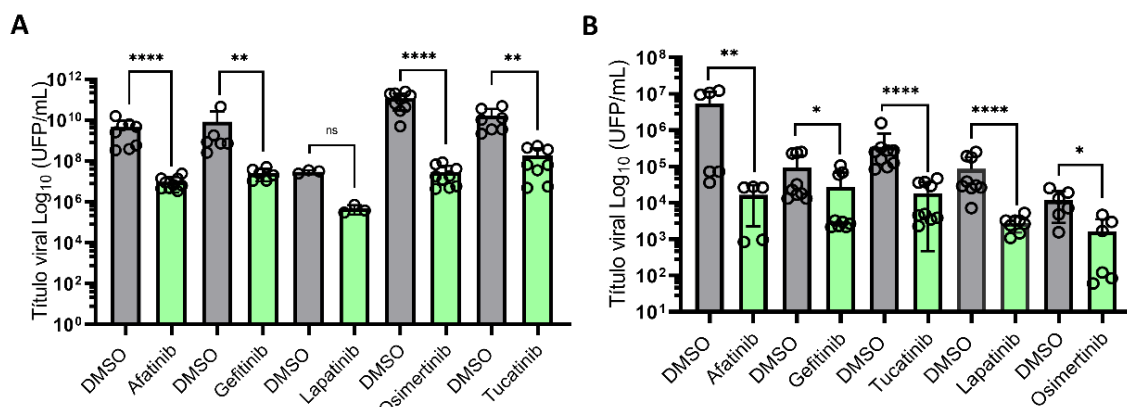


Figura 14. Inhibidores de EGFR afectan la replicación del CHIKV y ZIKV. Los HDFs se pretrataron con inhibidores de cinasas (2,5, 5 o 10 μ M) o DMSO al 0,1% como control durante 1 h. Luego, se retiró el medio y las células se infectaron con el CHIKV **(A)** y ZIKV **(B)** a un MOI de 1. Después de 1 h de absorción del virus, se agregó medio fresco con inhibidores de EGFR o DMSO y luego las células se incubaron durante 24 hpi. La producción de partículas virales infecciosas se cuantificó como se describió previamente. Los datos experimentales se analizaron con la prueba de Mann-Whitney. Las diferencias estadísticamente significativas son mostradas: ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; ns: no significativo.

3.5 El efecto de los inhibidores de EGFR sobre el MAYV es dependiente de la dosis

Para determinar si el efecto de los inhibidores de EGFR es dependiente de la dosis, se cuantificó la producción de virus en sobrenadantes de células HDFs tratadas con concentraciones crecientes de los compuestos. Los resultados obtenidos (**Figura 15**) muestran una reducción significativa dependiente de la dosis en los títulos virales de Afatinib, Gefitinib, Lapatinib, Osimertinib y Tucatinib (**Figura 15 A-E**).

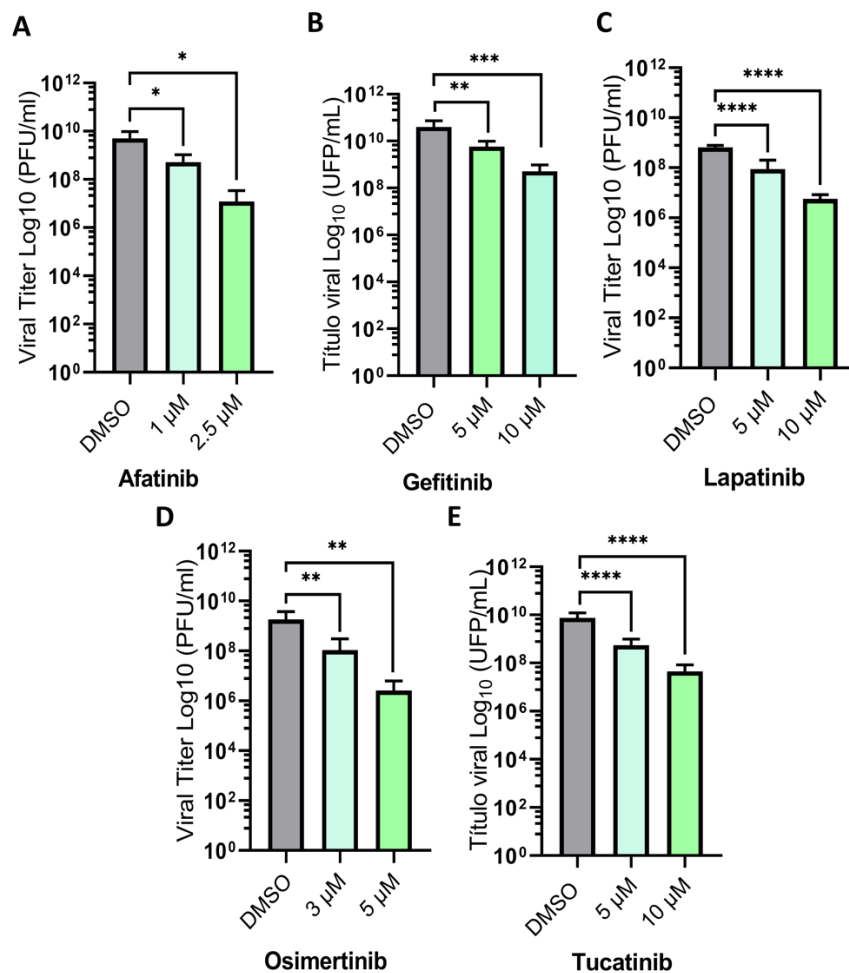


Figura 15. Inhibidores de EGFR son dependiente de la dosis. HDFs se infectaron con el MAYV utilizando un MOI de 1. Después de 1 h de adsorción del virus, las células se trataron con las dosis indicadas de los diferentes inhibidores de cinasas o DMSO (como control). Luego, se retiró el medio y se agregó medio fresco con los inhibidores de cinasas o DMSO y las células se incubaron durante 24 hpi. La producción de partículas virales infecciosas se cuantificó como se describió previamente. Los datos experimentales se analizaron con la prueba ANOVA de una vía. Se muestran las diferencias estadísticamente significativas: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; ns: no significativo.

3.6 Inhibidores de EGFR reducen los niveles de las proteínas las proteínas virales E1 y nsP1 del MAYV

Para evaluar si EGFR afecta la expresión de las proteínas del MAYV, se llevó a cabo un análisis de inmunoblot en células infectadas tratadas y no tratadas con inhibidores de EGFR, utilizando anticuerpos específicos contra las proteína estructural (E1) y no estructural (nsP1). HDFs se infectaron con el MAYV como indicamos previamente y después de 24 hpi, se recogieron las proteínas para su análisis. Los resultados presentados en la **Figura 16** muestran que el tratamiento con Afatinib, Osimertinib, Tucatinib, Gefitinib y Lapatinib, provocaron una reducción significativa de los niveles de ambas proteínas virales en comparación con las células no tratadas. Por lo tanto, los datos sugieren que los inhibidores de EGFR afectan la expresión de las proteínas virales del MAYV.

