



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LOS COMPUESTOS MARINOS
RADICOL Y MARIZOMIB CONTRA EL VIRUS MAYARO Y OTROS VIRUS DE
IMPORTANCIA MÉDICA”

POR:

FÉLIX R. GONZÁLEZ CASTILLO 8-971-2287

ISAAC V. TUÑÓN LORENZO 2-747-1579

Trabajo de graduación como
requisito para optar por el título de
Licenciatura en Biología con
orientación en
Genética y Biología Molecular

REPÚBLICA DE PANAMÁ, 2025



TRIBUNAL EXAMINADOR

Título:

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LOS COMPUESTOS MARINOS
RADICICOL Y MARIZOMIB CONTRA EL VIRUS MAYARO Y OTROS VIRUS DE
IMPORTANCIA MÉDICA.”

Elaborado Por:

Félix González Castillo 8-971-2287

Isaac Tuñón Lorenzo 2-747-1579

Trabajo de graduación como requisito para optar por el título de Licenciatura en
Biología con orientación en Genética y Biología Molecular.

Dr. JOSÉ GONZÁLEZ SANTAMARÍA
Tutor (Preside)

Dr. ARIEL MAGALLÓN TEJADA
Jurado

Dra. LEYDA ÁBREGO SÁNCHEZ
Jurado

DEDICATORIA

Para mis padres *Vicente y Alicia*, por enseñarme a luchar por los sueños, por ser mi pilar, motor e inspiración en todo momento, a mi hermana Lisbeth quien inicia a luchar por sus metas, que este logro sea para ti, de motivación para seguir luchando y siendo siempre perseverante, para mis tías *Dalia, María y Ruth* por darme la oportunidad de soñar y por creer en mí, gracias por su apoyo incondicional, estaré eternamente agradecido. A mis abuelos, mi familia, amigos, compañeros y personas que me han brindado su apoyo a lo largo de este camino.

I. Tuñón Lorenzo

Quiero dedicar este trabajo primeramente a mi madre *Dioselina*, quien se ha encargado de manera inquebrantable de mí, desde mi nacimiento hasta el día de hoy, seguidamente a mi segunda madre *María Abel* quien ha sido un apoyo incondicional para mí durante todos años de formación, seguidamente a mi padre *Basilio* quien me ha brindado todo su cariño y admiración y por último a mi ejemplo de superación a mi padrino y hermano *Dimas*.

F. González Castillo

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos primeramente a Dios por la oportunidad que nos ha dado de llegar hasta este momento tan importante de nuestras vidas, por habernos regalado la salud y la voluntad para culminar nuestro trabajo con éxito.

A nuestros padres, hermanos, tíos, abuelos y amigos, por darnos siempre su apoyo, sus consejos y estar en los momentos adversos de este camino.

Agradecemos al Instituto Conmemorativo Gorgas por abrirnos las puertas de sus laboratorios y de manera muy especial a nuestro tutor el Dr. José González Santamaría, por la oportunidad que nos ha brindado durante este tiempo, por ser un guía, consejero y ejemplo de perseverancia, gracias por confiar en nosotros y por compartir tan valiosos conocimientos durante este tiempo, que sin duda nos ayudarán a seguir creciendo. A todo el equipo de investigación, agradecemos también todo el apoyo, consejos, paciencia y sobre todo por esa amistad en estos dos años de trabajo, muchas gracias Dalkiria, Patricia, Dalel, Paola y Juan.

A la Dra. Carmen Rivas, por recibirnos en su laboratorio y hacernos sentir en casa, le agradecemos por tantos consejos que indiscutiblemente serán clave en el éxito de este trabajo y de nuestra vida profesional.

Al grupo de investigación de Virus & Cáncer del CiMUS le agradecemos, Jose, Montse, Beatriz, María y Rocío, muchas gracias por hacer de nuestra estancia una experiencia inolvidable.

A la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT-APY-NI-2024-B) por creer en nuestra propuesta y financiar este trabajo de investigación y al Ministerio de Economía y Finanzas (MEF) por fondos otorgados.

A nuestros co-asesores, Dr. Ariel Magallón y Dra. Leyda Ábrego, gracias por sus respaldos y sugerencias.

Infinitas gracias a todos los que nos han apoyado y nos siguen apoyando este crecimiento académico.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE GENERAL	V
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
JUSTIFICACIÓN	6
DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	6
MARCO TEÓRICO	9
VIRUS MAYARO.....	9
<i>Estructura Genómica</i>	10
<i>Ciclo de replicación de MAYV</i>	10
<i>Filogenia del Virus de Mayaro</i>	11
<i>Aspectos ecológicos</i>	12
<i>Fiebre de Mayaro</i>	13
<i>Patogénesis de MAYV</i>	14
VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR.....	15
VIRUS DE LA INFLUENZA A.....	16
VIRUS VACCINIA.....	17
CITOMEGALOVIRUS HUMANO	17
DIANAS TERAPEÚTICAS	18
<i>Proteosoma</i>	18
<i>Sistema Ubiquitina Proteosoma</i>	19
<i>Proteína de Choque Térmico</i>	20
<i>Proteína de Choque Térmico 90</i>	20
COMPUESTO NATURALES	22
<i>Radicicol</i>	22
<i>Marizomib</i>	23
OBJETIVOS	24
OBJETIVO GENERAL.....	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
HIPÓTESIS	25
METODOLOGÍA	27
CULTIVO DE CÉLULAS, TRATAMIENTO CON LOS COMPUESTOS Y.....	27
PREPARACIÓN CON LOS COMPUESTOS	27

ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR	28
ENSAYOS DE INFECCIÓN VIRAL	28
ENSAYO DE FORMACIÓN DE PLACAS	29
ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	30
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
RESULTADOS	33
ANÁLISIS DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS MARINOS RADICOL Y MARIZOMIB	33
RADICOL Y MARIZOMIB PREVIENE EL EFECTO CITOPÁTICO INDUCIDO POR MAYV	36
RADICOL Y MARIZOMIB INHIBEN LA PRODUCCIÓN DE PROGENIE DE MAYV DE FORMA DEPENDIENTE DE LA DOSIS	37
RADICOL Y MARIZOMIB REDUCEN LOS NIVELES DE LAS PROTEÍNAS E1 Y NSP1 DE MAYV DE FORMA DEPENDIENTE DE LA DOSIS	38
EL EFECTO ANTIVIRAL DE RADICOL Y MARIZOMIB SOBRE MAYV ES INDEPENDIENTE DE LA CEPA DE VIRUS ANALIZADA	39
RADICOL, PERO NO MARIZOMIB, INTERFIERE CON LA REPLICACIÓN DE OTROS VIRUS DE ARN, INCLUIDOS VSV E IAV	41
MARIZOMIB, PERO NO RADICOL, INHIBE VIRUS DE ADN TALES COMO LOS VIRUS VACCINIA Y EL CITOMEGALOVIRUS HUMANO	43
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	52
RECOMENDACIONE	53
REFERENCIAS	55
ANEXO	68
ANEXO 1	68
ANEXO 2	68
ANEXO 3	69
ANEXO 4	69
ANEXO 5	70

RESUMEN

El virus Mayaro (MAYV) es un alfavirus desatendido y emergente de la familia *Togaviridae*, se caracteriza por causar brotes recurrentes en las Américas, y la mayoría de los casos ocurren en países de América Central y del Sur. El ecosistema marino permanece en gran parte inexplorado en el contexto de los agentes antiinfecciosos. En este trabajo investigamos dos moléculas de origen marino: Radicicol y Marizomib. El Radicicol es un antibiótico antifúngico que sirve como potente inhibidor de la proteína Src tirosina quinasa y proteína de choque térmico 90. Por otro lado, Marizomib es un inhibidor del proteasoma de segunda generación derivado de una bacteria marina. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue investigar la potencial actividad antiviral de estos dos compuestos frente al MAYV. Tanto el Radicicol como el Marizomib fueron bien tolerados en las líneas celulares evaluadas. Ambos compuestos protegieron a las células Vero y BHK-21 del efecto citopático inducido por MAYV. El tratamiento con Radicicol o Marizomib resultó en una reducción dosis-dependiente en la producción de progenie viral para MAYV en células Vero y BHK-21, independientemente de la cepa del virus probada. Los niveles de las proteínas E1 y nsP1 de MAYV mostraron una reducción significativa en las células tratadas con estos compuestos. Los resultados sugieren que Radicicol y Marizomib tienen actividad inhibitoria contra el MAYV en modelos de infección celular. Además, estos compuestos presentaron actividad contra otros virus, en el caso del Radicicol presentó actividad contra virus de ARN como el virus de la estomatitis vesicular y el virus de la influenza A, y Marizomib contra virus de ADN como el virus vaccinia y el citomegalovirus humano. Finalmente, nuestros resultados indican que Radicicol y Marizomib presentan una actividad antiviral de amplio espectro contra diferentes virus.

ABSTRACT

The Mayaro virus (MAYV) is an emerging and neglected alphavirus belonging to the *Togaviridae* family. It is characterized by recurrent outbreaks in the Americas, particularly in Central and South America. The marine ecosystem remains largely unexplored with respect to anti-infective agents. In this study, we examine two such molecules: Radicicol and Marizomib. Radicicol, an antifungal antibiotic, is a potent inhibitor of Src protein tyrosine kinase and heat shock protein 90 (HSP90). Marizomib, on the other hand, is a second-generation proteasome inhibitor derived from a marine bacterium. This study investigated the potential of these two compounds against MAYV. Radicicol and Marizomib demonstrated acceptable tolerability in the evaluated cell lines. Both compounds were found to protect Vero and BHK-21 cells against the cytopathic effect induced by MAYV. Treatment with Radicicol and Marizomib resulted in a dose-dependent reduction in MAYV viral progeny production in both cell lines, regardless of the virus strain tested. Western blot analysis revealed a significant reduction in the levels of the MAYV E1 and nsP1 proteins. Thus far, all data indicate that Radicicol and Marizomib demonstrate inhibitory activity against MAYV in cellular infection models. Additionally, these compounds exhibited activity against other viruses, including the vesicular stomatitis virus and influenza A virus, vaccinia virus, and human cytomegalovirus. Overall, our results suggest that Radicicol and Marizomib exhibit broad-spectrum antiviral activity against various viruses.

INTRODUCCIÓN

Los arbovirus son virus transmitidos por vectores artrópodos hematófagos a huéspedes vertebrados durante la alimentación sanguínea, replicándose en el artrópodo que funciona como vector antes de la transmisión. Estos virus cuentan con una amplia distribución geográfica que predomina en países de áreas tropicales y subtropicales [1,2]. Actualmente, existen más de 100 especies de arbovirus con capacidad de infectar y causar enfermedades en humanos, los cuales se encuentran clasificados en cinco familias: *Peribunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* y *Togaviridae* [1]. El virus Mayaro (MAYV) pertenece al género *Alfavirus* que se encuentra dentro de la familia *Togaviridae*, y es parte del Complejo Semliki Forest, que incluye a otros virus como Una, Chikungunya, Getah y Ross River. MAYV fue aislado por primera vez en Trinidad y Tobago en 1954 en sueros de trabajadores forestales [3,4]. El genoma de MAYV está conformado de ARN monocatenario, con una cápside icosaédrica de aproximadamente 70 nm y una estructura genómica que presenta dos marcos de lectura abiertos, uno que codifica para proteínas estructurales y el otro codifica las proteínas no estructurales. Los estudios filogenéticos previos indican que hay tres genotipos: D (ampliamente disperso), L (limitado) y N (nuevo) con distintas distribuciones geográficas en las Américas [1,4,5].

MAYV es el agente etiológico de la fiebre de Mayaro (MAYF) que incluye síntomas como fiebre, mialgia, artralgia, erupción cutánea, escalofríos, dolor de cabeza, dolor ocular, diarrea y vómitos. Estos síntomas pueden permanecer durante 3 a 4 días, y en casos más severos pueden ocurrir complicaciones graves como miocarditis, manifestaciones neurológicas y hemorragias, producto de la infección con el virus [2,6,7].

MAYV es un arbovirus endémico y emergente del Nuevo Mundo con una circulación cada vez mayor en toda la región de las Américas [8,9]. Hay reportes que indican que MAYV se encuentra circulando en países de América Central y América del Sur, que incluyen a Panamá, Colombia, Perú, Venezuela, Haití, Guyana Francesa,

Bolivia, Ecuador y Brasil, de estas áreas mencionadas, la región amazónica de Brasil presenta el mayor número de casos esporádicos y epidemias registradas, seguida de regiones de Perú y Venezuela [10,11]. MAYV destaca por presentar un ciclo enzoótico en primates no humanos, roedores, marsupiales y aves, a través de la picadura de mosquitos del género *Haemagogus spp.*, considerado su vector primario; en el caso de las infecciones que ocurren en humanos por MAYV, se cree que se debe principalmente por la cercanía de las personas a zonas boscosas y hábitat forestales. Es importante mencionar que, aunque el MAYV se transmite principalmente en el ciclo selvático, hay evidencias recientes que sugieren que vectores urbanos tales como el *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, pueden también contribuir con la diseminación del virus, aumentando así el riesgo de futuros brotes [10,12]. A pesar de los frecuentes brotes de MAYV en Latinoamérica y su potencial riesgo para la salud pública de la región, no se dispone de medicamentos, ni antivirales específicos aprobados contra MAYV; al igual que tampoco se cuenta con vacunas que estén autorizadas para prevenir la infección, por lo que existe la necesidad urgente de explorar e identificar nuevos compuestos con actividad antiviral para este patógeno [4,13,14].

Al igual que MAYV, actualmente existen otros arbovirus que no cuentan con antivirales ni medicamentos aprobados para combatir su infección. Este es el caso del virus de la estomatitis vesicular (VSV), el cual es un virus de ARN envuelto, no segmentado y de sentido negativo que pertenece a la familia *Rhabdoviridae* [15]. Este virus se aisló por primera vez en 1925 y tiene un amplio espectro de hospedadores que incluye caballos, ganado vacuno, cerdos, roedores y seres humanos. Los caballos, el ganado vacuno y los cerdos infectados pueden desarrollar lesiones epiteliales vesiculares orales, mientras tanto el contacto humano con el VSV es poco común, por lo que los humanos carecen de inmunidad preexistente al virus, representando una vulnerabilidad a la infección [15,16].

Otro virus que sigue representando una grave amenaza para la salud pública es el virus de la Influenza A (IAV), un patógeno respiratorio que causa continuamente

epidemias estacionales y que tiene como resultado una alta morbilidad y mortalidad en todo el mundo, con cientos de miles de muertes al año [17,18]. El IAV persiste dentro de la población humana al desarrollar continuamente resistencia a la inmunidad de grupo. Esta no es una característica general de todos los virus: muchos virus con tasas de mutación similares a las de los IAV (p. ej., el virus del sarampión) no desarrollan efectivamente resistencia inmunitaria en humanos y se controlan eficazmente mediante la vacunación. Es por ello, que existe la necesidad de explorar nuevos tratamientos contra esta infección [19,20]. Por otro lado, encontramos virus de ADN como el virus vaccinia (VACV), el cual se ha utilizado experimentalmente como vector para administrar otros antígenos, así como para la terapia oncolítica [21]. Sin embargo, el virus vaccinia puede causar una enfermedad grave en pacientes inmunodeprimidos e incluso en personas con eccema, una afección cutánea común [22,23]. Si bien la inmunoglobulina de vaccinia, el cidofovir y algunos compuestos experimentales tienen actividad contra los poxvirus, el desarrollo o la identificación de nuevos fármacos seguros que los inhiban podría tener aplicaciones clínicas y facilitar el desarrollo y la prueba de nuevas aplicaciones contra el virus vaccinia [23]. Otro virus de ADN de relevancia médica es el Citomegalovirus humano (HCMV), un patógeno que infecta a la mayoría de la población mundial en la edad adulta temprana. En individuos con sistemas inmunitarios inmaduros o debilitados, el HCMV es un patógeno significativo que causa gran morbilidad y mortalidad [24]. Hasta la fecha no existe una vacuna eficaz contra el HCMV, y existen fármacos que inhiben la replicación viral, pero son ineficaces debido a su alta toxicidad, baja biodisponibilidad y el desarrollo de cepas de virus resistentes a los fármacos. Además, el establecimiento de una infección latente de por vida para la cual no existe terapia significa, por lo que la curación de un paciente infectado por HCMV es actualmente inalcanzable [24,25].

Las investigaciones previas indican que los compuestos de origen natural tienen efecto contra diferentes arbovirus y virus de otras familias, actuando como antivirales, ya sean específicos o de amplio espectro. Entre ellos, los compuestos marinos han sido

poco estudiados como agentes antivirales y pueden representar una fuente de moléculas con actividad contra distintos virus.