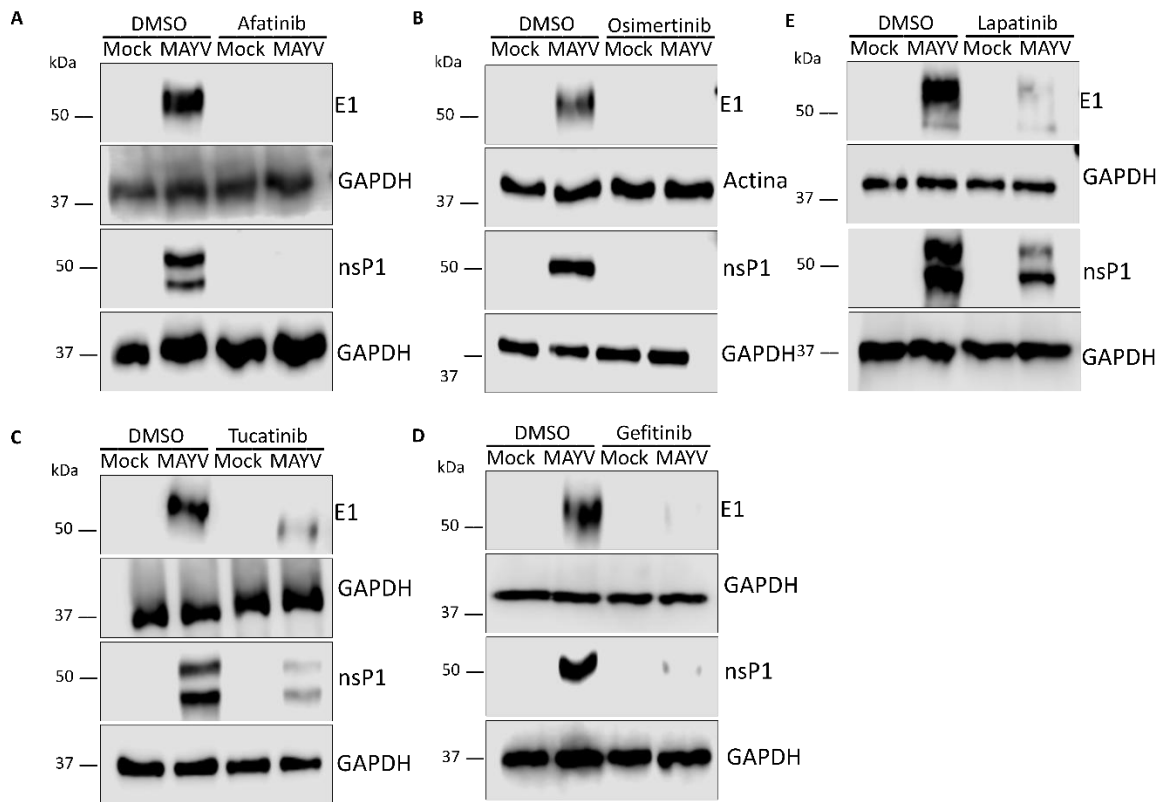


Figura 16. La inhibición de EGFR disminuye los niveles de las proteínas E1 y nsP1 de MAYV. HDFs se infectaron con MAYV a una MOI de 1 y se trataron con los inhibidores del EGFR. Tras 24 h de incubación, se obtuvieron extractos de proteínas y se analizaron los niveles de proteínas virales E1 y nsP1 mediante Western blot. La proteína GAPDH y actina se utilizó como control de carga. kDa: kilodaltons.

3.7 Los inhibidores de EGFR actúan durante las etapas tempranas de la infección del MAYV

Se analizó el efecto de los inhibidores de EGFR Tucatinib y Osimertinib sobre la replicación del MAYV a través de un ensayo de tiempo de adición. Para ello, se administraron los inhibidores en diferentes intervalos de tiempo tras la infección con el MAYV, y se evaluó la producción viral en cada uno de estos puntos. Los resultados obtenidos sugieren que solo la adición de los inhibidores en las primeras horas de la infección ejerce un efecto antiviral sobre el MAYV.

(Figura 17), sugiriendo que EGFR podría ser importantes en etapas tempranas de la replicación.

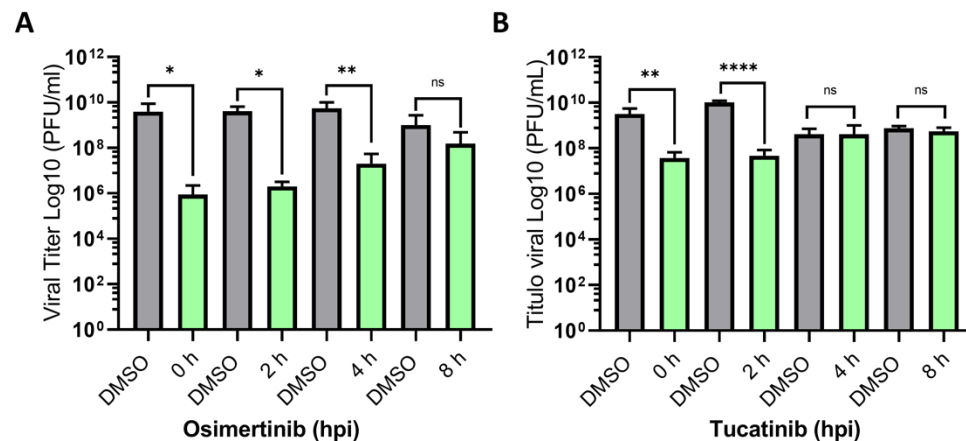


Figura 17. Ensayo de tiempo de adición. HDFs se infectaron con MAYV como se ha descrito anteriormente. Se añadió Osimertinib (A) o Tucatinib (B) tras 0, 2, 4 y 8 horas tras la infección. En las células control, se añadió DMSO (0,1%). A las 24 hpi se evaluó la producción de rendimiento viral en los sobrenadantes celulares. Los títulos virales se expresaron como UFP/mL. Los datos experimentales se analizaron con la prueba ANOVA de una vía. Se muestran las diferencias estadísticamente significativas: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ***; ns: no significativo.