JUSTIFICACIÓN

Los antivirales desempeñan un papel importante en el manejo y control de las infecciones virales, sin embargo, en el caso de MAYV no existen terapias antivirales, ni vacunas aprobadas para uso humano que se puedan emplear para combatir la enfermedad [2,26]. Debido a la extensa distribución de MAYV en las Américas, la MAYF puede convertirse en el futuro en un grave problema de salud pública, tal como ha ocurrido con la evolución epidemiológica de otros arbovirus. Por lo tanto, la búsqueda de posibles tratamientos, incluidas moléculas con actividades antivirales, sigue siendo crucial [2,27]

El medio marino representa una fuente favorable para la identificación de posibles agentes terapéuticos antivirales, debido a que es un ambiente rico en compuestos naturales con diferentes propiedades bioactivas [28]. Se ha demostrado que los organismos marinos producen una gran variedad de compuestos, derivados del metabolismo primario o secundario, con aplicaciones terapéuticas prometedoras, mostrando actividad antiviral notable, de los cuales algunos han avanzado con éxito hasta las últimas etapas de ensayos clínicos [29,30]. El estudio de compuestos marinos como potenciales moléculas antivirales contra arbovirus y otros virus de importancia sanitaria, son sumamente escasos, por lo tanto, existe la necesidad de explorar estos recursos como posibles nuevas vías de terapias contra estos agentes infecciosos.

DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

Las enfermedades arbovirales comparten muchas características comunes, lo que dificulta su diferenciación. Sin embargo, debido a cambios en los factores antropogénicos y mutaciones virales, los arbovirus tienen el potencial de emerger o reemerger en toda la región de las Américas [6]. Entre los arbovirus desatendidos, encontramos al MAYV, el cual es endémico en algunas regiones de América Central, el

Caribe y América del Sur [1]. Estudios epidemiológicos demuestran un número creciente de casos confirmados de MAYV en regiones endémicas y no endémicas en el continente americano, y la ocurrencia de casos humanos importados a otros continentes como Europa, por turistas que regresaban de áreas endémicas de América del Sur y Central. Además, se ha demostrado la circulación y detección de infecciones esporádicas en humanos en entornos urbanos, lo que evidencia el riesgo potencial de epidemias [1,6].

Los antivirales desempeñan un papel importante en el manejo y control de las infecciones virales, sin embargo, en el caso de MAYV no existen vacunas, ni terapias antivirales específicas aprobadas para uso humano que se puedan emplear para combatir la enfermedad [2,26]. Debido a la extensa distribución de MAYV en las Américas, la fiebre de Mayaro (MAYF) puede convertirse en el futuro en un grave problema de salud pública, incluyendo Panamá, tal como ha ocurrido con la evolución epidemiológica de otros arbovirus, por lo tanto, la búsqueda de posibles tratamientos, incluidas moléculas con actividades antivirales, sigue siendo crucial [2,27].

Los compuestos marinos representan un recurso natural valioso, con múltiples usos potenciales, entre ellos terapias contra enfermedades virales en humanos y animales, aunado a ello, el creciente interés en los compuestos antivirales de origen marino, junto con el desarrollo de nuevas tecnologías de cultivos y extracción marina, acelerará significativamente la exploración actual del medio marino en busca de compuestos con importantes aplicaciones farmacológicas, lo que seguirá siendo una estrategia prometedora y una nueva tendencia para la medicina moderna [31].

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

MARCO TEÓRICO

Virus Mayaro

El MAYV fue aislado por primera vez en el año 1954 en la región del condado de Mayaro en Trinidad y Tobago; su aislamiento se obtuvo a partir de muestras de trabajadores forestales que presentaban una enfermedad febril [32]. Este virus se considera endémico de áreas selváticas de Centroamérica, Suramérica y el Caribe [33], y produce una enfermedad febril con múltiples síntomas, denominados como la fiebre de Mayaro (MAYF) [11,33]

El MAYV es un virus de ARN monocatenario envuelto con sentido positivo (Figura 1), miembro de la familia *Togaviridae* dentro del género *Alfavirus* [33]. Este virus es transmitido por mosquitos infectados, al igual que los virus de Chikungunya (CHIKV), Dengue (DENV) y Zika (ZIKV), estos virus utilizan vectores artrópodos para propagarse ocasionando una enfermedad febril, y se les denominan como arbovirus [27] El principal vector de MAYV son los mosquitos del género *Haemagogus spp.* [11]. No obstante, en estudios anteriores se ha observado que mosquitos urbanos, como es el caso del género *Aedes spp.* tienen la capacidad para transmitir este virus [34].

La infección inicia cuando el individuo es picado por mosquitos, principalmente en áreas selváticas; posterior a ello, se consigue una diseminación rápida del virus por el torrente sanguíneo, donde llega inicialmente a órganos como: el bazo y el hígado, posteriormente llega a las articulaciones, músculos y huesos, y es ahí donde se obtienen la respuesta característica que corresponde a la artralgia ocasionada por la infección [4,35].

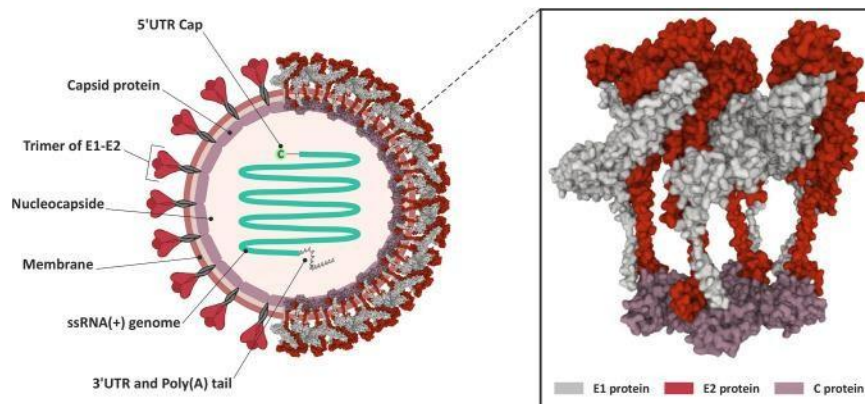


Figura 1 Esquema de la partícula viral de MAYV. Conformación del virión, proteínas E1, E2 y cápside, conformación de ARN de sencillo con sentido positivo. Tomado de Paschoalino M. et al (2023)[12]

Estructura Genómica

La estructura genómica del MAYV consiste en una sola cadena de ARN de sentido positivo con una longitud de 11,5 kb, que consta de dos marcos de lectura. El primer ORF hacia el extremo 5' codifica para una poliproteína que a través de la acción de las proteasas viral y celulares, da lugar a las proteínas no estructurales (nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4), este ORF se traduce a partir del ARN genómico directamente, mientras que el segundo ORF que se ubica hacia el extremo 3', y se traduce a partir del ARNm subgenómico 26S, para dar origen a las proteínas estructurales del virus: Cápside (C), las proteínas de envoltura E1, E2, E3, 6K y transframe (TF) [27,36]. Las partículas virales de MAYV presentan una forma icosaédrica que comprende una nucleocápside hermética a partir de la membrana celular del huésped, en donde sobresalen las proteínas E1 y E2 de la envoltura [27,32].

Ciclo de replicación de MAYV

El ciclo de replicación del virus inicia con la fusión de la envoltura vírica en la membrana de la célula por medio de un receptor específico. Recientemente, se ha descrito que puede ser el receptor Mxra8 para los Alfavirus artrítogénicos [37]. Posterior a la adhesión entre el receptor celular y la proteína de envoltura del virión (E2), ocurre una acidificación de la vesícula, lo que tiene como consecuencias que las proteínas E1 y E2 se disocien, y la E1 se ancle a la membrana fuertemente. Después, se da la entrada

norte y centro de Brasil y Haití y, por último, el genotipo N es el más reciente, y el que se denomina genotipo nuevo y se ubica en una zona de Perú a partir del año 2010 [1,4,5,39].

Por otro lado, se ha identificado que el MAYV es un arbovirus artrítogénico, que se encuentra dentro del complejo serológico de Semliki Forest que se compone de 8 virus que comparten similitudes de sintomatología como: erupciones cutáneas y artritis severas. Además, este grupo comparte sitios antigénicos similares, por lo que, se postula que puede haber reacción cruzadas entre ellos, lo que dificulta un diagnóstico correcto [40]. En este grupo se encuentran virus como: Ross River (RRV), O'nyong-nyong (ONNV) y Una (UNAV) [1,3]. Utilizando el gen E1, que es un gen estructural, se ha comprobado que MAYV está emparentado con el UNAV, siendo su pariente más cercano y uno de los únicos virus del nuevo mundo que tiene su origen en el viejo continente [41,42].

Aspectos ecológicos

El MAYV posee una fase de transmisión de origen enzoótica, la caracterización de este ciclo no se entiende con claridad, sin embargo, se ha podido identificar que el virus se propaga por medio de la picadura de mosquitos infectados del género *Haemagogus spp.*, que habitan dentro del dosel del bosque, en donde se encuentran sus hospederos principales, que corresponden a primates no humanos, entre ellos, los siguientes grupos taxonómicos: *Cebidae*, *Callithricidae*, *Saguinus spp.* y *Alouatta spp.*, en distintos lugares de América Latina y el Caribe (Figura 3). De igual forma, este virus puede utilizar aves y roedores como hospederos [43–45]. Por ende, la alta prevalencia de casos de fiebre de Mayaro en humanos se estima que es producto de la entrada de humanos a las áreas selváticas y su susceptibilidad a la picadura de los mosquitos [46]. La temporada de infección tiene un inicio con la llegada de la temporada lluviosa y termina con la finalización de esta, esto se correlaciona, ya que en esta temporada los mosquitos incrementan sus poblaciones [43]. Este incremento de la población de vectores aumenta el potencial de causar brotes a gran escala, este fenómeno fue explicado por *da Rosa* y colaboradores durante un brote de MAYV en Brasil, donde se presentaron un aproximado de 800 casos de MAYF y este brote coincide con el inicio de la temporada lluviosa [43–45].

Por otro lado, Long y Vasconcellos han demostrado que mosquitos urbanos como es el caso de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en condiciones *in vitro*, son capaces de transmitir MAYV, facilitando su propagación. Debido a este factor tan importante, MAYV se le considera un virus con una alta capacidad de propagación, similar a otros virus como CHIKV y ZIKV. Para MAYV solo se ha descrito la transmisión a través de la picadura de vectores (Figura 3) [47,48].

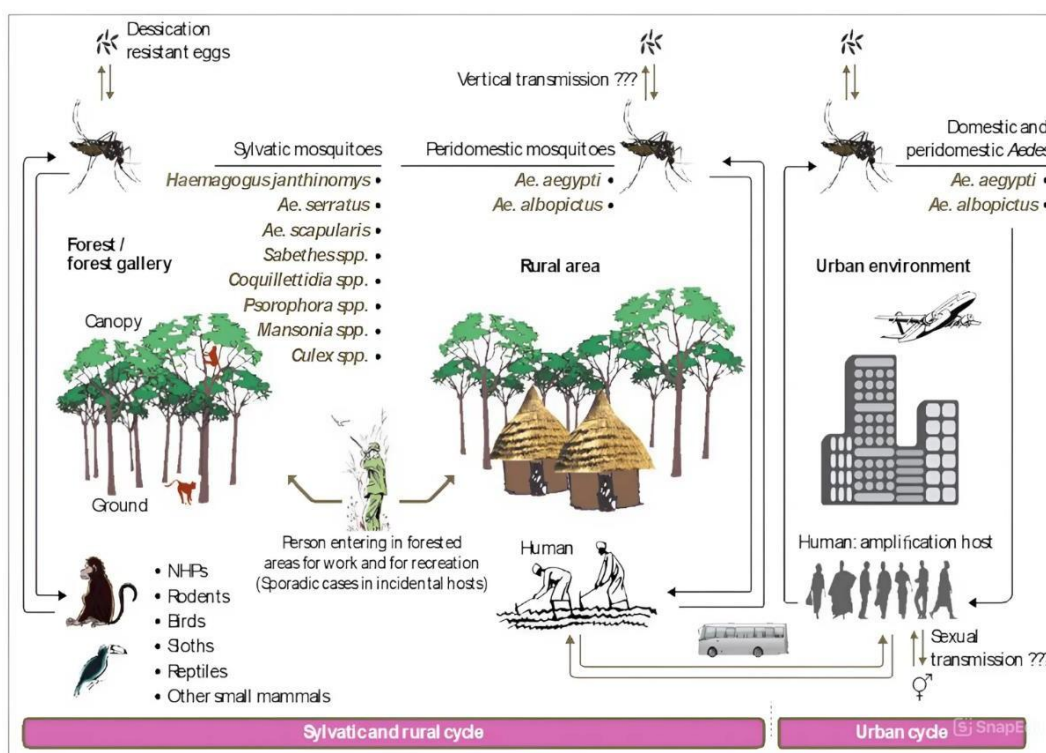


Figura 3 **Ciclo de Transmisión de MAYV**, este ciclo corresponde a zonas endémicas de centro y sur de América. Tomado de Diagne et al. (2020) [4].

Fiebre de Mayaro

La fiebre de Mayaro o “Fiebre selvática” es producida por la infección del MAYV, las manifestaciones clínicas del virus aparecen de 7 a 12 días luego de la picadura del mosquito, la viremia dura de 3 a 4 días, que pueden presentar algunos de los siguientes signos: mialgia, fiebre, problemas gastrointestinales, erupción cutánea y la artralgia que es el síntoma característico de MAYF. Cabe resaltar que la MAYF puede presentar otros

signos, ya que es una enfermedad con síntomas inespecíficos, lo que ha dificultado su caracterización [34,45,49].

La sintomatología en los pacientes puede variar, un ejemplo de esto es que solo dos tercios de los pacientes desarrollan erupciones cutáneas, otro caso de la variedad de síntomas es que pueden presentar dolor ocular, linfadenopatía y leucopenia, que es común en los pacientes. A la vez MAYF se le considera una enfermedad autolimitada, pero la artralgia puede durar por semanas e incluso meses después de la infección [27,49,50] (Figura 4). La MAYF puede ser más severa en ciertos individuos infectados, en estos casos hay complicaciones neurológicas, miocarditis y la muerte [27,49].

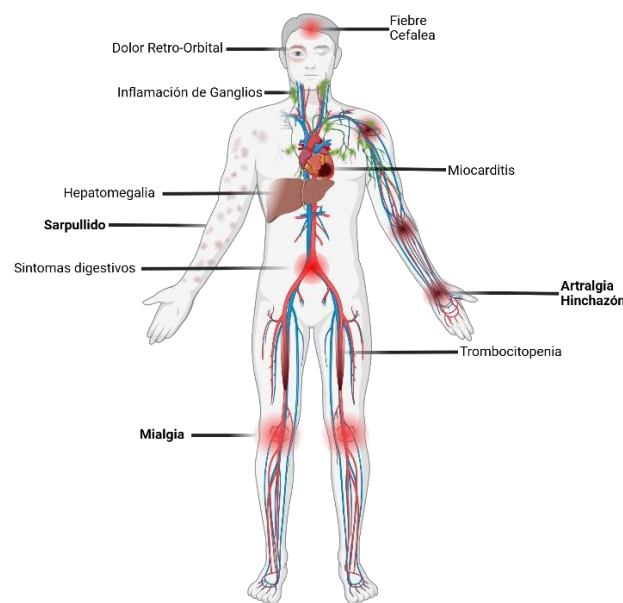


Figura 4 Sintomatología de la Fiebre Mayaro. Algunos de estos síntomas son característicos de MAYF. Tomado y modificado de Wei, LLL. et al (2024) [49].

Patogénesis de MAYV

El virus Mayaro al igual que varios arbovirus tiene la capacidad de infectar diferentes huéspedes. La capacidad infectiva del virus inicia con la entrada de los viriones a las células de los mosquitos que son el principal vector de este virus [51]. Luego de que el mosquito realice la picadura las partículas víricas se transportan a través de los

vasos linfáticos y microvasculaturas, este transporte por el cuerpo del huésped se da gracia a la adhesión a endosomas o a monocitos, lo que ayuda a que lleguen a órganos principales como lo son bazo e hígado, en estos órganos es donde se da la mayor replicación [7].

Posterior a que se dé la diseminación del virus dentro del huésped, los focos de replicación del virus se centran en regiones como músculos, tejido óseo y articulaciones [52], siendo esta última región, donde se desarrolla la fase más severa de la enfermedad. La infección por MAYV genera un aumento en la respuesta inflamatoria del cuerpo del huésped, trabajos anteriores han descrito un aumento de marcadores inflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa, de igual forma, se genera aumento de estrés oxidativo en las células [53–55].

En pacientes infectados con MAYV se ha descrito que este virus presenta un aumento de la producción de citocinas proinflamatorias y mediadores, utilizando un modelo murino en condiciones de laboratorio, lo que se correlaciona con la respuesta inmune innata del huésped infectado [56,57].

Virus de la Estomatitis Vesicular

La estomatitis vesicular (VS) es una enfermedad viral de importancia veterinaria, enzoótica en las regiones tropicales y subtropicales del continente americano, causada por el virus de la estomatitis vesicular (VSV). Es un virus ARN monocatenario de sentido negativo que codifica cinco proteínas principales: N (nucleocápside o ribonucleoproteína), P (fosfoproteína), M (proteína de la matriz), G (glicoproteína) y L (proteína grande o polimerasa), y se transmite por insectos hematófagos como mosquitos picadores, moscas negras y flebótomos [58,59]. VSV afecta principalmente a los caballos, pero otros animales como vacas, cerdos, ovejas, cabras, llamas y alpacas también pueden infectarse, dentro de los cuales los síntomas clínicos de la enfermedad de VSV incluyen lesiones vesiculares en la boca, mucosa naso bucal, pezones o bandas coronarias, pérdida de apetito, pérdida de peso y cojera. Salvo por su aparición en

caballos, es clínicamente indistinguible de la fiebre aftosa y a diferencia de esta, es muy infecciosa para el ser humano y puede causar una enfermedad temporalmente debilitante [59,60].