3.8 Tucatinib y Osimertinib también afectan la replicación de VSV, IAV y HCMV

Gracias a la oportunidad de una estancia que llevé a cabo en el Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMUS) en Santiago de Compostela, España, bajo la supervisión de la Dra. Carmen Rivas Vázquez en el Laboratorio de Virus y Cáncer, evaluamos dos de los inhibidores de EGFR como posibles antivirales contra el virus de la Estomatitis Vesicular (VSV), virus de la Influenza A (IAV), Vaccinia virus (VACV) y Citomegalovirus Humano (HCMV).

En primer lugar, analizamos la citotoxicidad de 2 inhibidores de EGFR, los inhibidores Tucatinib y Osimertinib en células A549 y IMR90 utilizando el método de MTT. Como se observa en la **Figura 18**, los inhibidores Tucatinib y Osimertinib no afectan la viabilidad de las células A549 en ninguna de las dosis probadas en un período de incubación de 72 h (**Figura 18 A**). Por otro lado, Osimertinib mostró una fuerte toxicidad a la dosis de 10 μ M en las células IMR90, mientras que Tucatinib fue bien tolerado en esta línea celular (**Figura 18 B**).

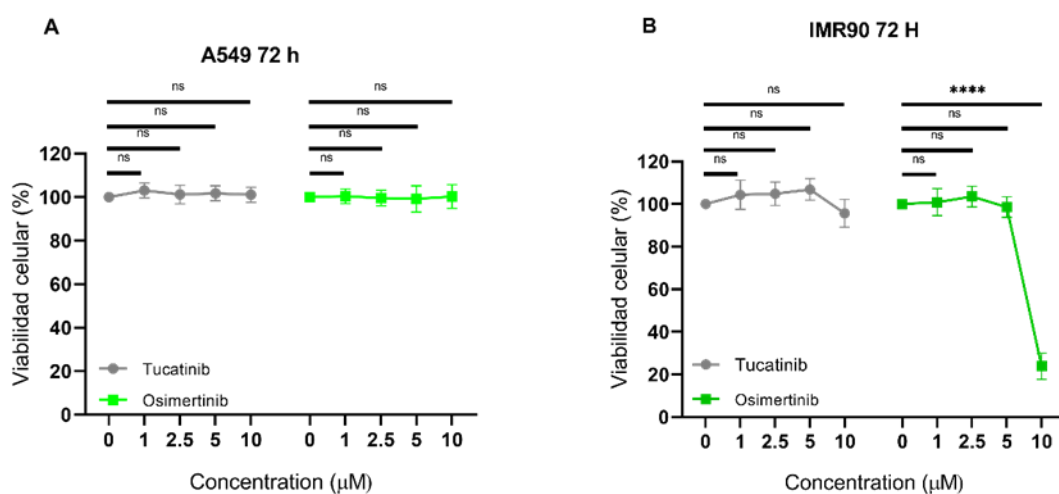


Figura 18. Análisis de la toxicidad celular de los inhibidores Tucatinib y Osimertinib. Células A549 (A) o IMR90 (B) fueron tratadas con las dosis indicadas de Tucatinib, Osimertinib o DMSO (0.1%) como control. Después de 72 h de incubación, la viabilidad celular se analizó mediante el ensayo de MTT. La significancia estadística se denotó como: ns: no significativo; **** $p < 0.0001$.

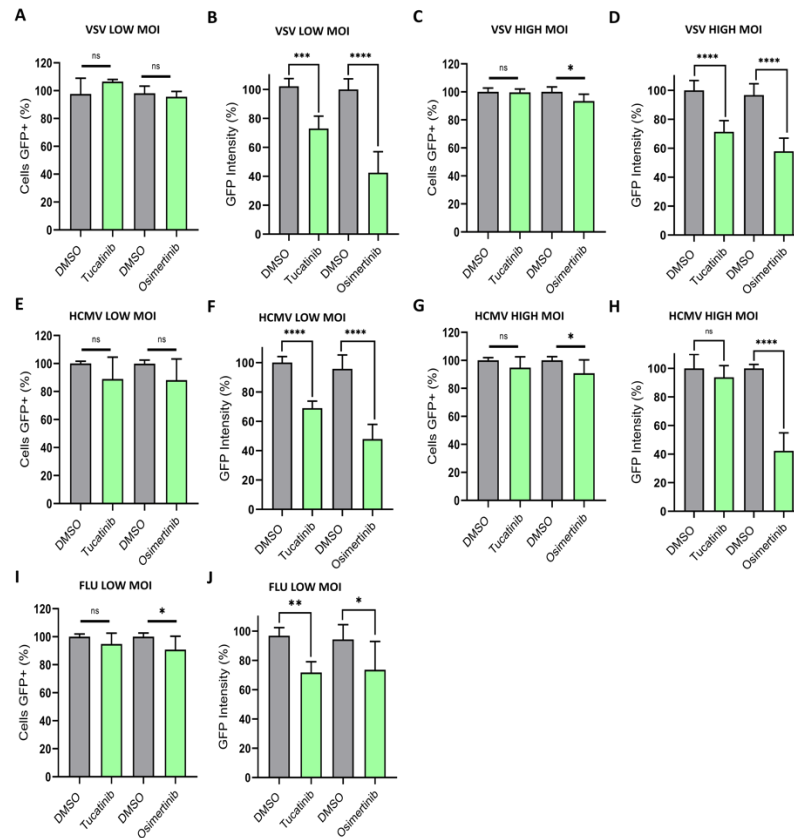


Figura 19. Tucatinib y Osimertinib reducen la intensidad de GFP de VSV, IAV y HCMV. Células A549 o IMR90 fueron pretratadas con los inhibidores Tucatinib, Osimertinib o DMSO como control durante 2h. Tras ese período, se retiraron los tratamientos y las células se infectaron con los virus GFP-VSV, HCMV-GFP o Flu-GFP. Después de la absorción de los virus, las células fueron tratadas con los inhibidores en medio fresco e incubadas durante 24h. La fluorescencia se detectó mediante citometría. El % de células GFP positivas (**Figura 19 A, 19 C, 19 E, 19 G y 19 I**) o la intensidad media de la fluorescencia (**Figura 19 B, 19 D, 19 F, 19 H y 19 J**) son mostrados. Los resultados se analizaron con la prueba de t de Student. Se muestran las diferencias estadísticamente significativas: * $p < 0.01$ *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns: no-significativo.

Para evaluar el potencial efecto antiviral de los inhibidores Tucatinib y Osimertinib, células A549 o IMR90 se pretrataron con los inhibidores de cinasas a dosis de 5 o 10 μM o DMSO al 0,1 % como control durante 2 h. Luego, se retiró el

medio y se infectaron las células con los virus GFP-VSV, GFP-HCMV o Flu-GFP a un MOI de 0,5 (MOI baja) o 10 (MOI alta). Después de 2 h de absorción del virus, se añadió a las células medio fresco suplementado con inhibidores de cinasas o DMSO y las células se incubaron durante 24 hpi. El porcentaje de células infectadas o la intensidad de fluorescencia se cuantificó mediante citometría de flujo. Estos resultados indican que el % de células infectadas no se ve afectado por el tratamiento, pero si notamos una disminución significativa en la intensidad de GFP, lo que indica que Tucatinib y Osimertinib afectan la replicación de VSV, HCMV e IAV (Flu) (**Figura 19**).