La epidemiología del VSV presenta una amplia diversidad de variables a considerar, incluyendo el amplio rango potencial de hospedadores vertebrados, las múltiples vías de transmisión, la variación en el pronóstico clínico en el hospedador mamífero según el sitio de infección y la diversidad de especies de vectores sospechosos y potenciales [59].

Virus de la Influenza A

El virus de la influenza A (IAV) es un virus de ARN segmentado de sentido negativo monocatenario, con un genoma que consta de ocho segmentos genéticos, que puede codificar hasta 16 proteínas. El virus de la influenza A se divide en subtipos según las propiedades genéticas y antigénicas de sus glicoproteínas de envoltura, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Hasta la fecha, se han identificado 17 subtipos de HA y 10 de NA [61].

La infección con el virus de influenza A resulta en inmunidad protectora contra las glicoproteínas de superficie viral HA y NA. Sin embargo, la acumulación de mutaciones puntuales en HA y en menor medida NA, permite que el virus escape a la inmunidad del huésped. Este fenómeno, conocido como deriva antigénica, explica la aparición de epidemias de influenza estacional y como resultado de esta deriva antigénica, la composición de la vacuna debe actualizarse casi anualmente, representando así, este virus, una amenaza continua e importante para la salud pública a nivel mundial. La influenza endémica o "estacional" resulta entre 3 a 5 millones de infecciones graves y hasta 650,000 muertes cada año alrededor del mundo [61,62]

Virus Vaccinia

El virus vaccinia (VACV) es un poxvirus que se caracteriza por un gran genoma de ADN bicatenario (192 kb), que codifica más de 200 proteínas que cumplen funciones en la entrada del virus, la transcripción viral, la síntesis de ADN y ARN, el ensamblaje del virión y la supresión inmune del huésped. Este virus se replica exclusivamente en el citoplasma de las células del huésped y por lo tanto, está sujeto a una batería de defensas inmunitarias autónomas de las células. Para superar esto, el VACV dedica casi la mitad de sus proteínas para evadir las defensas y subyugar los sistemas de las células [63–65]. Las vías de degradación celular no son una excepción. Se ha demostrado que la manipulación del sistema del proteasoma ubiquitina, por ejemplo, es esencial para la pérdida de la envoltura del genoma del VACV y la degradación dirigida de los factores de restricción viral [64,66].

En las infecciones naturales por VACV, la forma clásica de transmisión es a través del contacto directo entre trabajadores rurales (ordeñadores y ganaderos) y bovinos infectados, lo que convierte al virus en una zoonosis ocupacional. Las personas infectadas comúnmente desarrollan lesiones vesiculares en sus manos y antebrazos y, como el VACV tiene tropismo por el tejido epitelial, la infección puede diseminarse fácilmente por todo el cuerpo por autoinoculación. Además, no se debe descuidar la posibilidad de una propagación nosocomial de este virus, requiriendo una mayor atención en las incidencias de infección por VACV, sobre todo por las posibles complicaciones fatales que puede ocurrir en pacientes inmunodeprimidos [67]. Clínicamente, la infección humana por VACV puede confundirse con otras infecciones vesiculopustulares similares como parapoxvirus, leishmaniasis, micosis, estafilococos o *Bacillus anthracis*, lo que dificulta un diagnóstico preciso [67,68].

Citomegalovirus Humano

El citomegalovirus humano (HCMV; también conocido como herpesvirus humano 5) es el miembro prototipo de *Betaherpesviridae*. Como todos los herpesvirus, el HCMV es un virus de ADN bicatenario lineal que establece una infección latente y persistente

durante la vida del individuo. La infección con HCMV es común en todo el mundo, aunque generalmente asintomático, es una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos, incluyendo receptores de trasplantes y pacientes con SIDA. Además, el HCMV infecta al 1% de todos los recién nacidos y es una de las principales causas de daño cerebral y pérdida de audición [69,70].

Con aproximadamente 236 kb, el HCMV tiene el genoma más grande y el nivel más alto de diversidad genética de todos los herpesvirus humanos conocidos, por tanto, se sabe que el virus experimenta recombinación fácilmente y la coinfección se observa con frecuencia, especialmente en individuos con sistemas inmunitarios debilitados [71].

En la actualidad, algunos fármacos antivirales han sido aprobados para el tratamiento clínico de las infecciones por HCMV, de los cuales se incluyen los inhibidores de la ADN polimerasa viral, como el análogo de nucleósido ganciclovir, el análogo de nucleótido cidofovir y el análogo del pirofosfato foscarnet [64]. Todos estos fármacos tienen baja biodisponibilidad oral y toxicidades relacionadas con la dosis, por lo tanto, es necesario desarrollar nuevos agentes antivirales con eficacia mejorada y menos efectos secundarios [72].

Dianas Terapéuticas

Proteosoma

El proteosoma es el principal complejo proteolítico de las células, su función principal es degradar al menos el 80% de las proteínas, ya sea en el citosol o el núcleo. Además, cumple otras funciones dentro de la célula como lo son: regulación del ciclo celular, expresión, respuesta inmune, carcinogénesis, reparación del ADN, entre otras [73,74]. Este conjunto proteico está formado por una partícula central que se denomina 20S y de una a dos subunidades más pequeñas que son reguladas, estas son las 19S, estas pequeñas subunidades se encargan de hidrolizar las proteínas [75]. El núcleo central 20S es el sitio donde se da la actividad catalítica dentro de los sitios específicos y donde ocurre el desensamble de las proteínas, por otro lado, en las subunidades

reguladoras 19S se detectan las proteínas que han sido poliubiquitinadas de manera correcta [76,77]

La principal forma de degradación de proteínas ocurre por medio de modificaciones post traduccionales como lo son la unión de ubiquitina (Ub), lo que ayuda a que se reconozcan las proteínas a degradar por los anillos de la subunidad 19S, la agregación de Ub es un reto para estas subunidades, ya que la cantidad de los residuos dentro de la cadena proteica puede variar, sin embargo, todas las proteínas tienen el mismo factor común como vehículo de reconocimiento, que son los residuos de lisina 48 (K48) [78–80].

Sistema Ubiquitina Proteosoma

El sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) es un sistema importante dentro de la célula, como se ha mencionada anteriormente se encarga de la regulación y homeostasis de las proteínas de las células. Este sistema cuenta con tres componentes, donde son holoenzimas, diversas ubiquitinas ligasas y múltiples enzimas desubiquitinantes [81,82]. Las proteínas son recocidas por medio de los residuos K48 que se encuentran dentro de la Ub que funcionan como señal de reconocimiento. La agregación de la Ub a las proteínas se debe a la actividad enzimática de la ubiquitina, esta primera actividad enzimática se da por la enzima E1 que forma un fuerte enlace tiol-éster, posteriormente, se da la conjugación por acción de la ubiquitina E2, y como último paso, la ubiquitina E3 que tiene dominios ligasas une la Ub a los residuos de lisina que dependerá del sustrato [83,84].

El UPS desempeña un papel fundamental durante las infecciones virales, y funciona de distintos modos, en el primer caso las ligasas de Ubiquitina E3 reconocen las proteínas virales y posteriormente se ubiquitinan, y de esta forma llegan a tener un efecto positivo en la replicación viral [85,86]. Una segunda forma es un poco más tradicional, en este caso las proteínas virales se ubiquitinan para inducir su degradación y bloquear el ciclo de replicación, lo que corresponde a un mecanismo de defensa de la célula [87]. Un tercer caso consiste en el secuestro de las enzimas E3 y así evitar

posibles acciones antivirales de algunas proteínas de las células [87,88]. Un cuarto caso es que algunos virus codifican sus propias enzimas ligasas E3 para así, ubiquitinar diferentes proteínas de la célula huésped y evitar el reconocimiento de las moléculas antivirales [89]. El último mecanismo utilizado por los virus son la desubiquitinación por medio de la actividad proteolítica de sus proteínas virales, en consecuencia, tendremos un incremento de la replicación y la evasión de la respuesta inmune [81,90].

Proteína de Choque Térmico

Las proteínas de choque térmico (HSP) son chaperonas moleculares, que tienen distintas funciones dentro de la célula. Las HSP tienen diferentes proteínas clientes, lo que hace que cumplan distintas funciones biológicas. Este conjunto proteico se conforma de homodímeros, donde cada monómero contiene tres dominios, donde el N terminal coordina la hidrólisis del ATP, el dominio C terminal inicia la dimerización de la proteína, y el dominio medio que es donde se unen los sustratos de la proteína [91].

Proteína de Choque Térmico 90

La proteína de choque térmico 90 (HSP90) consiste en un grupo de proteínas que son altamente conservadas dentro de la célula, estas proteínas presentan un peso aproximado de 90 kDa y debido a su peso molecular se le da el nombre de HSP90. Debido a su función como chaperona esta proteína se encarga del plegamiento de proteínas o el arreglo de proteínas mal plegadas [92].

La proteína de choque térmico 90 (HSP90) es una chaperona que depende de ATP, esta proteína regula la maduración, activación y estabilidad de sus proteínas clientes, muchas de las proteínas clientes de la HSP90 están involucradas en la traducción de señales y vías claves en la homeostasis, muchas de las cinasas de las células dependen de las HSP para cumplir sus funciones [91,93].

Esta proteína presenta dos isoformas que se denominan HSP90 alfa y HSP90 Beta, estas proteínas se encuentran en el citoplasma de la célula. Dicho conjunto de

proteínas tiene su rol principal en la proteostasis celular, diferenciación y funciones moleculares [92,94]. Sin embargo, estas proteínas presentan dos isoformas adicionales la GRP94 que se encuentra en el retículo endoplasmático y la TRAP1 que se ubica en la mitocondria [94].

Las dos formas principales de esta proteína se encuentran en el citoplasma, donde la HSP90 α se expresa de forma inducible y la isoforma HSP90 β se expresa de manera constitutiva [95,96]. Estas proteínas poseen una regulación estable, ya que no cuentan con una expresión descontrolada, su síntesis solo se da en condiciones de estrés celular, a estos factores se les conoce como factores de choque térmico [97].

Las isoformas alfa y beta de HSP90 presentan un mayor número de clientes dentro de la célula, estas proteínas logran interaccionar con proteínas de gran importancia dentro de la célula como lo son: Akt, CDK, PKC, MAP cinasas, por otro lado, también logran interaccionar con factores de transcripción como lo son: BCL-6, CAR, p53 y Oct4 [96,97].

Las chaperonas de la familia HSP90 han recibido recientemente una atención significativa debido a su implicación en los ciclos de vida virales y las respuestas al estrés del huésped, puesto que las proteínas virales, al igual que las proteínas celulares, dependen de la función de la chaperona para el plegamiento y el ensamblaje. Existe un creciente cuerpo de evidencia que sugiere que la HSP90 es un factor celular crucial asociado con la propagación viral, la patogénesis o la respuesta inmune del huésped, dado que las chaperonas regulan también muchas funciones celulares, como las redes de señalización, la progresión del ciclo celular y la apoptosis es probable que los virus manipulen las chaperonas para que las células sean propicias para la replicación viral. De hecho, la dependencia de los virus por la HSP90 parece ser casi universal. Se ha demostrado que la HSP90 desempeña un papel crucial en la replicación de una amplia gama de virus diferentes, incluidos virus de ADN, los virus de ARN de genomas de sentido positivo y negativo y los virus de ARN bicatenario, como lo son el virus de la hepatitis B, el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, el virus del herpes simple 1,

el citomegalovirus humano, el virus de la estomatitis vesicular, el virus de las paperas, el virus de la polio, el virus de la rubéola, el virus de la hepatitis C, el virus del Ébola y el virus de la gripe [96,98,99].

Compuesto Naturales

Los compuestos naturales presentes en las frutas, plantas, microorganismos u organismos marinos son una fuente de moléculas con diversas actividades farmacológicas, de las cuales se han documentado varios compuestos que poseen actividad contra distintos arbovirus. Además, se ha demostrado que algunos de estos compuestos naturales protegen contra virus de familias específicas y mientras que otros, muestran una actividad de amplio espectro [8,100].

El medio marino es un depósito excepcional de nuevos productos naturales bioactivos, con características estructurales y químicas que generalmente no se encuentran en los productos naturales terrestres. Los organismos marinos también constituyen una rica fuente de nutraceuticos y son candidatos potenciales para el tratamiento de diversas enfermedades humanas [101]. Así, se ha documentado una gran cantidad de moléculas activas, con alrededor de 35,000 [102] productos naturales de organismos marinos descubiertos, de los cuales un 50 % de ellos mantienen diferentes actividades biológicas, como antiinflamatoria, antitumorales, antimicrobianos, antivirales, antipalúdica y también, como antioxidantes [103–105]. De acuerdo con la base de datos MarinLit, anualmente se reportan más de 1,200 nuevas moléculas marinas que provienen de distintos organismos tales como, algas, corales, esponjas y microorganismos, de las cuales muchas de ellas han entrado en ensayos clínicos [105,106].

Radical

Radical es un antibiótico antifúngico macrocíclico que se aisló originalmente del hongo marino *Monosporium bonorden* (Figura 5) y es un inhibidor de la HSP90 [107]. Un estudio reciente, demostró que el Radical presenta actividad antiviral contra el virus

Chikungunya, (CHIKV), un arbovirus que pertenece a los alfavirus, grupo donde se encuentra el MAYV [96,98,99].

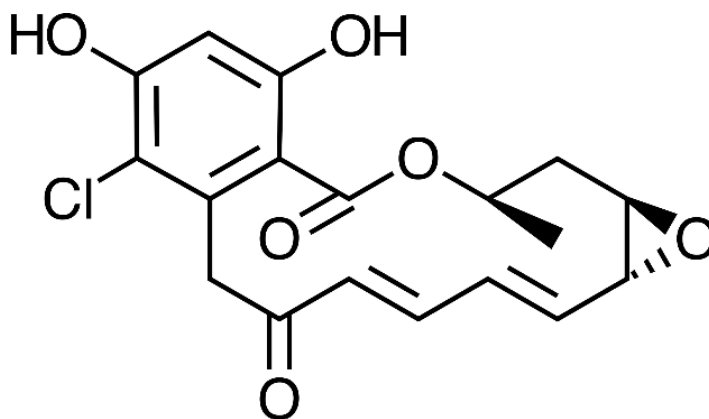


Figura 5 **Estructura química del Radicicol**, inhibidor de la Hsp90.

Marizomib

Marizomib (Figura 6) es un producto natural β -lactona- γ -lactámico de origen marino, derivado del actinomiceto marino *Salinispora tropica* y clasificado como la nueva generación de inhibidores del proteasoma [108]. Estudios han demostrado que Marizomib puede inhibir las actividades de $\beta 5$, $\beta 1$ y $\beta 2$ del proteasoma 20S, el cual es el componente más importante de la vía de degradación de proteínas dependiente de ubiquitina y que junto a una o dos subunidades reguladoras 19S conforman el complejo multiproteico proteosoma 26S [82,109].

Los virus manipulan esta maquinaria celular para favorecer la propagación viral y evadir la respuesta inmunitaria del huésped. El UPS es un arma de doble filo en la patogénesis viral; las células huésped lo emplean para degradar proteínas virales y limitar la infección viral, pero los virus pueden manipular la maquinaria del UPS para degradar factores de restricción celulares, facilitando así la propagación viral [79,110,111]. Por ejemplo, la replicación de algunos virus como el astrovirus humano, el virus vaccinia, el tombusvirus, el virus de la hepatitis E, el circovirus porcino tipo 2 y el virus del Ébola están regulados por el UPS, y estudios recientes, revelaron que este

sistema es necesario para la replicación eficiente del virus de la peste porcina africana y el astrovirus humano. Además, la actividad del proteasoma parece ser importante en las primeras etapas de la replicación de MAYV, según un estudio realizado previamente en nuestro laboratorio. Estos hallazgos sugieren que el sistema ubiquitina-proteasoma es una posible diana farmacológica para inhibir estos alfavirus desatendidos [9,66,111].

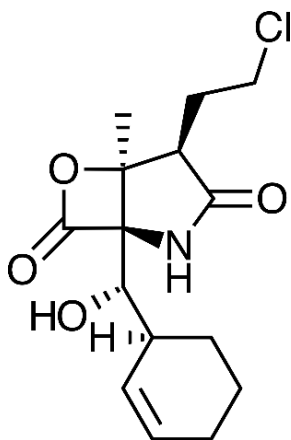


Figura 6 **Estructura Química de Marizomib**, inhibidor del proteosoma.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Analizar la actividad antiviral de los compuestos marinos Radicicol y Marizomib contra el virus Mayaro y otros virus de importancia médica

Objetivos Específicos

1. Analizar la toxicidad de los compuestos marinos Radicicol y Marizomib en distintas líneas celulares.
2. Determinar el efecto protector de los compuestos marinos Radicicol y Marizomib frente al efecto citopático inducido por MAYV en distintas líneas celulares.
3. Evaluar la producción de partículas virales de MAYV en las líneas celulares tratadas o no con los compuestos marinos Radicicol y Marizomib.

4. Estudiar el efecto de los compuestos marinos Radicicol y Marizomib sobre la expresión de las proteínas virales E1 y nsP1 en distintas líneas celulares infectadas con MAYV.
5. Determinar el efecto de amplio espectro los compuestos marinos Radicicol y Marizomib sobre otros virus de importancia médica.

Hipótesis

Los organismos marinos han sido fuente de una gran diversidad de moléculas activas y estructuralmente novedosas. Los organismos marinos viven en un medioambiente muy exigente, competitivo y agresivo; en particular los organismos sésiles, se ven obligados a producir biomoléculas activas, potentes, específicas y en elevadas concentraciones (contrarrestando la dilución debida al ambiente acuoso) para defenderse de sus depredadores [103]. Actualmente, se han descubierto alrededor de 35000 productos naturales a partir de organismos marinos, de los cuales alrededor del 50 % han mostrado diferentes actividades biológicas. Los compuestos aislados de estos organismos marinos incluyen principalmente terpenoides, alcaloides, policetonas, esteroides, péptidos, lactonas, entre otros, los cuales han reportado bioactividades antibacterianas, antifúngicas, antiinflamatorias, antivirales, antiparasitarias, entre otras [103,112].

Debido a la vasta diversidad de organismos marinos existentes y que, en su mayoría, no han sido estudiados en el contexto de su capacidad para inhibir patógenos virales, nosotros proponemos la siguiente hipótesis de investigación:

Los compuestos Radicicol y Marizomib, presentan actividad antiviral contra el virus Mayaro y otros virus.

Para ello evaluaremos *in vitro* estos compuestos contra diversos virus en diferentes líneas celulares.

CAPITULO II

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA

Cultivo de células, tratamiento con los compuestos y propagación viral

Para los ensayos se utilizaron las siguientes líneas celulares líneas celulares que se obtuvieron a través de la *American Type Culture Colletion* (Manassas, VA, EE. UU.): Riñón de mono verde africano (Vero) (CCL-81 Vero-E6 (CRL-1586), Riñón de hámster bebé (BHK-21) (CCL-10), Adenocarcinoma pulmonar (A549) (CRM-CCL-185), Fibroblastos de pulmón inmortalizados IMR90 (CCL-186).

Durante el cultivo de las líneas celulares, se usaron botellas de cultivo para el mantenimiento de estas, utilizando medio de Eagle modificado de Dulbecco para todas las células, excepto la línea celular Vero-E6, que se cultivó en medio esencial mínimo de Eagle. Los medios fueron suplementados con 10 % de suero fetal bovino (FBS) inactivado y filtrado, L-glutamina [2mM], además, una solución de los antibióticos estreptomicina y penicilina al 1 %. Todos estos reactivos se obtuvieron de la casa comercial Gibco (Waltham, MA, EE. UU.). Las líneas celulares se incubaron en una atmosfera de CO₂ al 5 % y una temperatura de 37°C.

En el momento que las células alcanzaron una confluencia aproximada del 90 a 100 % en la botella de cultivo, se realizó el pasaje para preparar los ensayos de la siguiente forma: se lavaron las células utilizando 5 mL de PBS y posteriormente, se agregó 1 mL de tripsina al 0.25 %, para poder desagregarlas de la superficie, luego se cultivaron en placas de diferentes tamaños para realizar los siguientes ensayos: viabilidad, titulación e infección viral.

Preparación de los compuestos

Se emplearon los siguientes compuestos de origen marino: Radicicol y Marizomib, obtenidos de la empresa MedChemExpress (EE.UU.), los compuestos fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EE. UU.) como vehículo. Los compuestos fueron probados a distintas concentraciones de acuerdo con la toxicidad que mostraron.

Propagación de cepas virales

Se procedió a infectar las líneas celulares con las siguientes cepas: MAYV AVR0565, Perú; MAYV D218, Surinam, MAYV BeH256, Brasil; todas las cepas fueron obtenidas del Centro de Referencia Mundial para Virus y Arbovirus Emergentes de la Universidad de Texas (UTMB, Galveston, Texas, EE. UU.). Además, se utilizaron virus recombinantes que expresaban la proteína verde fluorescente (GFP) como el VSV, IAV (PR8, Puerto Rico), HCMV y VACV, estos virus fueron utilizados en el laboratorio de la Dra. Carmen Rivas del Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMUS), Santiago de Compostela, España.

Ensayos de Viabilidad Celular

Para evaluar la toxicidad de los compuestos Radicicol y Marizomib, se colocaron 1×10^4 células por pocillos en platos de 96 pocillos. Las células se trataron con Radicicol de 1 hasta $20 \mu\text{M}$, mientras que con Marizomib, se utilizaron dosis de 10 a 100 nM , ambos compuestos fueron disueltos en medio DMEM sin rojo fenol y las células fueron incubadas durante 24 o 48 horas. Después, analizamos la toxicidad de los compuestos mediante el método de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EE. UU.), agregando un volumen de $30 \mu\text{L}$ del reactivo por pocillo y se incubaron las células durante 3 horas. Tras ese período, se añadieron $50 \mu\text{L}$ de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EE. UU.) para disolver los cristales de formazan. Finalmente, se realizó la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro de microplacas (BioTek, Winooski, VT, EE. UU.) a una longitud de onda de 570 nm. Los datos se expresaron como porcentaje de células viables, asumiendo que las células tratadas con DMSO (control negativo), tenían un 100 % de viabilidad.

Ensayos de Infección Viral

Células Vero, BHK-21 o A549 fueron pre-tratadas durante 2 horas con Radicicol (2 y $5 \mu\text{M}$) o Marizomib (10, 25 y 40 nM). Posteriormente, se preparó el inóculo con las cepas de MAYV AVR0565 (Perú), D218 (Surinam), BeH256 (Brasil) o con los virus de

estomatitis vesicular (VSV-GFP), virus de influenza A (cepa PR8, Puerto Rico y GFP-Flu) (IAV), virus vaccinia (VACV) y citomegalovirus humano (HCMV-GFP). Se colocaron 300µL de cada uno de los virus por pocillos y se incubaron durante una hora a 37 °C. Después, se eliminó el inóculo y las células se trataron con los compuestos a las dosis que se mencionaron con anterioridad y se incubaron durante 24 horas. Los sobrenadantes se colectaron y se almacenaron a - 80 °C hasta su análisis mediante el ensayo de formación de placas o la expresión de GFP se analizó mediante citometría de flujo. Todos los ensayos de infección fueron realizados utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 1 o 10.

Ensayo de Formación de placas

Los títulos virales se cuantificaron a partir de los sobrenadantes obtenidos de células Vero, BHK-21 o A549 infectadas y tratadas como se describió con anterioridad. El ensayo se realizó con un cultivo de células Vero-E6 en platos de 6 pocillos, utilizando 1.5×10^5 células por pocillo. Se realizaron diluciones seriadas de los sobrenadantes desde 10^1 hasta 10^{12} y se inocularon durante una hora en las células, en las condiciones previamente descritas. Pasado el tiempo de absorción del virus, se utilizó una mezcla 1:1 de agar 2 % y MEM 2X, suplementado con FBS al 4 %. Los platos se colocaron durante 3 días en la incubadora a una atmósfera de CO₂ al 5% y una temperatura de 37 °C.

Pasado los 3 días de incubación, se añadió formaldehído al 4 % diluido en PBS para fijar las células, durante 20 minutos. Después, se retiró la mezcla de agar y medio, luego se tiñeron los pocillos con violeta cristal al 2 % en una solución de metanol al 30 %. El conteo de las placas y títulos virales se registraron como unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL). Los títulos virales se calcularon utilizando la siguiente formula:

$$\text{Titulo viral } \left(\frac{\text{UFP}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{No.placas} \times \text{valor de Dilución} \times \text{volumen final de la dilución}}{\text{volumen de la infección}}$$

Análisis de Proteínas

Los extractos de proteínas se obtuvieron a partir de los cultivos celulares infectados y tratados o no con los compuestos. Se utilizó el tampón Laemmli con ditiotritol al 10 % (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) para extraer las proteínas de las células. Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida-SDS al 10 % u otros porcentajes dependiendo del tamaño de la proteína; las muestras se corrieron utilizando un rango de voltaje entre 150 a 180 voltios. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y la misma se bloqueó durante 30 minutos en una solución de leche sin grasa al 5 % disuelta en tampón T-TBS. Luego, las membranas se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios toda la noche a 4° C: proteína estructural del virus (anti-E1) policlonal de conejo (1:1000), la proteína no estructural anti-nsP1 policlonal de conejo (1:500) (ambos anticuerpos diseñados y estandarizados en nuestro grupo de investigación) [9], la nucleoproteína de IAV, anti-NP, dos anticuerpos que reconocen proteínas del VSV, uno reconoce la proteína de matriz anti-M y otro que reconoce la glicoproteína anti-G. Luego, se realizaron tres lavados de 10 minutos con tampón T-TBS y después, las membranas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios anti-conejo de cabra (1:5000) (n.º de cat. 926-80011) o anti-ratón de cabra (1:5000) (n.º de cat. 926-80010). Después, las membranas se lavaron en T-TBS como mencionamos antes. Por último, se colocaron las membranas en el sustrato ECL SignalFire™ (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE. UU.) durante 3 minutos y la señal de quimioluminiscencia se detectó en el escáner C-Digital (LI-COR, Lincoln, NE, EE. UU.). Para el control de carga, se utilizó el anticuerpo anti-GAPDH (1:1000) monoclonal de ratón (Cat. #VMA00046, Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.).

Citometría de Flujo

Se colocaron 2.5×10^5 células por pocillo de A549 y IMR90 en placas de 6 pocillos. Luego, las células fueron pretratadas por dos horas con diferentes concentraciones de los compuestos Radicol o Marizomib. Seguidamente, las células se infectaron con los virus recombinantes que expresan GFP: IAV, VSV y HCMV, durante una hora utilizando

una multiplicidad de infección (MOI) de 10. Después de esto, se retiró el inóculo y se añadió medio fresco con la dosis de los compuestos mencionadas con anterioridad.

Las células se visualizaron transcurridas 24 horas o más tiempo de iniciada la infección, bajo un microscopio de fluorescencia y seguidamente fueron lavadas con PBS estéril, para luego colocar 500 μ L de tripsina durante 5 minutos en la incubadora, después de este paso, se recolectó en tubos de un volumen máximo de 1.5 mL y se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 revoluciones por minuto. Se procedió a eliminar el sobrenadante y las células se fijaron con una solución de paraformaldehído al 2% diluida en PBS durante 30 minutos, y después, se resuspendieron en PBS. Finalmente, las células se analizaron en el canal de GFP en el citómetro CitoFlex S (Beckman Coulter, CA, EE. UU.).

Análisis Estadístico

Cada experimento se realizó al menos dos veces con tres réplicas biológicas, a menos que se indique otra cosa. Se aplicaron pruebas estadísticas como: Mann-Whitney, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett post hoc, utilizando el software de GraphPad Prism 9.4.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.) para Microsoft Windows. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo. Los gráficos se realizaron usando el software GraphPad Prism.

CAPITULO III

RESULTADOS

RESULTADOS

Análisis de la citotoxicidad de los compuestos marinos Radicol y Marizomib

Para evaluar la citotoxicidad de los compuestos Radicol y Marizomib células Vero, BHK-21 y A549 fueron tratadas con dosis creciente de cada compuesto durante 24 o 48 horas y después, la viabilidad celular se determinó usando el método de MTT.

Los resultados indican observamos que las tres líneas celulares toleraban dosis de hasta 5 μ M de Radicol, en particular durante las 48 horas de incubación (Figura 7B, D, F). Por otro lado, Marizomib es tolerado en dosis de 50 nM o menores en las células Vero y BHK-21 (Figura 7A, C), mientras que en A549 en dosis menores a 10 nM, en ambos tiempos de incubación analizados (Figura 7E).

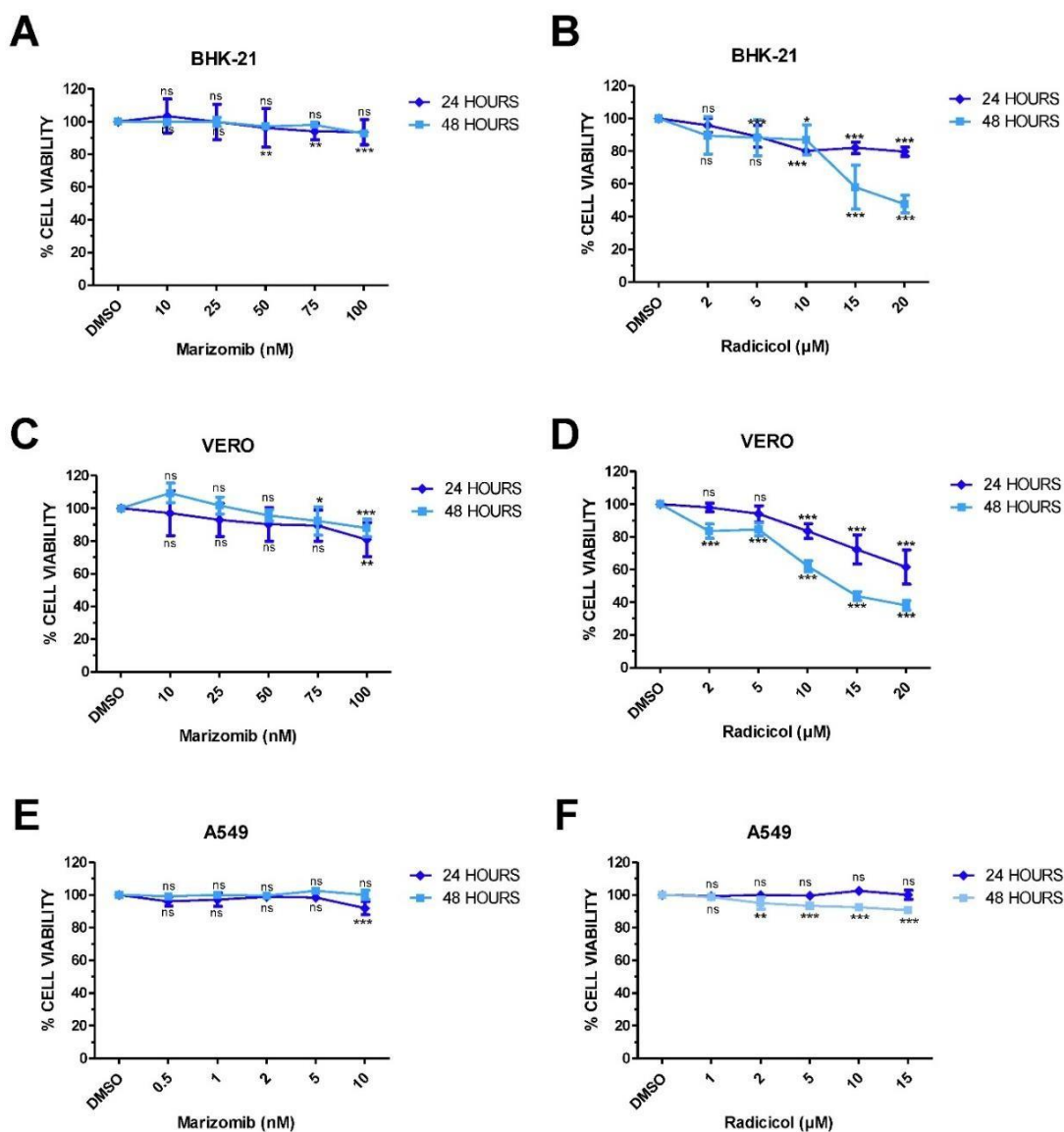


Figura 7 Análisis de la citotoxicidad de los compuestos marinos Radicicol y Marizomib. Células BHK-21 (A-B), Vero (C-D) y A549 (E-F) fueron tratadas con las dosis indicadas de Radicicol y Marizomib durante 24 o 48 horas. Posteriormente, se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Los datos se analizaron con la prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba de comparación de Dunnett. Las diferencias estadísticas se denotan como: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns: no significativo.

Para verificar los resultados anteriores, evaluamos el efecto citotóxico de Radicolol y Marizomib observando la morfología de las células con la ayuda de un microscopio invertido. En estos experimentos obtuvimos resultados similares a los ensayos de MTT. Dosis superiores a 5 μ M de Radicolol y 50 nM de Marizomib resultaron ser tóxicas cuando las células se incubaron durante 48 horas (Figura 8A-B).