3.9 Efecto de los inhibidores Tucatinib y Osimertinib en la expresión de las proteínas virales de VACV, VSV, IAV (Flu) y HCMV

Las células A549 o IMR90 se infectaron con VACV, VSV, IAV (Flu) o HCMV a una MOI de 0.5 o 10 y luego, se trataron con los inhibidores Tucatinib u Osimertinib. Después de los distintos tiempos de incubación, se obtuvieron extractos de proteínas y se analizaron los niveles de las proteínas virales mediante Western blot. Tucatinib disminuye significativamente los niveles de la proteína G de VSV (**Figura 20 C y 20 D**) en ambas MOI probadas. Por otro lado, solo Osimertinib fue eficaz contra VACV en la MOI baja (**Figura 20 A y 20 B**). Tucatinib y Osimertinib disminuyen los niveles de la proteína NS1 de Influenza A en una MOI alta (**Figura 20 E y 20 F**). Finalmente, Tucatinib fue eficaz reduciendo la proteína de HCMV en la MOI baja (**Figura 20 H**). En su conjunto, estos resultados indican que la inhibición de EGFR con Tucatinib u Osimertinib afectan la expresión de las proteínas virales de los virus estudiados.

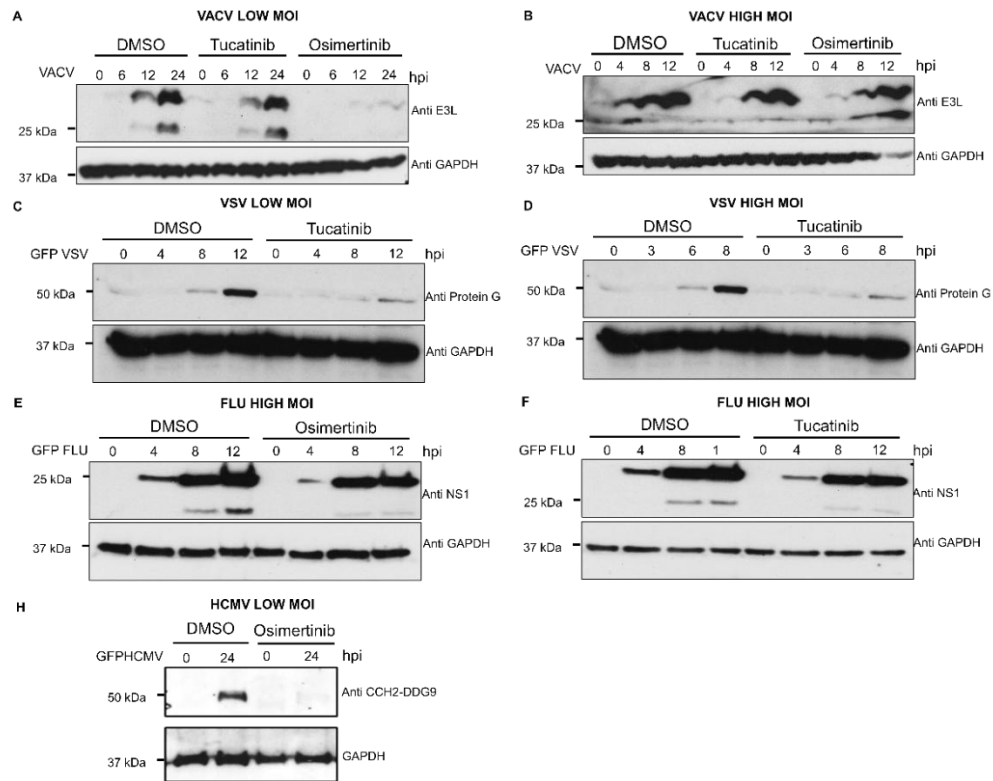


Figura 20. Evaluación de la expresión de las proteínas E3L, proteína G, NS1 y CCH2-DDG9 para VACV, VSV FLU y HCMV, respectivamente mediante Western Blot. La proteína GAPDH se utilizó como control de carga. kDa: kilodaltons.

DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue identificar fármacos inhibidores de cinasas aprobados por la FDA con actividad antiviral contra el MAYV. En la actualidad no existen vacunas ni terapias aprobadas para combatir el MAYV, ni para otros arbovirus como el ZIKV y OROV (Caicedo et al., 2021; Taylor-Robinson, 2016; Y. Zhang et al., 2024). El análisis de citotoxicidad de los inhibidores de cinasas en células HeLa mostró que los inhibidores Fedratinib, Fostamatinib, Midostaurin, Pralsetinib y Regorafenib redujeron significativamente la viabilidad celular en todas las concentraciones probadas en células HeLa. Este hallazgo es consistente con estudios previos, que han demostrado que distintos inhibidores de cinasas pueden inducir toxicidad en células tumorales (Chen et al., 2014; Paech et al., 2017) por lo que fueron descartados del estudio, ya que su toxicidad podía interferir en la evaluación de su potencial antiviral.

Los inhibidores de cinasas que no mostraron efectos citotóxicos significativos y fueron bien tolerados a las concentraciones ensayadas podrían ser útiles en el desarrollo de tratamientos antivirales contra el MAYV. La selección de fármacos antivirales debe considerar no solo su eficacia frente al patógeno, sino también su perfil de seguridad, especialmente en el tratamiento de infecciones virales en pacientes que pueden tener condiciones de salud preexistentes. Baricitinib, Everolimus y Palbociclib no presentaron actividad antiviral significativa, ya que no lograron inhibir la producción de progenie viral de MAYV. Esto sugiere que estos compuestos no afectan de manera relevante la replicación del virus en el contexto de las células HeLa infectadas. Esto podría deberse a la falta de interacción directa de estos inhibidores con las vías específicas que regulan la replicación viral del MAYV.

Al evaluar el impacto de los inhibidores no tóxicos en una línea celular de piel humana (HDFs) frente al MAYV, se observó una reducción significativa de los títulos virales en las células tratadas con los fármacos en comparación con el

control. Es notable que, con excepción de Bosutinib, la mayoría de estos compuestos son inhibidores EGFR o sus isoformas, sugiriendo que la replicación de MAYV podría involucrar la actividad de EGFR del mismo modo que este receptor influye en la replicación de otros virus de importancia clínica como Hepatitis C, Zika, SARS-CoV, Dengue (Hondermarck et al., 2020). También, se ha reportado que el EGFR está involucrado en la regulación de la respuesta inmune (Cheng et al., 2022). La investigación sobre el papel del EGFR en la replicación del MAYV es aún limitada, por lo que los resultados obtenidos en este estudio representan un avance significativo en la comprensión de las vías celulares implicadas en la infección por el MAYV.

Al evaluar el impacto de la inhibición de EGFR sobre la replicación de otros arbovirus, el análisis de los títulos virales en células infectadas mostró que, al bloquear EGFR con inhibidores específicos como Afatinib, Gefitinib, Osimertinib y Tucatinib, se observa una reducción significativa en los títulos virales del CHIKV, lo cual es relevante considerando la alta morbilidad que causa el CHIKV en zonas tropicales y subtropicales (Silva & Dermody, 2017). En el caso del ZIKV, los compuestos Afatinib, Gefitinib, Osimertinib, Lapatinib y Tucatinib también demostraron actividad antiviral, reduciendo significativamente los títulos virales en comparación con el control, confirmando que los inhibidores de EGFR tienen un efecto potencialmente amplio contra diferentes tipos de arbovirus (Sabino et al., 2021).

Se analizó si el efecto antiviral de las dosis de los inhibidores de EGFR sobre la replicación viral del MAYV y como se observa en la Figura 15 estos inhibidores ejercen un efecto antiviral eficaz que aumenta a medida que se incrementa la concentración del compuesto.

Los resultados obtenidos mediante inmunoblot demuestran una reducción significativa en los niveles de las proteínas virales E1 y nsP1, ambas esenciales

para la formación de nuevas partículas virales y la regulación de la transcripción del genoma viral (Marinho et al., 2024).

El enfoque de evaluar la eficacia de los inhibidores en diferentes momentos del ciclo de infección viral, proporcionó una visión más detallada de las fases específicas de la replicación viral que podrían verse afectadas por la inhibición de EGFR. En este caso, parece ser que EGFR podría estar involucrado en eventos celulares clave para la entrada viral o en la activación de las vías necesarias para la replicación temprana del virus.

Después se evaluó el potencial antiviral de los inhibidores de EGFR Tucatinib y Osimertinib en células A549 e IMR90 infectadas con los virus GFP-VSV, GFP-HCMV y Flu-GFP, utilizando diferentes multiplicidades de infección (MOI) para determinar su efectividad en condiciones de alta y baja carga viral. Los resultados obtenidos indican que, aunque el porcentaje de células infectadas no mostró diferencias significativas entre los tratamientos con Tucatinib y Osimertinib y el control, sí se observó una disminución considerable en la intensidad de fluorescencia de GFP en las células tratadas con los inhibidores. La ausencia de un cambio en el porcentaje de células infectadas puede indicar que los inhibidores no interfieren con la entrada del virus o con la fase inicial de la infección, sino más bien con la replicación o la producción de nuevos viriones después de la entrada viral. Este resultado proporciona evidencia de que Tucatinib y Osimertinib podrían tener un efecto antiviral amplio, afectando tanto virus de ARN como de ADN.

También se probó el efecto de los inhibidores Tucatinib y Osimertinib en la expresión de proteínas virales con varios virus: VACV, VSV, IAV y HCMV. Tucatinib afecta significativamente la reducción de la proteína G de VSV en ambas condiciones de MOI de 0,5 y 10. La proteína G es crítica para la formación de partículas virales y para la infectividad del VSV (Li et al., 2020), por lo que su reducción sugiere que Tucatinib puede interferir con la replicación viral, posiblemente afectando a la síntesis o ensamblaje de nuevos viriones. En cuanto

a VACV, Osimertinib sólo es eficaz en condiciones de MOI baja (0,5) sugiriendo que la inhibición del EGFR puede ser más eficaz en las primeras fases de la infección, cuando la carga viral es menor y el virus depende más de las funciones celulares para replicarse. Con el IAV, tanto Tucatinib como Osimertinib disminuyeron los niveles de proteína NS1 a MOI elevadas. La proteína NS1 desempeña un papel clave en la evasión de la respuesta inmunitaria del huésped y en la modulación de la maquinaria celular para promover la replicación viral (Haye et al., 2009), indicando que la inhibición del EGFR afecta a la replicación viral a nivel de la síntesis proteica o del ensamblaje del virión. En conjunto, estos resultados indican que los efectos observados varían según el tipo de virus y la carga viral, lo que implica que la eficacia de los inhibidores del EGFR puede depender de factores como la fase de la infección y la carga viral presente.