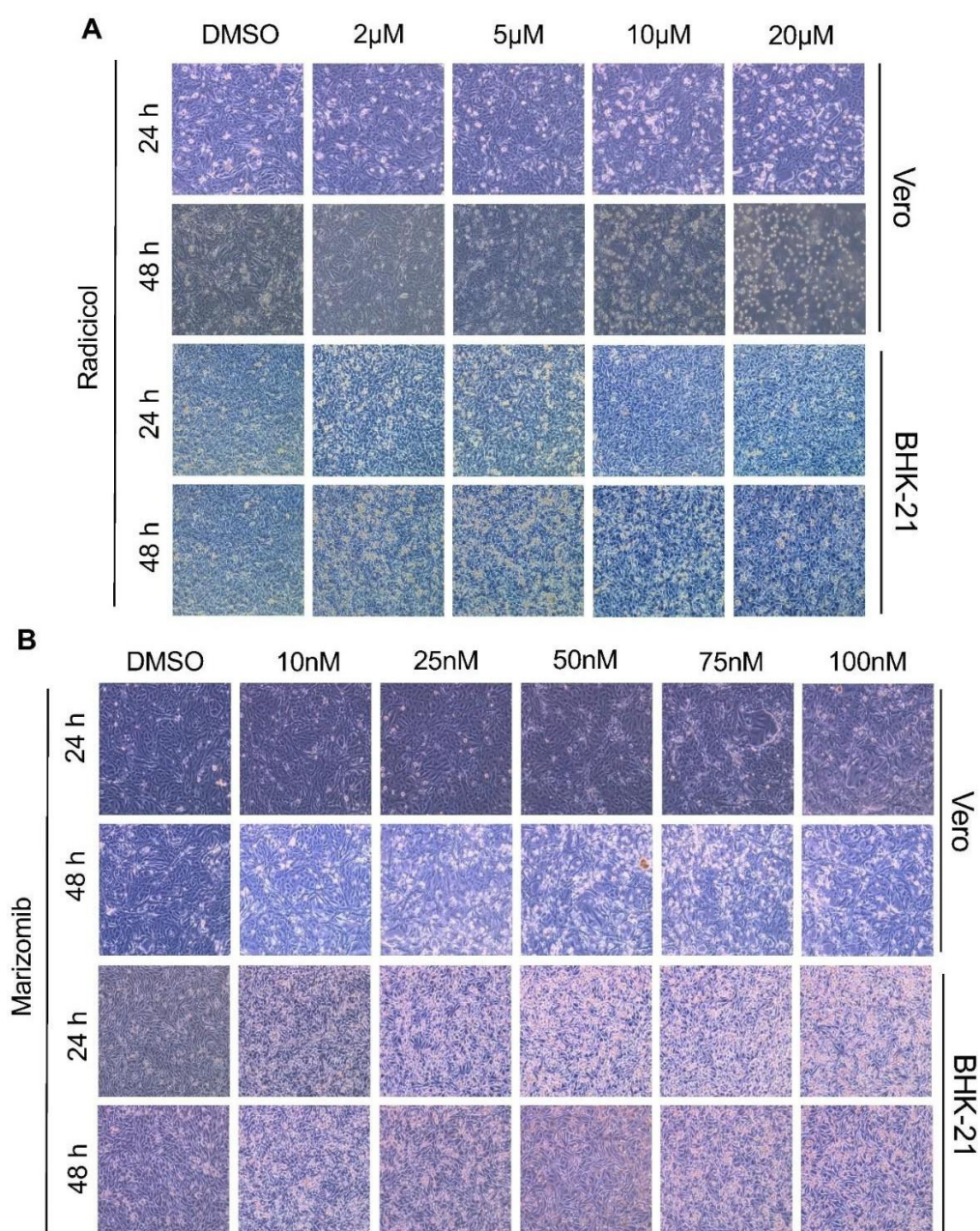


Figura 8 Evaluación del efecto citotóxico de los compuestos Radicolol y Marizomib. Células Vero o BHK-21 fueron tratadas con dosis creciente de Radicolol (A) o Marizomib (B) durante 24 o 48 horas y después, se tomaron fotografías usando un microscopio invertido.

Radicol y Marizomib previene el efecto citopático inducido por MAYV

Se ha demostrado previamente que el virus Mayaro produce un fuerte efecto citopático en las células infectadas [14]. Así, decidimos evaluar si Radicol o Marizomib tenían un efecto protector ante el daño celular inducido por el virus. Para ello, células Vero o BHK-21 fueron pre-tratadas, infectadas con MAYV y posteriormente tratadas durante 48 horas con los compuestos. Después, la morfología celular fue analizada mediante microscopía. Como se observa en la Figura 9, ambos compuestos tienen un efecto protector en células Vero ante la infección por el MAYV, sin embargo, Radicol (Figura 9A panel inferior) produce una mayor protección ante el efecto citopático, si lo comparamos con Marizomib (Figura 9A panel medio). Resultados similares se observan en las células BHK-21 (Figura 9 B), donde hay una clara tendencia a proteger a las células del daño inducido por MAYV, aunque en estas células el efecto citopático fue menor (Figura 9B).

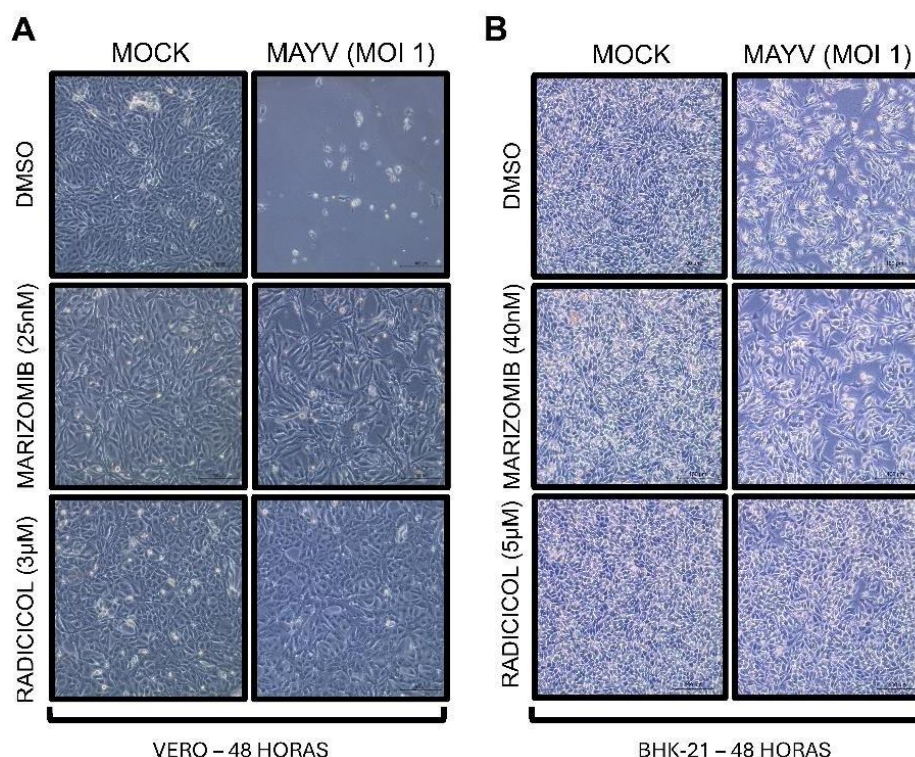


Figura 9 Radicol y Marizomib previenen el efecto citopático inducido por MAYV. Células Vero (A) o BHK-21 (B) fueron tratadas con Radicol ($3\ \mu\text{M}$ y $5\ \mu\text{M}$) o Marizomib ($25\ \text{nM}$ y $40\ \text{nM}$), se infectaron con la cepa MAYV ARV0565. A las 48 horas de infección, se evaluó el efecto protector frente al efecto citopático causado por el MAYV mediante un microscopio invertido.

Radicol y Marizomib inhiben la producción de progenie de MAYV de forma dependiente de la dosis

Luego de haber observado que los compuestos marinos Radicol y Marizomib protegían del ECP inducido por MAYV, se evaluó si estos compuestos afectaban la producción de progenie viral. Para ello, células Vero o BHK-21 fueron infectadas y tratadas con dosis crecientes de las drogas como mencionamos previamente, y tras 24 horas de infección, se cuantificaron los títulos virales mediante la técnica de formación de placas. En la Figura 10, se puede observar que los títulos de MAYV disminuyen de forma considerable de manera dependiente de la dosis para ambos compuestos e independientemente de la línea celular probada (Figura 10 A-D). Radicol reduce los títulos de MAYV entre 4 y 5 logaritmos, dependiendo de la línea celular (Figura 10A-B), mientras que Marizomib entre 5 y 7 logaritmos (Figura 10C-D). Estos resultados indican que Radicol y Marizomib inhiben la replicación de MAYV.

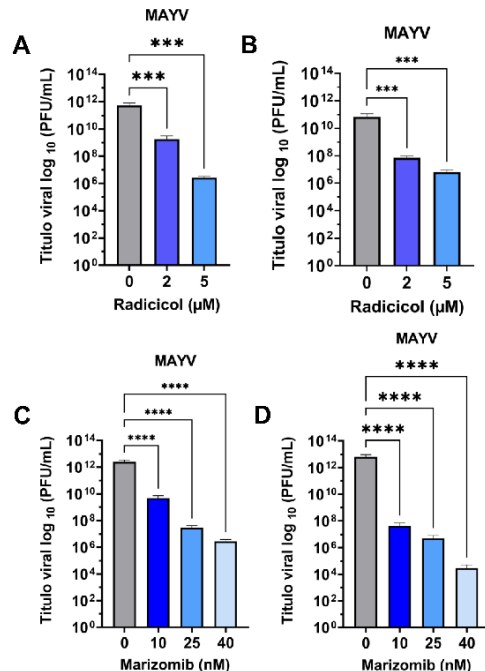


Figura 10 Radicol y Marizomib inhiben la producción de progenie de MAYV de manera dependiente de la dosis. Células BHK-21 (A, C) y Vero (B, D) fueron infectadas con Mayaro y tratadas con Radicol o Marizomib. Los sobrenadantes celulares se analizaron mediante el ensayo de formación de placas para cuantificar la producción de progenie viral. Los datos se analizaron con la prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba de comparación de Dunnett. Las diferencias estadísticas se denotan como: *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Radicol y Marizomib reducen los niveles de las proteínas E1 y nsP1 de MAYV de forma dependiente de la dosis

Para lograr comprender como afectan los compuestos Radicol y Marizomib la expresión de proteínas virales de MAYV, analizamos dos proteínas importantes para el ciclo de replicación del virus, la proteína estructural E1 que forma parte de la partícula viral y nsP1, una proteína no estructural que cumple diferentes funciones en la replicación del virus. A partir de los extractos de proteínas obtenidos de las células infectadas y tratadas con los compuestos, se analizaron los niveles de las proteínas virales mediante inmunoblot. En estos experimentos observamos que el tratamiento con Radicol o Marizomib disminuyen significativamente los niveles de las proteínas E1 y nsP1 de MAYV, de manera dependiente de la dosis y en ambas líneas celulares evaluadas (Figura 11). Estos resultados demuestran que la expresión de las proteínas E1 y nsP1 se ve afectadas por los compuestos empleados, de manera dependiente de la dosis.

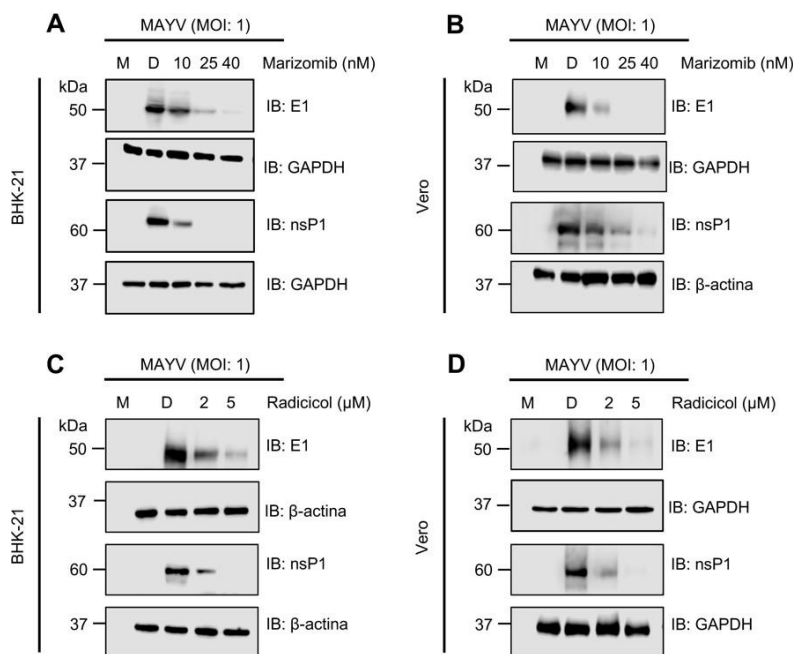


Figura 11 Radicol y Marizomib reducen los niveles de las proteínas E1 y nsP1 de MAYV de forma dependiente de la dosis. Células BHK-21 (A, C) o Vero (B, D) fueron pre-tratadas con los compuestos Radicol y Marizomib a las dosis indicadas durante 2 horas. Después, se retiraron los compuestos y las células fueron infectadas con el virus Mayaro a una MOI de 1. Tras una hora de absorción del virus, se retiró el inóculo y se trataron con los compuestos durante 24 horas. Se extrajeron las proteínas y se analizaron mediante Western blot usando los anticuerpos anti-E1 y anti-nsP1. Como control de carga, se usó la proteína GAPDH y β-actina. M: mock (no infectado); D (DMSO, control negativo).

El efecto antiviral de Radicicol y Marizomib sobre MAYV es independiente de la cepa de virus analizada

Después de haber evaluado la actividad antiviral de Radicicol y Marizomib contra el virus MAYV, nos propusimos analizar el efecto de estos dos compuestos frente a otras cepas de este virus, aisladas en otras regiones geográficas: la cepa BeH256 (Brasil) y la cepa D218 (Surinam). Para estos ensayos, células A549 fueron infectadas y tratadas con dosis crecientes de las drogas como mencionamos previamente, y tras 24 horas de infección, se cuantificaron los títulos virales mediante la técnica de formación de placas. Como se observa en la Figura 12, los títulos de las cepas de MAYV BeH256 y D218 disminuyen de forma considerable de manera dependiente de la dosis, cuando tratamos las células con Radicicol (Figura 12A, B). Los resultados indican que hubo una reducción de los títulos de MAYV entre 2 y 3 logaritmos dependiendo de la cepa analizada (Figura 12A-B). Para corroborar estos resultados, decidimos analizar la expresión de las proteínas E1 y nsP1 de estas cepas tras el tratamiento con Radicicol mediante inmunoblot. Estos análisis indican que Radicicol promueve una reducción significativa de los niveles de ambas proteínas virales independientemente de la cepa estudiada (Figura 12 C, D).

De la misma forma, nos propusimos evaluar el efecto de Marizomib frente a estas dos cepas de MAYV. En el ensayo de cuantificación de títulos virales, este compuesto provocó una disminución de la progenie viral de entre 2 y 3 logaritmos en las dosis máximas probadas para las cepas BeH256 y D218, respectivamente (Figura 13 A, B). Por último, evaluamos la expresión de las proteínas virales E1 y nsP1 en ambas cepas empleando la técnica de Western blot. Los resultados indican que Marizomib inhibe la expresión de ambas proteínas virales (Figura 13 C, D). Estos resultados indican que Radicicol y Marizomib inhiben la replicación de MAYV independientemente de la cepa evaluada.

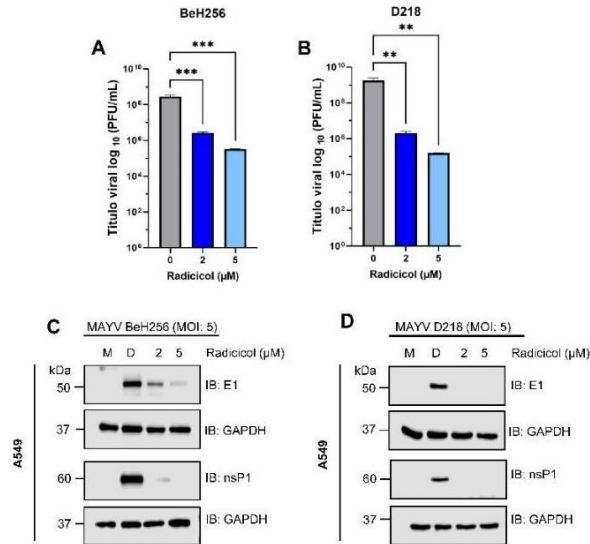


Figura 12 Radicol inhibe la replicación y la expresión de proteínas de las cepas de MAYV. Células A549 fueron infectadas utilizando una MOI 5 de la cepa BeH256 (A, C) o D218 (B, D) del virus Mayaro tratadas con Radicol. Los sobrenadantes celulares se analizaron mediante el ensayo de formación de placas para cuantificar la producción de progenie viral. Los datos se analizaron con la prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba de comparación de Dunnett. Las diferencias estadísticas se denotan como: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Se extrajeron las proteínas y se analizaron mediante Western blot usando los anticuerpos anti-E1 y anti-nsP1. Como control de carga, se usó la proteína GAPDH y β -actina. M: mock (no infectado); D (DMSO, control negativo).