CÁPITULO IV: CONCLUSIONES

- El 75 % de los inhibidores de cinasas (15/20) fueron bien tolerados en células HeLa en dosis de 2.5 a 10 μ M. El resto de los compuestos fueron descartados del estudio.
- De los inhibidores de cinasas evaluados en células HeLa, el 80 % (12/15) mostraron una disminución significativa de la progenie viral de MAYV. Baricitinib, Everolimus y Palbociclib no inhibieron la replicación del virus.
- Se validaron los inhibidores de cinasas no tóxicos en HDFs, inhibidores como Afatinib, Bosutinib, Osimertinib, Gefitinib, Lapatinib, Dacomitinib y Tucatinib redujeron significativamente los títulos virales del MAYV, por lo que la inhibición de EGFR podría ser un enfoque terapéutico para tratar el MAYV.
- Los inhibidores de EGFR redujeron significativamente los títulos virales del CHIKV y del ZIKV, sugiriendo actividad antiviral de amplio espectro.
- Los inhibidores de EGFR Afatinib, Lapatinib, Gefitinib, Osimertinib y Tucatinib mostraron una reducción significativa dependiente de la dosis en la producción viral.
- El tratamiento con los inhibidores de EGFR redujo significativamente los niveles de las proteínas virales E1 y nsP1 en células infectadas con el virus MAYV, por lo que la inhibición de EGFR afecta la expresión de estas proteínas virales.
- Los inhibidores de EGFR Tucatinib y Osimertinib mostraron un efecto antiviral significativo solo cuando se administraron en las primeras horas de la infección con el MAYV. Sugiriendo que EGFR podría desempeñar un papel importante en las etapas tempranas de la replicación del virus.
- Tucatinib y Osimertinib redujeron la intensidad de fluorescencia, sugiriendo que afectan la replicación de los virus VSV, HCMV e IAV.
- Además, Tucatinib y Osimertinib redujeron la expresión de proteínas virales en varios virus, Tucatinib afectando a VSV y HCMV, y Osimertinib mostrando eficacia contra VACV e Influenza A.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta-Ampudia, Y., Monsalve, D. M., Rodríguez, Y., Pacheco, Y., Anaya, J. M., & Ramírez-Santana, C. (2018). Mayaro: an emerging viral threat? *Emerging Microbes & Infections*, 7(1), 163. <https://doi.org/10.1038/S41426-018-0163-5>
- 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>
- Andreolla, A. P., Borges, A. A., Bordignon, J., & Duarte dos Santos, C. N. (2022). Mayaro Virus: The State-of-the-Art for Antiviral Drug Development. *Viruses*, 14(8). <https://doi.org/10.3390/V14081787>
- Ardito, F., Giuliani, M., Perrone, D., Troiano, G., & Muzio, L. Lo. (2017). The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 40(2), 271. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2017.3036>
- Arévalo-Cepeda, Y. P., Bogotá-Sierra, M. A., Cortés-Pirazán, L. J., Sierra-Vargas, A. C., Moscoso, J. M., Méndez, W. A., & De Revisión, A. (2017). Virus mayaro: un arbovirus que amenaza a Colombia. *Medicina e Investigación Universidad Autónoma del Estado de México*, 5(2), 93–103. <https://medicinainvestigacion.uaemex.mx/article/view/19188>
- Arredondo-García, J. L., Méndez-Herrera, A., & Medina-Cortna, H. (2016). Arbovirus in Latin America. *Acta Pediatrica de Mexico*, 37(2), 111–131. <https://doi.org/10.18233/APM37NO2PP111-131>
- Auguste, A. J., Liria, J., Forrester, N. L., Giambalvo, D., Moncada, M., Long, K. C., Morón, D., de Manzione, N., Tesh, R. B., Halsey, E. S., Kochel, T. J., Hernandez, R., Navarro, J. C., & Weaver, S. C. (2015). Evolutionary and Ecological Characterization of Mayaro Virus Strains Isolated during an Outbreak, Venezuela, 2010. *Emerging Infectious Diseases*, 21(10), 1742. <https://doi.org/10.3201/EID2110.141660>
- Azar, S. R., Campos, R. K., Bergren, N. A., Camargos, V. N., & Rossi, S. L. (2020). Epidemic Alphaviruses: Ecology, Emergence and Outbreaks. *Microorganisms*, 8(8), 1–35. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8081167>
- Bag, N., Huang, S., & Wohland, T. (2015). Plasma Membrane Organization of Epidermal Growth Factor Receptor in Resting and Ligand-Bound States. *Biophysical Journal*, 109(9), 1925–1936. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2015.09.007>
- Beckham, J. D., & Tyler, K. L. (2015). Arbovirus Infections. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 21(6 NEUROINFECTIOUS DISEASE), 1599.

<https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000240>

- Caicedo, E. Y., Charniga, K., Rueda, A., Dorigatti, I., Mendez, Y., Hamlet, A., Carrera, J. P., & Cucunubá, Z. M. (2021). The epidemiology of Mayaro virus in the Americas: A systematic review and key parameter estimates for outbreak modelling. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(6), e0009418. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0009418>
- Carvalho, C. A. M., Silva, J. L., Oliveira, A. C., & Gomes, A. M. O. (2017). On the entry of an emerging arbovirus into host cells: Mayaro virus takes the highway to the cytoplasm through fusion with early endosomes and caveolae- derived vesicles. *PeerJ*, 2017(4). <https://doi.org/10.7717/PEERJ.3245/SUPP-12>
- Castelo-Soccio, L., Kim, H., Gadina, M., Schwartzberg, P. L., Laurence, A., & O'Shea, J. J. (2023). Protein kinases: drug targets for immunological disorders. *Nature Reviews Immunology* 23:12, 23(12), 787–806. <https://doi.org/10.1038/s41577-023-00877-7>
- Chen, T., Wang, C., Liu, Q., Meng, Q., Sun, H., Huo, X., Sun, P., Peng, J., Liu, Z., Yang, X., & Liu, K. (2014). Dasatinib reverses the multidrug resistance of breast cancer MCF-7 cells to doxorubicin by downregulating P-gp expression via inhibiting the activation of ERK signaling pathway. *Cancer Biology & Therapy*, 16(1), 106. <https://doi.org/10.4161/15384047.2014.987062>
- Cheng, Y. X., Xu, W. Bin, Dong, W. R., Zhang, Y. M., Li, B. W., Chen, D. Y., Xiao, Y., Guo, X. L., & Shu, M. A. (2022). Identification and functional analysis of epidermal growth factor receptor (EGFR) from *Scylla paramamosain*: The first evidence of two EGFR genes in animal and their involvement in immune defense against pathogen infection. *Molecular Immunology*, 151, 143–157. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2022.08.004>
- Choi, H., Kudchodkar, S. B., Reuschel, E. L., Asijaid, K., Borole, P., Ho, M., Wojtak, K., Reed, C., Ramos, S., Bopp, N. E., Aguilar, P. V., Weaver, S. C., Kim, J. J., Humeau, L., Tebas, P., Weiner, D. B., & Muthumani, K. (2019). Protective immunity by an engineered DNA vaccine for Mayaro virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0007042>
- Cohen, P., & Alessi, D. R. (2013). Kinase Drug Discovery – What's Next in the Field? *ACS chemical biology*, 8(1), 96. <https://doi.org/10.1021/CB300610S>
- De Figueiredo, M. L. G., & Figueiredo, L. T. M. (2014). Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47(6), 677–683. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0246-2014>
- De O'Mota, M. T., Avilla, C. M. S., & Nogueira, M. L. (2019). Mayaro Virus: A Neglected Threat Could Cause the Next Worldwide Viral Epidemic. *Future Virology*, 14(6), 375–377. <https://doi.org/10.2217/FVL-2019-0051>
- De Oliveira Mota, M. T., Ribeiro, M. R., Vedovello, D., & Nogueira, M. L. (2015).

- Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas. *http://dx.doi.org/10.2217/fvl.15.76*, 10(9), 1109–1122. <https://doi.org/10.2217/FVL.15.76>
- De Thoisy, B., Gardon, J., Alba Salas, R., Morvan, J., & Kazanji, M. (2003). Mayaro Virus in Wild Mammals, French Guiana. *Emerging Infectious Diseases*, 9(10), 1326. <https://doi.org/10.3201/EID0910.030161>
- Di Ianni, M. E. (2015). *Topología molecular aplicada a la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de la epilepsia refractaria*. <https://doi.org/10.35537/10915/51575>
- Diagne, C. T., Bengue, M., Choumet, V., Hamel, R., Pompon, J., & Missé, D. (2020). Mayaro Virus Pathogenesis and Transmission Mechanisms. *Pathogens*, 9(9), 1–23. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9090738>
- DiMasi, J. A., Grabowski, H. G., & Hansen, R. W. (2016). Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *Journal of Health Economics*, 47, 20–33. <https://doi.org/10.1016/J.JHEALECO.2016.01.012>
- 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>
- Forshey, B. M., Guevara, C., Laguna-Torres, V. A., Cespedes, M., Vargas, J., Gianella, A., Vallejo, E., Madrid, C., Aguayo, N., Gotuzzo, E., Suarez, V., Morales, A. M., Beingolea, L., Reyes, N., Perez, J., Negrete, M., Rocha, C., Morrison, A. C., Russell, K. L., ... Kochel, T. J. (2010). Arboviral Etiologies of Acute Febrile Illnesses in Western South America, 2000–2007. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0000787>
- Franca, O., de Paula, S., Paula Andreolla, A., Abel Borges, A., Bordignon, J., & Nunes Duarte dos Santos, C. (2022). Mayaro Virus: The State-of-the-Art for Antiviral Drug Development. *Viruses* 2022, Vol. 14, Page 1787, 14(8), 1787. <https://doi.org/10.3390/V14081787>
- Ganjan, N., & Riviere-Cinamond, A. (2020). Mayaro virus in Latin America and the Caribbean. *Rev Panam Salud Publica*;44, feb. 2020, 44. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.14>
- Geraghty, R. J., Aliota, M. T., & Bonnac, L. F. (2021). Broad-Spectrum Antiviral Strategies and Nucleoside Analogues. *Viruses*, 13(4), 667. <https://doi.org/10.3390/V13040667>
- Groot, H., Morales, A., & Vidales, H. (1961). Virus isolations from forest mosquitoes in San Vicente de Chucuri, Colombia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 10, 397–402. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.1961.10.397>

- Halsey, E. S., Siles, C., Guevara, C., Vilcarromero, S., Jhonston, E. J., Ramal, C., Aguilar, P. V., & Ampuero, J. S. (2013). Mayaro Virus Infection, Amazon Basin Region, Peru, 2010–2013. *Emerging Infectious Diseases*, 19(11), 1839. <https://doi.org/10.3201/EID1911.130777>
- Haye, K., Burmakina, S., Moran, T., García-Sastre, A., & Fernandez-Sesma, A. (2009). The NS1 Protein of a Human Influenza Virus Inhibits Type I Interferon Production and the Induction of Antiviral Responses in Primary Human Dendritic and Respiratory Epithelial Cells. *Journal of Virology*, 83(13), 6849–6862. https://doi.org/10.1128/JVI.02323-08/SUPPL_FILE/SUPPLEMENTAL_FIGURE_2.ZIP
- Henss, L., Yue, C., Kandler, J., Faddy, H. M., Simmons, G., Panning, M., Lewis-Ximenez, L. L., Baylis, S. A., & Schnierle, B. S. (2019). Establishment of an Alphavirus-Specific Neutralization Assay to Distinguish Infections with Different Members of the Semliki Forest Complex. *Viruses* 2019, Vol. 11, Page 82, 11(1), 82. <https://doi.org/10.3390/V11010082>
- Hondermarck, H., Bartlett, N. W., & Nurcombe, V. (2020). The role of growth factor receptors in viral infections: An opportunity for drug repurposing against emerging viral diseases such as COVID-19? *FASEB BioAdvances*, 2(5), 296. <https://doi.org/10.1096/FBA.2020-00015>
- Li, R., Qiao, S., Chen, X. xin, Xing, G., Li, X., & Zhang, G. (2020). Vesicular stomatitis virus glycoprotein suppresses nuclear factor kappa-B- and mitogen-activated protein kinase-mediated pro-inflammatory responses dependent on sialic acids. *International Journal of Biological Macromolecules*, 152, 828–833. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.02.322>
- Long, K. C., Ziegler, S. A., Thangamani, S., Hausser, N. L., Kochel, T. J., Higgs, S., & Tesh, R. B. (2011). Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 85(4), 750–757. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.2011.11-0359>
- Mackay, I. M., & Arden, K. E. (2016). Mayaro virus: a forest virus primed for a trip to the city? *Microbes and Infection*, 18(12), 724–734. <https://doi.org/10.1016/J.MICINF.2016.10.007>
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5600), 1912–1934. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1075762>
- Marinho, M. dos S., Zhang, Y. N., Cassani, N. M., Santos, I. A., Costa Oliveira, A. L., dos Santos Pereira, A. K., Corbi, P. P., Zhang, B., & Jardim, A. C. G. (2024). Development and validation of Mayaro virus with luciferase reporter genes as a tool for antiviral assays. *Heliyon*, 10(13), e33885. <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2024.E33885>
- Mavian, C., Rife, B. D., Dollar, J. J., Cella, E., Ciccozzi, M., Prosperi, M. C. F.,

- Lednicky, J., Morris, J. G., Capua, I., & Salemi, M. (2017). Emergence of recombinant Mayaro virus strains from the Amazon basin. *Scientific Reports*, 7(1), 8718. <https://doi.org/10.1038/S41598-017-07152-5>
- Mercorelli, B., Palù, G., & Loregian, A. (2018). Drug Repurposing for Viral Infectious Diseases: How Far Are We? *Trends in Microbiology*, 26(10), 865. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2018.04.004>
- Mitsudomi, T., & Yatabe, Y. (2010). Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *The FEBS Journal*, 277(2), 301–308. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2009.07448.X>
- Muñoz, M., & Navarro, J. C. (2012). Virus Mayaro: Un arbovirus reemergente en Venezuela y Latinoamérica. *Biomedica*, 32(2), 286–302. <https://doi.org/10.7705/BIOMEDICA.V32I2.647>
- Navarro, M. M., Revisión, J. C., Tema, D. E., Muñoz, M., & Navarro, J. C. (2012). Mayaro: A re-emerging Arbovirus in Venezuela and Latin America. *Biomédica*, 32(2), 288–302. <https://doi.org/10.7705/BIOMEDICA.V32I2.647>
- Noh, S. S., & Shin, H. J. (2023). Role of Virus-Induced EGFR Trafficking in Proviral Functions. *Biomolecules* 2023, Vol. 13, Page 1766, 13(12), 1766. <https://doi.org/10.3390/BIOM13121766>
- Nosengo, N. (2016). Can you teach old drugs new tricks? *Nature*, 534(7607), 314–316. <https://doi.org/10.1038/534314A>
- Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., & Mann, M. (2006). Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. *Cell*, 127(3), 635–648. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.09.026/ATTACHMENT/441CBE13-3D15-46D5-BCAD-E2598DA2142E/MMC2.XLS>
- Paech, F., Bouitbir, J., & Krähenbühl, S. (2017). Hepatocellular toxicity associated with tyrosine kinase inhibitors: Mitochondrial damage and inhibition of glycolysis. *Frontiers in Pharmacology*, 8(JUN), 367. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2017.00367/FULL>
- Sabino, C., Bender, D., Herrlein, M.-L., & Hildt, E. (2021). The Epidermal Growth Factor Receptor Is a Relevant Host Factor in the Early Stages of The Zika Virus Life Cycle In Vitro. *Journal of Virology*, 95(20), e01195-21. <https://doi.org/10.1128/JVI.01195-21>
- Sacco, F., Perfetto, L., Castagnoli, L., & Cesareni, G. (2012). The human phosphatase interactome: An intricate family portrait. *Febs Letters*, 586(17), 2732. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2012.05.008>
- Savarino, A., Boelaert, J. R., Cassone, A., Majori, G., & Cauda, R. (2003). Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases. *The Lancet. Infectious Diseases*, 3(11), 722. <https://doi.org/10.1016/S1473->