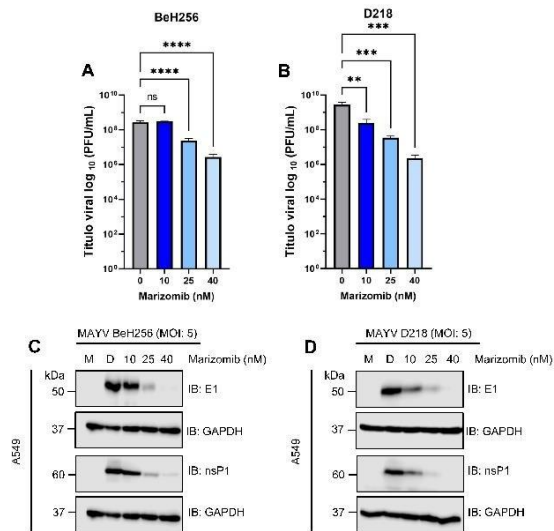


Figura 13 Marizomib inhibe la replicación y la síntesis de proteínas de las cepas de MAYV. Células A549 fueron infectadas utilizando una MOI 5 de la cepa BeH256 (A, C) y D218 (B, D) del virus Mayaro tratadas con Marizomib. Los sobrenadantes celulares se analizaron mediante el ensayo de formación de placas para cuantificar la producción de progenie viral. Los datos se analizaron con la prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba de comparación de Dunnett. Las diferencias estadísticas se denotan como: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns: no significativo. Se extrajeron las proteínas y se analizaron mediante Western blot usando los anticuerpos anti-E1 y anti-nsP1. Como control de carga, se usó la proteína GAPDH y β -actina. M: mock (no infectado); D (DMSO, control negativo).

Radicol, pero no Marizomib, interfiere con la replicación de otros virus de ARN, incluidos VSV e IAV

Luego de haber demostrado el efecto antiviral de Radicol y Marizomib contra el virus MAYV, decidimos evaluar si estos compuestos afectaban otros virus de ARN. Para ello, usamos los virus VSV y AIV recombinantes que expresan la proteína verde fluorescente (GFP). Así, células A549 fueron pretradas, infectadas con los virus y tratadas con los compuestos como describimos previamente. Después, analizamos la expresión de GFP mediante citometría de flujo. En las células infectadas con VSV-GFP, observamos que el tratamiento con Radicol provocó una disminución significativa del porcentaje de células GFP positivas en comparación con el control (DMSO) (Figura 14A). Además, observamos una reducción de la intensidad del GFP, lo que indica que el compuesto está afectando la replicación del VSV (Figura 14B). Para corroborar estos resultados, decidimos analizar la expresión de las proteínas G y M de VSV mediante inmunoblot. Como se observa en la Figura 12, hay una clara bajada en la expresión de ambas proteínas virales de manera dependiente de la dosis de Radicol (Figura 14C). Por el contrario, el tratamiento con Marizomib no afecta el % de células GFP positivas o la intensidad de GFP y tampoco parece afectar la expresión de las proteínas G y M (Figura 14D-F), lo que sugiere que este compuesto no tiene efecto sobre la replicación de VSV.

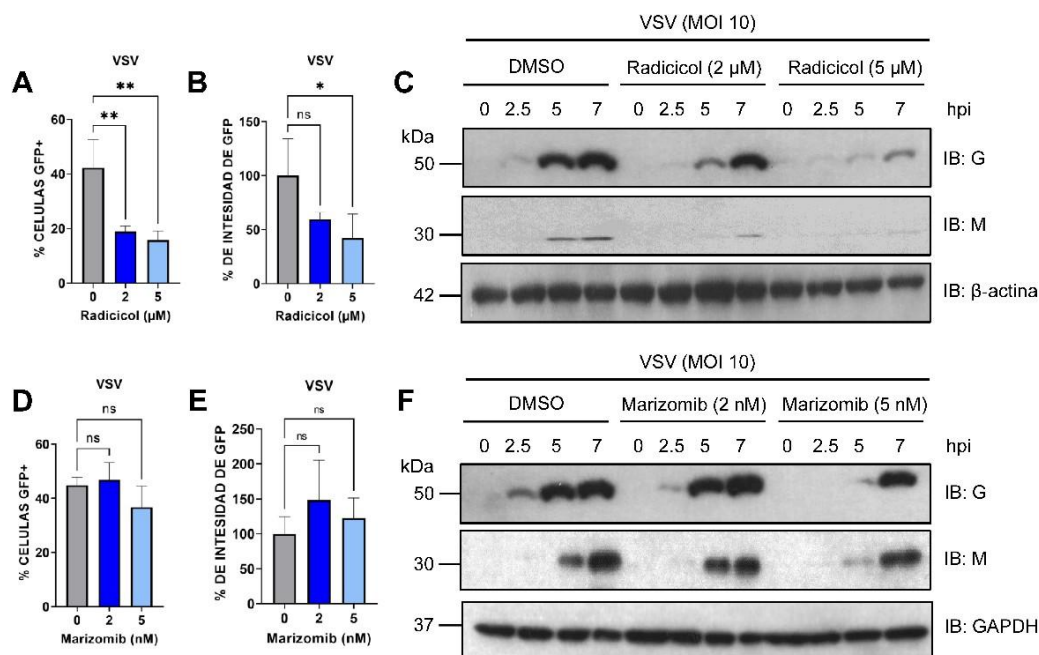


Figura 14 Radicicol inhibe la replicación de VSV. Células A549 fueron infectadas con VSV-GFP y tratadas o no con las dosis indicadas de Radicicol (A y B) o Marizomib (D y E). Tras 24 h de tratamiento, la expresión e intensidad de GFP fue analizada mediante citometría de flujo. Cada barra representa el promedio y la desviación estándar de 3 réplicas. Los datos fueron analizados mediante la prueba estadística de ANOVA de una vía, acompañado de una prueba de Dunnett. Las diferencias estadísticas se denotan como: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ y ns: no-significativo. Análisis de la expresión de las proteínas de G y M de VSV mediante Western blot en extractos proteicos obtenidos de células A549 infectadas con VSV y tratadas o no con las dosis indicadas de Radicicol (C) o Marizomib (F).

Para el caso de IAV, observamos resultados similares al de VSV. Radicicol promovió una bajada muy significativa del % de células GFP positivas y de la intensidad de GFP, de manera dependiente de la dosis (Figura 15A-B). Además, la expresión de la proteína NP de IAV se redujo en las células tratadas con Radicicol (Figura 15C), indicando que este compuesto también inhibe la replicación de este virus. Sin embargo, cuando las células fueron tratadas con Marizomib no observamos un efecto antiviral contra este virus de ARN (Figura 15D-F).

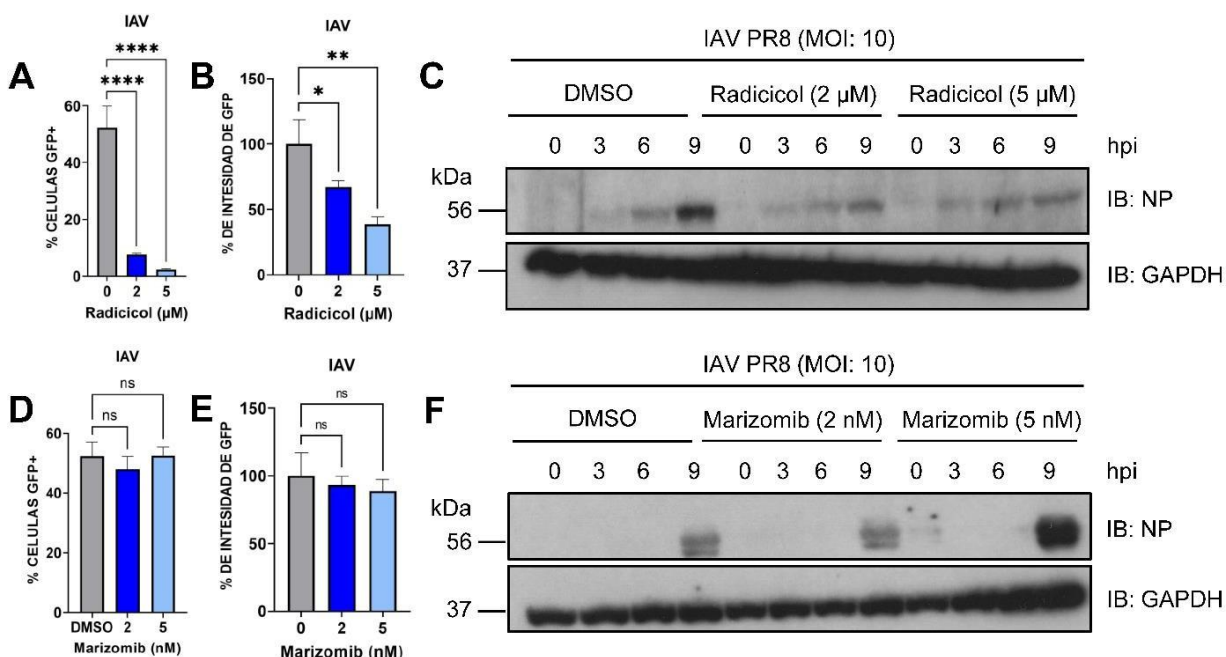


Figura 15 Radicicol bloquea la replicación de IAV. Evaluación de la expresión de GFP o su intensidad mediante citometría, en células A549 tratadas o no con las dosis indicadas de Radicicol (A y B) o Marizomib (D y F) e infectadas con IAV-GFP. Cada barra representa el promedio y la desviación estándar de 3 réplicas. Análisis estadístico realizado mediante la prueba ANOVA de una vía, acompañado de una prueba de Dunnett. Las diferencias estadísticas se denotan como: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$; y ns: no-significativo. Análisis de la expresión de la proteína NP de IAV (cepa PR8, Puerto Rico), mediante Western blot, en células A549 infectadas con IAV y tratadas o no con Radicicol (C) o Marizomib (F).

Marizomib, pero no Radicicol, inhibe virus de ADN tales como los virus vaccinia y el citomegalovirus humano

Luego de haber analizado la actividad de Radicicol y Marizomib contra varios virus de ARN, decidimos evaluar el efecto antiviral contra virus de ADN de dos familias distintas, el virus vaccinia (*Poxviridae*) y el citomegalovirus humano (*Herpesviridae*). En el caso de vaccinia, células A549 fueron pretratadas con los compuestos, infectadas y tratadas nuevamente con las drogas durante 24 horas. Nuestros resultados indican que Radicicol no afecta la producción de progenie de vaccinia ni tampoco la expresión de la proteína E3L (Figura 16A-B). Por el contrario, Marizomib promovió una bajada significativa de manera dosis dependiente de los títulos virales y de los niveles de la proteína E3L (Figura 16C-D).

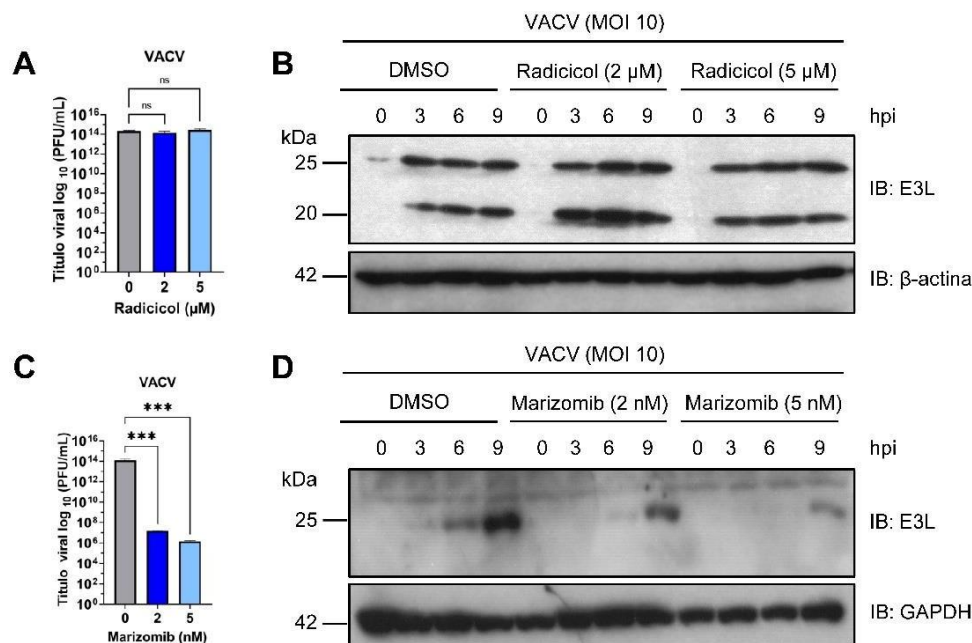


Figura 16 Marizomib reduce la replicación de VACV. Células A549 fueron infectadas con VACV y tratadas o no con las dosis indicadas de Radicol (A) o Marizomib (C). Después, los títulos virales fueron cuantificados mediante la técnica de titulación por placas. Cada barra representa el promedio y la desviación estándar de 3 réplicas. Los datos se analizaron mediante la prueba estadística de ANOVA de una vía, acompañado de una prueba de Dunnett. La significancia estadística se denota como: *** $p < 0.01$ y ns: no-significativo. Análisis de la expresión de la proteína E3L de VAVC, mediante Western blot, en células A549 tratadas o no con Radicol (B) o Marizomib (D).

Dado que el citomegalovirus humano (HCMV) replica en fibroblastos de pulmón IMR90, en primer lugar, se analizó la toxicidad de Radicol y Marizomib en esta línea celular. En estos experimentos encontramos que el Radicol fue muy tóxico en las células IMR90 en todas las dosis probadas (Figura 17A), por lo que decidimos no evaluar el efecto de este compuesto sobre HCMV. En el caso de Marizomib, observamos que dosis superiores a 10 nM reducían significativamente la viabilidad de las células (Figura 17B). El HCMV que usamos expresa la proteína GFP, por lo que usamos citometría de flujo como describimos previamente. Como se observa en la Figura 15, el % de células GFP positivas y la intensidad del GFP se redujeron significativamente en las células tratadas con Marizomib (Figura 17C-D). Es llamativo que a dosis de 5 nM se observó un efecto contra HCMV, dado que para VSV y IAV a dosis similares no se observó actividad antiviral (Figura 14 y 15).

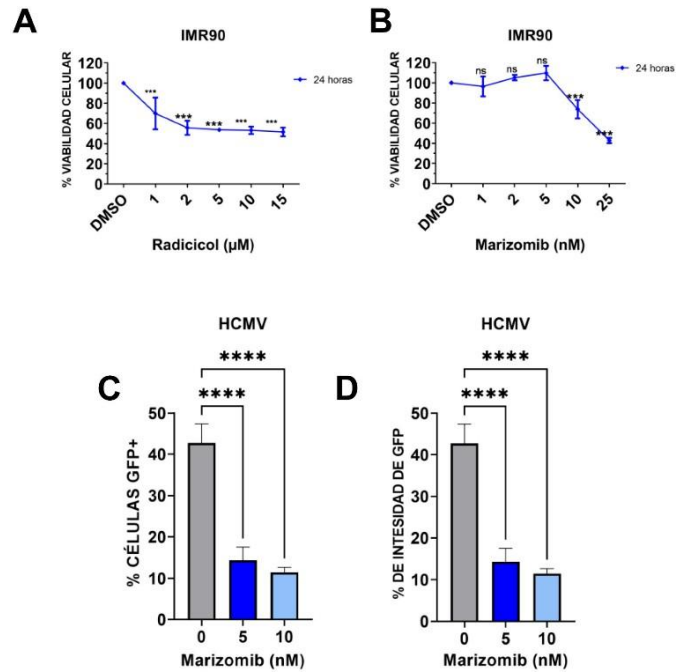


Figura 17 Marizomib inhibe la replicación de HCMV. Células IMR90 fueron tratadas con Radicicol (A) o Marizomib (B) a las concentraciones indicadas durante 24 h. Después, la viabilidad celular se determinó mediante el método de MTT. Cada punto representa el promedio y la desviación estándar de 5 réplicas. Las Células IMR90 fueron infectadas con HCMV-GFP y tratadas con Marizomib. Tras 48 h de tratamiento, la expresión o intensidad de GFP, se analizó mediante citometría de flujo. Cada barra representa el promedio y la desviación estándar de 3 réplicas. Los datos fueron analizados mediante la prueba estadística ANOVA de una vía, acompañado de una prueba de Dunnett. Las diferencias estadísticas se denotan como: ** $p < 0.05$; *** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$ y ns: no-significativo.

CAPITULO IV

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Las enfermedades arbovirales comparten muchas características en común, lo que dificulta su diferenciación y diagnóstico correcto [14]. Sin embargo, debido a cambios en los factores antropogénicos, mutaciones virales y la composición o dinámica de las poblaciones de hospedadores o vectores, los arbovirus tienen el potencial de emerger o reemerger en toda la región de las Américas [2,6]. El virus Mayaro (MAYV) es un arbovirus con potencial emergente, que al igual que otros alfavirus, puede infectar, replicarse y diseminarse en huéspedes vertebrados e invertebrados, aunque con un conocimiento limitado de su epidemiología y evolución debido a la falta de estudios y vigilancia [4,113]. En el caso de MAYV, el diagnóstico se basa en una evaluación clínica sintomática, lo que muchas veces contribuye a una clasificación errónea de los casos, confundiéndose con otros arbovirus como el Dengue, Zika o Chikungunya [6,114].

La distribución geográfica de los vectores y huéspedes del MAYV ha restringido la mayoría de los brotes a áreas rurales cercanas a bosques tropicales. Sin embargo, varios factores sugieren la posibilidad de urbanización del MAYV como lo son: a) su homología con CHIKV, otro alfavirus con una historia de urbanización bien descrita; b) la ocurrencia regular de casos de MAYV cerca de las principales ciudades tropicales donde *A. aegypti* es endémico [115,116]; c) los estudios experimentales que muestran que *A. aegypti* [117] y *A. albopictus* son vectores competentes para la transmisión del MAYV y d) el hecho de que el MAYV se propaga por viajeros enfermos o aves migratorias [27]. De esta manera, junto a los desafíos que se enfrentan con el diagnóstico, así como la falta de antivirales específicos o vacunas autorizadas exacerban aún más la posible amenaza que representa el MAYV para la salud pública global [100].

La evaluación de productos naturales para descubrir nuevos compuestos antivirales ofrece una ventaja en el proceso de descubrimiento de fármacos y podría ayudar a acelerar el desarrollo de tratamientos terapéuticos y profilácticos para enfermedades arbovirales [100]. Los fármacos derivados de fuentes naturales tienen varias ventajas sobre los compuestos sintéticos, entre ellas un menor costo, menos efectos secundarios, más diversidad y complejidad de las moléculas químicas, lo que puede limitar la resistencia a los fármacos virales y su rentabilidad en los programas de

descubrimiento de fármacos [8,118]. Todas estas características sugieren que la detección de compuestos naturales es una estrategia prometedora para identificar nuevos tratamientos antivirales [8,119].

En este estudio analizamos la actividad antiviral de los compuestos marinos Radicicol y Marizomib contra MAYV, un arbovirus desatendido y emergente.

Los resultados obtenidos de la viabilidad celular nos demuestran que ambos compuestos fueron bien tolerados en las líneas celulares Vero y BHK-21. Así, Radicicol en dosis de hasta 5 μ M y Marizomib dosis de hasta 50 nM. No obstante, en las células A549 Marizomib resultó ser bastante tóxico, mientras que Radicicol mostró poca toxicidad. Las IMR90 fueron muy sensibles al tratamiento con ambos compuestos, lo que sugiere que la citotoxicidad de los compuestos es dependiente de la línea celular probada.

En estudios previos, se ha demostrado que el MAYV induce un fuerte efecto citopático (ECP) en diferentes líneas celulares, incluyendo las células Vero, Hela y BHK-21 [8,10,119], por tanto, evaluamos si el Radicicol o el Marizomib tenían la capacidad de proteger a las células Vero o BHK-21 contra el daño inducido por el virus. Estos ensayos demuestran que Radicicol y Marizomib previenen el daño celular inducido por MAYV en las células Vero y BHK-21 en las dosis utilizadas, surgiendo que estos compuestos marinos podrían tener actividad antiviral.

Para comprobar si el Radicicol o el Marizomib afectaban la replicación viral de MAYV, evaluamos el efecto de estos dos compuestos en la producción de progenie infecciosa en sobrenadantes de células infectadas y tratadas con concentraciones crecientes de estos compuestos, mediante el ensayo de formación de placas. En estos experimentos, observamos una clara bajada de los títulos de MAYV de forma dosis-dependiente e independiente de la línea celular o cepa del virus evaluada, con una reducción de entre 4 y 6 logaritmos, en las dosis máximas probadas de ambos compuestos. Por último, en consonancia con los resultados anteriores, evaluamos la expresión de las proteínas virales E1 y nsP1 empleando la técnica de Western blot. Estos análisis sugieren que el Radicicol y el Marizomib suprimen significativamente la

expresión de ambas proteínas virales. En conjunto estos resultados demuestran que ambos compuestos pueden inhibir la replicación de MAYV y sus distintas cepas.

MAYV necesita manipular diversos procesos celulares para replicarse eficazmente, por lo tanto, la búsqueda de factores clave del huésped implicados en la replicación viral es una estrategia eficaz para identificar posibles dianas antivirales [9,10]. Por ejemplo, se ha reportado que la replicación de muchos virus diferentes parece ser sensible a los inhibidores de la HSP90 en concentraciones que no afectan la viabilidad celular; esta hipersensibilidad de la replicación viral a la inhibición de la HSP90, puede deberse a varias características únicas de la homeostasis de las proteínas virales, que presentan un conjunto distinto de desafíos para la maquinaria de plegamiento de proteínas y, por lo tanto, la vuelven más sensible a las fluctuaciones en la capacidad de plegamiento celular [98]. De la misma manera, los virus han desarrollado otras estrategias para replicarse en las células huésped, como el secuestro del UPS [9]. La ubiquitinación sirve para dirigir las proteínas a la degradación proteasomal, y los virus modulan este sistema para ayudar a la replicación y para escapar de las respuestas inmunes del huésped [111]. Nuestros resultados demuestran que la inhibición del proteasoma con Marizomib y de la chaperona HSP90 tienen un impacto negativo en la replicación del MAYV.

Dado que Radicicol y Marizomib habían demostrado una actividad supresora consistente contra MAYV, decidimos estudiar estos compuestos en otros virus con genomas de ARN como el VSV e IAV, para evaluar si tenían una actividad de amplio espectro. Nuestros resultados indican que Radicicol es capaz de inhibir la replicación de VSV e IAV de manera dependiente de la dosis, tal y como sugieren los análisis de expresión de GFP. Además, este compuesto redujo significativamente los niveles de las proteínas virales, corroborando los resultados de citometría. Es importante destacar que solo había un reporte previo de actividad antiviral de Radicicol, contra el virus Chikungunya [99]. Dado que este compuesto inhibe a la HSP90, es probable que el efecto antiviral de Radicicol sobre MAYV, VSV e IAV se deba al bloqueo de esta chaperona, ya que esta proteína es muy relevante para la replicación de diversos virus [120]. Por otro lado, no observamos un efecto de Marizomib sobre VSV o IAV.

Probablemente, esta pérdida de actividad está asociado a que las dosis de Marizomib se redujeron debido a la toxicidad del compuesto en las células A549.

Finalmente, decidimos investigar si estos compuestos tienen efecto sobre virus de ADN, como el VACV, un poxvirus o el citomegalovirus humano (HCMV), un miembro de la familia *Herpesviridae*. En estos experimentos no observamos un efecto Radicicol sobre VACV, no obstante, Marizomib promovió una bajada significativa de los títulos de VACV y, además, una reducción de la proteína E3L, indicando que este compuesto tiene actividad antiviral contra VACV. En el caso de HCMV, solo se evaluó el efecto de Marizomib frente a este virus en células IMR90 y el Radicicol se descartó de este análisis, por su alta toxicidad en esta línea celular. Los resultados indican que el tratamiento de las células con Marizomib disminuye de forma significativa tanto el porcentaje de células positivas para GFP, así como la intensidad del GFP expresado por las células, lo que es representativo de la cantidad de virus producido, indicando que Marizomib reduce también la replicación de HCMV. Todos estos resultados sugieren que Radicicol y Marizomib podrían tener una actividad antiviral de amplio espectro contra distintos virus de importancia médica.

En base a otros estudios previamente reportados, es posible que estos compuestos también presenten actividad contra otros arbovirus, como es el caso del Radicicol que afectó la replicación del CHIKV al inhibir la HSP90 [99]. También, nuestro grupo de investigación en trabajos anteriores, investigó el rol del UPS en la replicación de otro arbovirus desatendido, UNAV, donde reportaron que la inhibición del proteasoma reduce la producción de partículas virales infecciosas de UNAV de manera dosis-dependiente [9].

Este trabajo destaca la importancia de la maquinaria celular del huésped en la replicación viral de distintos virus. Además, ofrece información sobre el desarrollo futuro de posibles terapias para tratar estas enfermedades, sin embargo, la aprobación del uso de estos compuestos para el tratamiento de infecciones virales requiere análisis adicionales en modelos de infección *in vivo* y ensayos clínicos para demostrar su eficacia y seguridad como fármacos antivirales.

CAPITULO V

CONCLUSIÓN Y

RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

1. Las células Vero y BHK-21 toleran dosis de Radicicol de hasta 5 μ M y de Marizomib hasta 40 nM. Las células A549 resisten dosis de hasta 5 nM de Marizomib y 5 μ M Radicicol durante 24 horas de incubación. Para el caso de las células IMR90, el Radicicol es altamente tóxico, mientras que Marizomib es bien tolerado a dosis de 5 nM.
2. Radicicol y Marizomib protegen a las células Vero y BHK-21 del efecto citopático inducido por el virus Mayaro.
3. Radicicol y Marizomib reducen la producción de progenie del virus Mayaro de manera dependiente de la dosis.
4. La expresión de las proteínas E1 y nsP1 del virus Mayaro se reducen con ambos compuestos de manera dependiente de la dosis.
5. Radicicol también inhibe la replicación de otros virus de ARN evaluados: el virus de la estomatitis vesicular (VSV) y el virus de la influenza A (IAV). Además, provoca una reducción de la expresión de las proteínas virales.
6. Marizomib tiene efecto antiviral contra los virus de ADN evaluados: Vaccinia (VACV) y el citomegalovirus humano (HCMV). Radicicol no tiene efecto contra el Virus vaccinia.

RECOMENDACIONES

1. Analizar las etapas en el ciclo de vida de los virus en donde actúan los compuestos Radicicol y Marizomib.
2. Explorar los mecanismos moleculares por el cual Radicicol y Marizomib inhiben la replicación de los virus estudiados.
3. Realizar ensayos en modelos animales para verificar la toxicidad y el efecto antiviral de Radicicol y Marizomib.

CAPITULO VI

REFERENCIAS

BIBLIOGRAFICAS

REFERENCIAS

1. Andreolla AP, Borges AA, Bordignon J, Duarte dos Santos CN. Mayaro Virus: The State-of-the-Art for Antiviral Drug Development. *Viruses*. 2022;14: 1787. doi:10.3390/v14081787
2. Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res*. 2010;85: 328–345. doi:10.1016/j.antiviral.2009.10.008
3. Saatkamp CJ, Rodrigues LRR, Pereira AMN, Coelho JA, Marques RGB, Souza VC de, et al. Mayaro virus detection in the western region of Pará state, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2021;54. doi:10.1590/0037-8682-0055-2020
4. Diagne CT, Bengue M, Choumet V, Hamel R, Pompon J, Missé D. Mayaro Virus Pathogenesis and Transmission Mechanisms. *Pathogens*. 2020;9: 738. doi:10.3390/pathogens9090738
5. Mendonça DC, Reis ErikVS, Arias NídiaEC, Valencia HJ, Bonjardim CA. A study of the MAYV replication cycle: Correlation between the kinetics of viral multiplication and viral morphogenesis. *Virus Res*. 2023;323: 199002. doi:10.1016/j.virusres.2022.199002
6. Ganjian N, Riviere-Cinnamond A. Mayaro virus in Latin America and the Caribbean. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 2020;44: 1. doi:10.26633/RPSP.2020.14
7. Azar SR, Campos RK, Bergren NA, Camargos VN, Rossi SL. Epidemic Alphaviruses: Ecology, Emergence and Outbreaks. *Microorganisms*. 2020;8: 1167. doi:10.3390/microorganisms8081167
8. Valdés-Torres P, Campos D, Bhakta M, Galán-Jurado PE, Durant-Archibold AA, González-Santamaría J. Honokiol and Alpha-Mangostin Inhibit Mayaro Virus Replication through Different Mechanisms. *Molecules*. 2022;27: 7362. doi:10.3390/molecules27217362
9. Llamas-González YY, Campos D, Pascale JM, Arbiza J, González-Santamaría J. A Functional Ubiquitin-Proteasome System is Required for Efficient Replication of New World Mayaro and Una Alphaviruses. *Viruses*. 2019;11: 370. doi:10.3390/v11040370
10. Sugasti-Salazar M, Campos D, Valdés-Torres P, Galán-Jurado PE, González-Santamaría J. Targeting Host PIM Protein Kinases Reduces Mayaro Virus Replication. *Viruses*. 2022;14: 422. doi:10.3390/v14020422

11. Pezzi L, Rodriguez-Morales AJ, Reusken CB, Ribeiro GS, LaBeaud AD, Lourenço-de-Oliveira R, et al. GloPID-R report on chikungunya, o'nyong-nyong and Mayaro virus, part 3: Epidemiological distribution of Mayaro virus. *Antiviral Res.* 2019;172: 104610. doi:10.1016/j.antiviral.2019.104610
12. Paschoalino M, Marinho M dos S, Santos IA, Grosche VR, Martins DOS, Rosa RB, et al. An update on the development of antiviral against Mayaro virus: from molecules to potential viral targets. *Arch Microbiol.* 2023;205: 106. doi:10.1007/s00203-023-03441-y
13. Langendries L, Abdelnabi R, Neyts J, Delang L. Repurposing Drugs for Mayaro Virus: Identification of EIDD-1931, Favipiravir and Suramin as Mayaro Virus Inhibitors. *Microorganisms.* 2021;9: 734. doi:10.3390/microorganisms9040734
14. Sugasti-Salazar M, Llamas-González YY, Campos D, González-Santamaría J. Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Impairs Mayaro Virus Replication in Human Dermal Fibroblasts and HeLa Cells. *Viruses.* 2021;13: 1156. doi:10.3390/v13061156
15. Abdelmageed AA, Ferran MC. The Propagation, Quantification, and Storage of Vesicular Stomatitis Virus. *Curr Protoc Microbiol.* 2020;58. doi:10.1002/cpmc.110
16. Simon ID, van Rooijen N, Rose JK. Vesicular Stomatitis Virus Genomic RNA Persists *In Vivo* in the Absence of Viral Replication. *J Virol.* 2010;84: 3280–3286. doi:10.1128/JVI.02052-09
17. Diefenbacher M, Sun J, Brooke CB. The parts are greater than the whole: the role of semi-infectious particles in influenza A virus biology. *Curr Opin Virol.* 2018;33: 42–46. doi:10.1016/j.coviro.2018.07.002
18. Taubenberger JK, Kash JC. Influenza Virus Evolution, Host Adaptation, and Pandemic Formation. *Cell Host Microbe.* 2010;7: 440–451. doi:10.1016/j.chom.2010.05.009
19. Brooke CB. Population Diversity and Collective Interactions during Influenza Virus Infection. *J Virol.* 2017;91. doi:10.1128/JVI.01164-17
20. Duffy S, Shackelton LA, Holmes EC. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat Rev Genet.* 2008;9: 267–276. doi:10.1038/nrg2323
21. Chan WM, McFadden G. Oncolytic Poxviruses. *Annu Rev Virol.* 2014;1: 191–214. doi:10.1146/annurev-virology-031413-085442

22. Petersen BW, Harms TJ, Reynolds MG, Harrison LH. Use of Vaccinia Virus Smallpox Vaccine in Laboratory and Health Care Personnel at Risk for Occupational Exposure to Orthopoxviruses — Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;65: 257–262. doi:10.15585/mmwr.mm6510a2
23. Hickson SE, Margineantu D, Hockenbery DM, Simon JA, Geballe AP. Inhibition of vaccinia virus replication by nitazoxanide. *Virology.* 2018;518: 398–405. doi:10.1016/j.virol.2018.03.023
24. Tomtishen III JP. Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virol J.* 2012;9: 22. doi:10.1186/1743-422X-9-22
25. Saffert RT, Penkert RR, Kalejta RF. Cellular and Viral Control over the Initial Events of Human Cytomegalovirus Experimental Latency in CD34 + Cells. *J Virol.* 2010;84: 5594–5604. doi:10.1128/JVI.00348-10
26. Marques RE, Shimizu JF, Nogueira ML, Vasilakis N. Current challenges in the discovery of treatments against Mayaro fever. *Expert Opin Ther Targets.* 2024; 1–12. doi:10.1080/14728222.2024.2351504
27. Acosta-Ampudia Y, Monsalve DM, Rodríguez Y, Pacheco Y, Anaya J-M, Ramírez-Santana C. Mayaro: an emerging viral threat? *Emerg Microbes Infect.* 2018;7: 1–11. doi:10.1038/s41426-018-0163-5
28. Sukmarini L. Antiviral Peptides (AVPs) of Marine Origin as Propitious Therapeutic Drug Candidates for the Treatment of Human Viruses. *Molecules.* 2022;27: 2619. doi:10.3390/molecules27092619
29. Riccio G, Ruocco N, Mutalipassi M, Costantini M, Zupo V, Coppola D, et al. Ten-Year Research Update Review: Antiviral Activities from Marine Organisms. *Biomolecules.* 2020;10: 1007. doi:10.3390/biom10071007
30. Donia M, Hamann MT. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *Lancet Infect Dis.* 2003;3: 338–348. doi:10.1016/S1473-3099(03)00655-8
31. Yasuhara-Bell J, Lu Y. Marine compounds and their antiviral activities. *Antiviral Res.* 2010;86: 231–240. doi:10.1016/j.antiviral.2010.03.009
32. Mezencio JMS, de Souza W, Fonseca MEF, Rebello MA. Ultrastructural study of Mayaro virus replication in BHK-21 cells. *Arch Virol.* 1990;114: 229–235. doi:10.1007/BF01310751