- Silva-Ramos, C. R., Mejorano-Fonseca, J. A., Hidalgo, M., Rodríguez-Morales, A. J., & Faccini-Martínez, Á. A. (2023). Clinical, Epidemiological, and Laboratory Features of Mayaro Virus Infection: a Systematic Review. *Current Tropical Medicine Reports*, 10(4), 309–319. <https://doi.org/10.1007/S40475-023-00308-6/TABLES/4>
- Silva, L. A., & Dermody, T. S. (2017). Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(3), 737. <https://doi.org/10.1172/JCI84417>
- Singha, M., Pu, L., Srivastava, G., Ni, X., Stanfield, B. A., Uche, I. K., Rider, P. J. F., Kousoulas, K. G., Ramanujam, J., & Brylinski, M. (2023). Unlocking the Potential of Kinase Targets in Cancer: Insights from CancerOmicsNet, an AI-Driven Approach to Drug Response Prediction in Cancer. *Cancers*, 15(16), 4050. <https://doi.org/10.3390/CANCERS15164050/S1>
- 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>
- Taylor-Robinson, A. W. (2016). A vaccine effective against Zika virus is theoretically possible but may not be delivered anytime soon. *Research and Reports in Tropical Medicine*, 7, 11. <https://doi.org/10.2147/RRTM.S108992>
- Uribe, M. L., Marrocco, I., & Yarden, Y. (2021). EGFR in Cancer: Signaling Mechanisms, Drugs, and Acquired Resistance. *Cancers 2021, Vol. 13, Page 2748*, 13(11), 2748. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13112748>
- Weaver, S. C., & Reisen, W. K. (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral research*, 85(2), 328–345. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2009.10.008>
- Weise, W. J., Hermance, M. E., Forrester, N., Adams, A. P., Langsjoen, R., Gorchakov, R., Wang, E., Alcorn, M. D. H., Tsetsarkin, K., & Weaver, S. C. (2014). A Novel Live-Attenuated Vaccine Candidate for Mayaro Fever. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(8), 2969. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0002969>
- Yarden, Y., & Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001 2:2, 2(2), 127–137. <https://doi.org/10.1038/35052073>
- Zhang, R., Kim, A. S., Fox, J. M., Nair, S., Basore, K., Klimstra, W. B., Rimkunas, R., Fong, R. H., Lin, H., Poddar, S., Crowe, J. E., Doranz, B. J., Fremont, D. H., & Diamond, M. S. (2018). Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. *Nature* 2018 557:7706, 557(7706), 570–574. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0121-3>

Zhang, Y., Liu, X., Wu, Z., Feng, S., Lu, K., Zhu, W., Sun, H., & Niu, G. (2024). Oropouche virus: A neglected global arboviral threat. *Virus Research*, 341, 199318. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2024.199318>

ANEXOS

Certificación de estancia en el Laboratorio de Virus y Cáncer, en el Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMUS), de la Universidad de Santiago de Compostela, España



Santiago de Compostela, 10 de Octubre de 2024

A quien pueda interesar:

Por este medio certifico que la Licda. Dalel Zagarra Ledezma con cédula de identidad personal No. 4-803-1655, ha realizado una pasantía en el Laboratorio de Virus y Cáncer bajo mi supervisión, en el Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas, de la Universidad de Santiago de Compostela, España. Esta pasantía inició el día 1 de julio de 2024 y terminó el día 10 de septiembre del año 2024.

Atentamente,

Carmen Rivas
Científico titular del CSIC
Investigadora principal del grupo virus y cáncer
Lab P2L7
CIMUS, Universidad de Santiago de Compostela
Avda Barcelona
15706 Santiago de Compostela
+34881815485

Asistencia y participación en modalidad de poster al “XVII Congreso Nacional de Virología”, Santiago de Compostela, España 2024



XVII

CONGRESO NACIONAL
DE VIROLOGÍA



CERTIFICADO DE COMUNICACIÓN

El trabajo titulado:

“Inhibition of the epidermal growth factor receptor with FDA-approved drugs blocks Mayaro virus replication”

**Dalel Zegarra, Dalkiria Campos, Paola E. Galán-Jurado, Patricia Valdés,
Juan Castillo Mewa, Carmen Rivas and José González-Santamaría**

Se ha presentado como póster en el XVII Congreso Nacional de Virología celebrado en Santiago de Compostela entre los días 2 y 5 de septiembre de 2024

Jesús López Romalde
Presidente Comité Organizador



XVII

CONGRESO NACIONAL
DE VIROLOGÍA



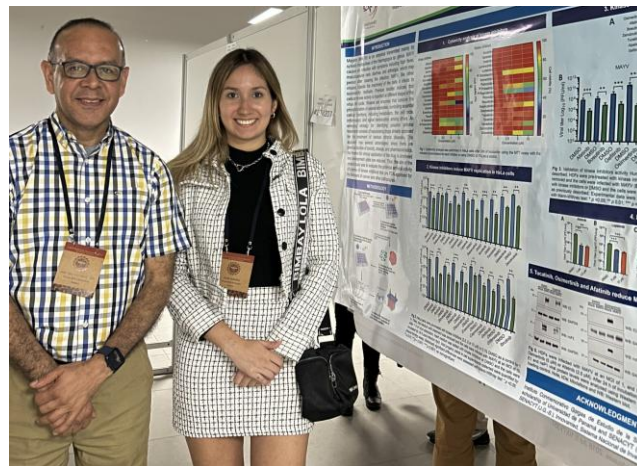
CERTIFICADO DE ASISTENCIA

D/Da. Dalel Issa Zegarra Ledezma

Ha participado en el XVII Congreso Nacional de Virología celebrado en Santiago de Compostela entre los días 2 y 5 de septiembre de 2024

Jesús López Romalde
Presidente Comité Organizador

Asistencia y participación en modalidad de poster en “7th Pan-American Dengue Research Network Meeting”, Lima, Peru 2023



Asistencia y participación en modalidad de poster a “XIX Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología - APANAC 2023