33. Anderson CR, Wattley GH, Ahin NW, Downs WG, Reese AA. Mayaro Virus: A New Human Disease Agent. *Am J Trop Med Hyg.* 1957;6: 1012–1016. doi:10.4269/ajtmh.1957.6.1012
34. Aguilar-Luis MA, Del Valle-Mendoza J, Silva-Caso W, Gil-Ramirez T, Levy-Blitchtein S, Bazán-Mayra J, et al. An emerging public health threat: Mayaro virus increases its distribution in Peru. *Int J Infect Dis.* 2020;92: 253–258. doi:10.1016/j.ijid.2020.01.024
35. Mourão MPG, Bastos M de S, de Figueiredo RP, Gimaque JBL, dos Santos Galusso E, Kramer VM, et al. Mayaro Fever in the City of Manaus, Brazil, 2007–2008. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 2012;12: 42–46. doi:10.1089/vbz.2011.0669
36. Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev.* 1994;58: 491–562. doi:10.1128/mr.58.3.491-562.1994
37. Zhang R, Kim AS, Fox JM, Nair S, Basore K, Klimstra WB, et al. Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. *Nature.* 2018;557: 570–574. doi:10.1038/s41586-018-0121-3
38. Carvalho CAM, Silva JL, Oliveira AC, Gomes AMO. 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;5: e3245. doi:10.7717/peerj.3245
39. Auguste AJ, Liria J, Forrester NL, Giambalvo D, Moncada M, Long KC, et al. Evolutionary and Ecological Characterization of Mayaro Virus Strains Isolated during an Outbreak, Venezuela, 2010. *Emerg Infect Dis.* 2015;21: 1742–1750. doi:10.3201/eid2110.141660
40. Hassing RJ, Leparac-Goffart I, Tolou H, van Doornum G, van Genderen PJ. Cross-reactivity of antibodies to viruses belonging to the Semliki forest serocomplex. *Eurosurveillance.* 2010;15. doi:10.2807/ese.15.23.19588-en
41. Lavergne A, Thoisy B de, Lacoste V, Pascalis H, Pouliquen J-F, Mercier V, et al. Mayaro virus: Complete nucleotide sequence and phylogenetic relationships with other alphaviruses. *Virus Res.* 2006;117: 283–290. doi:10.1016/j.virusres.2005.11.006
42. Powers AM, Aguilar P V, Chandler LJ, Brault AC, Meakins TA, Watts D, et al. Genetic relationships among Mayaro and Una viruses suggest distinct patterns of transmission. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75: 461–9.

43. da Rosa APAT, Pinheiro FP, LeDuc JW. An Outbreak of Mayaro Virus Disease in Belterra, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1981;30: 682–688. doi:10.4269/ajtmh.1981.30.682
44. LeDuc JW, Pinheiro FP, Peterson NE, Hoch AL. An Outbreak of Mayaro Virus Disease in Belterra, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1981;30: 689–698. doi:10.4269/ajtmh.1981.30.689
45. Pinheiro FP, Freitas RB, Travassos da Rosa JF, Gabbay YB, Mello WA, LeDuc JW. An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. I. Clinical and virological findings. *Am J Trop Med Hyg.* 1981;30: 674–81. doi:10.4269/ajtmh.1981.30.674
46. Izurieta R, Macaluso M, Watts D, Tesh R, Guerra B, Cruz L, et al. Hunting in the rainforest and mayaro virus infection: An emerging alphavirus in Ecuador. *J Glob Infect Dis.* 2011;3: 317. doi:10.4103/0974-777X.91049
47. Long KC, Ziegler SA, Thangamani S, Hausser NL, Kochel TJ, Higgs S, et al. Experimental Transmission of Mayaro Virus by *Aedes aegypti*. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 2011;85: 750–757. doi:10.4269/ajtmh.2011.11-0359
48. Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa APA, Rodrigues SG, Travassos da Rosa ES, Dégallier N, Travassos da Rosa JFS. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. *Cad Saude Publica.* 2001;17: S155–S164. doi:10.1590/S0102-311X2001000700025
49. Wei LLL, Tom R, Kim YC. Mayaro Virus: An Emerging Alphavirus in the Americas. *Viruses.* 2024;16: 1297. doi:10.3390/v16081297
50. Tesh RB, Watts DM, Russell KL, Damodaran C, Calampa C, Cabezas C, et al. Mayaro Virus Disease: An Emerging Mosquito-Borne Zoonosis in Tropical South America. *Clinical Infectious Diseases.* 1999;28: 67–73. doi:10.1086/515070
51. Leung JY-S, Ng MM-L, Chu JJH. Replication of Alphaviruses: A Review on the Entry Process of Alphaviruses into Cells. *Adv Virol.* 2011;2011: 1–9. doi:10.1155/2011/249640
52. Assunção-Miranda I, Cruz-Oliveira C, Da Poian AT. Molecular Mechanisms Involved in the Pathogenesis of Alphavirus-Induced Arthritis. *Biomed Res Int.* 2013;2013: 1–11. doi:10.1155/2013/973516

53. Camini FC, da Silva TF, da Silva Caetano CC, Almeida LT, Ferraz AC, Alves Vitoreti VM, et al. Antiviral activity of silymarin against Mayaro virus and protective effect in virus-induced oxidative stress. *Antiviral Res.* 2018;158: 8–12. doi:10.1016/j.antiviral.2018.07.023
54. de Castro-Jorge LA, de Carvalho RVH, Klein TM, Hiroki CH, Lopes AH, Guimarães RM, et al. The NLRP3 inflammasome is involved with the pathogenesis of Mayaro virus. *PLoS Pathog.* 2019;15: e1007934. doi:10.1371/journal.ppat.1007934
55. CAVALHEIRO MG, COSTA LS DA, CAMPOS HS, ALVES LS, ASSUNÇÃO-MIRANDA I, POIAN AT DA. Macrophages as target cells for Mayaro virus infection: involvement of reactive oxygen species in the inflammatory response during virus replication. *An Acad Bras Cienc.* 2016;88: 1485–1499. doi:10.1590/0001-3765201620150685
56. Santiago FW, Halsey ES, Siles C, Vilcarromero S, Guevara C, Silvas JA, et al. Long-Term Arthralgia after Mayaro Virus Infection Correlates with Sustained Pro-inflammatory Cytokine Response. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9: e0004104. doi:10.1371/journal.pntd.0004104
57. Santos FM, Dias RS, de Oliveira MD, Costa ICTA, Fernandes L de S, Pessoa CR, et al. Animal model of arthritis and myositis induced by the Mayaro virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13: e0007375. doi:10.1371/journal.pntd.0007375
58. Scroggs SLP, Bird EJ, Molik DC, Nayduch D. Vesicular Stomatitis Virus Elicits Early Transcriptome Response in *Culicoides sonorensis* Cells. *Viruses.* 2023;15: 2108. doi:10.3390/v15102108
59. Rodríguez LL. Emergence and re-emergence of vesicular stomatitis in the United States. *Virus Res.* 2002;85: 211–219. doi:10.1016/S0168-1702(02)00026-6
60. LETCHWORTH GJ, RODRIGUEZ LL, DEL CBARRERA J. Vesicular Stomatitis. *The Veterinary Journal.* 1999;157: 239–260. doi:10.1053/tvjl.1998.0303
61. Schrauwen EJA, Graaf M, Herfst S, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Determinants of virulence of influenza A virus. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* 2014;33: 479–490. doi:10.1007/s10096-013-1984-8
62. Park J, Fong Legaspi SL, Schwartzman LM, Gygli SM, Sheng Z-M, Freeman AD, et al. An inactivated multivalent influenza A virus vaccine is broadly

- protective in mice and ferrets. *Sci Transl Med*. 2022;14. doi:10.1126/scitranslmed.abo2167
63. Liu L, Cooper T, Howley P, Hayball J. From Crescent to Mature Virion: Vaccinia Virus Assembly and Maturation. *Viruses*. 2014;6: 3787–3808. doi:10.3390/v6103787
 64. Krause M, Samolej J, Yakimovich A, Kriston-Vizi J, Huttunen M, Lara-Reyna S, et al. Vaccinia virus subverts xenophagy through phosphorylation and nuclear targeting of p62. *Journal of Cell Biology*. 2024;223. doi:10.1083/jcb.202104129
 65. Bidgood S, Mercer J. Cloak and Dagger: Alternative Immune Evasion and Modulation Strategies of Poxviruses. *Viruses*. 2015;7: 4800–4825. doi:10.3390/v7082844
 66. González-Santamaría J, Campagna M, García MA, Marcos-Villar L, González D, Gallego P, et al. Regulation of Vaccinia Virus E3 Protein by Small Ubiquitin-Like Modifier Proteins. *J Virol*. 2011;85: 12890–12900. doi:10.1128/JVI.05628-11
 67. Oliveira J, Figueiredo P, Costa G, Assis F, Drumond B, Da Fonseca F, et al. Vaccinia Virus Natural Infections in Brazil: The Good, the Bad, and the Ugly. *Viruses*. 2017;9: 340. doi:10.3390/v9110340
 68. Trindade G, Emerson G, Sammons S, Frace M, Govil D, Fernandes Mota B, et al. Serro 2 Virus Highlights the Fundamental Genomic and Biological Features of a Natural Vaccinia Virus Infecting Humans. *Viruses*. 2016;8: 328. doi:10.3390/v8120328
 69. Griffiths P, Reeves M. Pathogenesis of human cytomegalovirus in the immunocompromised host. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19: 759–773. doi:10.1038/s41579-021-00582-z
 70. Wang Y, Mao L, Kankanala J, Wang Z, Geraghty RJ. Inhibition of Human Cytomegalovirus pUL89 Terminase Subunit Blocks Virus Replication and Genome Cleavage. *J Virol*. 2017;91. doi:10.1128/JVI.02152-16
 71. Cudini J, Roy S, Houldcroft CJ, Bryant JM, Depledge DP, Tutill H, et al. Human cytomegalovirus haplotype reconstruction reveals high diversity due to superinfection and evidence of within-host recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019;116: 5693–5698. doi:10.1073/pnas.1818130116

72. Chen S-J, Wang S-C, Chen Y-C. Antiviral Agents as Therapeutic Strategies Against Cytomegalovirus Infections. *Viruses*. 2019;12: 21. doi:10.3390/v12010021
73. Bard JAM, Goodall EA, Greene ER, Jonsson E, Dong KC, Martin A. Structure and Function of the 26S Proteasome. *Annu Rev Biochem*. 2018;87: 697–724. doi:10.1146/annurev-biochem-062917-011931
74. Dahlmann B. Proteasomes. *Essays Biochem*. 2005;41: 31. doi:10.1042/EB0410031
75. Park J, Cho J, Song EJ. Ubiquitin–proteasome system (UPS) as a target for anticancer treatment. *Arch Pharm Res*. 2020;43: 1144–1161. doi:10.1007/s12272-020-01281-8
76. Selvaraju K, Mazurkiewicz M, Wang X, Gullbo J, Linder S, D’Arcy P. Inhibition of proteasome deubiquitinase activity: a strategy to overcome resistance to conventional proteasome inhibitors? *Drug Resistance Updates*. 2015;21–22: 20–29. doi:10.1016/j.drug.2015.06.001
77. Bedford L, Paine S, Sheppard PW, Mayer RJ, Roelofs J. Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. *Trends Cell Biol*. 2010;20: 391–401. doi:10.1016/j.tcb.2010.03.007
78. Collins GA, Goldberg AL. The Logic of the 26S Proteasome. *Cell*. 2017;169: 792–806. doi:10.1016/j.cell.2017.04.023
79. Budenholzer L, Cheng CL, Li Y, Hochstrasser M. Proteasome Structure and Assembly. *J Mol Biol*. 2017;429: 3500–3524. doi:10.1016/j.jmb.2017.05.027
80. Enenkel C. Proteasome dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2014;1843: 39–46. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.03.023
81. Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D. The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci*. 2006;31: 137–155. doi:10.1007/BF02705243
82. Gu ZC, Enenkel C. Proteasome assembly. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014;71: 4729–4745. doi:10.1007/s00018-014-1699-8
83. Collins GA, Goldberg AL. The Logic of the 26S Proteasome. *Cell*. 2017;169: 792–806. doi:10.1016/j.cell.2017.04.023
84. Grice GL, Nathan JA. The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016;73: 3497–3506. doi:10.1007/s00018-016-2255-5

85. Ott DE, Coren L V., Copeland TD, Kane BP, Johnson DG, Sowder RC, et al. Ubiquitin Is Covalently Attached to the p6^{Gag} Proteins of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Simian Immunodeficiency Virus and to the p12^{Gag} Protein of Moloney Murine Leukemia Virus. *J Virol.* 1998;72: 2962–2968. doi:10.1128/JVI.72.4.2962-2968.1998
86. Stadtmueller BM, Hill CP. Proteasome Activators. *Mol Cell.* 2011;41: 8–19. doi:10.1016/j.molcel.2010.12.020
87. Jung T, Catalgol B, Grune T. The proteasomal system. *Mol Aspects Med.* 2009;30: 191–296. doi:10.1016/j.mam.2009.04.001
88. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 1990;63: 1129–1136. doi:10.1016/0092-8674(90)90409-8
89. Ishido S, Wang C, Lee B-S, Cohen GB, Jung JU. Downregulation of Major Histocompatibility Complex Class I Molecules by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus K3 and K5 Proteins. *J Virol.* 2000;74: 5300–5309. doi:10.1128/JVI.74.11.5300-5309.2000
90. Setz C, Friedrich M, Rauch P, Fraedrich K, Matthaei A, Traxdorf M, et al. Inhibitors of Deubiquitinating Enzymes Block HIV-1 Replication and Augment the Presentation of Gag-Derived MHC-I Epitopes. *Viruses.* 2017;9: 222. doi:10.3390/v9080222
91. Karras GI, Colombo G, Kravats AN. Hsp90: Bringing it all together. *Cell Stress Chaperones.* 2025;30: 69–79. doi:10.1016/j.cstres.2025.01.002
92. Sima S, Richter K. Regulation of the Hsp90 system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 2018;1865: 889–897. doi:10.1016/j.bbamcr.2018.03.008
93. Hoter A, El-Sabban ME, Naim HY. The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 2018;19: 2560. doi:10.3390/ijms19092560
94. Neckers L, Workman P. Hsp90 Molecular Chaperone Inhibitors: Are We There Yet? *Clinical Cancer Research.* 2012;18: 64–76. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1000
95. Prodromou C. Mechanisms of Hsp90 regulation. *Biochemical Journal.* 2016;473: 2439–2452. doi:10.1042/BCJ20160005

96. Subbarao Sreedhar A, Kalmár É, Csermely P, Shen Y-F. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett.* 2004;562: 11–15. doi:10.1016/S0014-5793(04)00229-7
97. Li T, Jiang H-L, Tong Y-G, Lu J-J. Targeting the Hsp90-Cdc37-client protein interaction to disrupt Hsp90 chaperone machinery. *J Hematol Oncol.* 2018;11: 59. doi:10.1186/s13045-018-0602-8
98. Geller R, Taguwa S, Frydman J. Broad action of Hsp90 as a host chaperone required for viral replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 2012;1823: 698–706. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.11.007
99. Nam S, Ga YJ, Lee J-Y, Hwang W-Y, Jung E, Shin JS, et al. Radicicol Inhibits Chikungunya Virus Replication by Targeting Nonstructural Protein 2. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021;65. doi:10.1128/AAC.00135-21
100. Goh VSL, Mok C-K, Chu JJH. Antiviral Natural Products for Arbovirus Infections. *Molecules.* 2020;25: 2796. doi:10.3390/molecules25122796
101. Malve H. Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. *J Pharm Bioallied Sci.* 2016;8: 83. doi:10.4103/0975-7406.171700
102. Laurienzo P. Marine Polysaccharides in Pharmaceutical Applications: An Overview. *Mar Drugs.* 2010;8: 2435–2465. doi:10.3390/md8092435
103. Hao C, Xu Z, Xu C, Yao R. Anti-herpes simplex virus activities and mechanisms of marine derived compounds. *Front Cell Infect Microbiol.* 2024;13. doi:10.3389/fcimb.2023.1302096
104. Wang W, Wang S-X, Guan H-S. The Antiviral Activities and Mechanisms of Marine Polysaccharides: An Overview. *Mar Drugs.* 2012;10: 2795–2816. doi:10.3390/md10122795
105. Yi M, Lin S, Zhang B, Jin H, Ding L. Antiviral potential of natural products from marine microbes. *Eur J Med Chem.* 2020;207: 112790. doi:10.1016/j.ejmech.2020.112790
106. Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, Munro MHG, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep.* 2017;34: 235–294. doi:10.1039/C6NP00124F
107. Schulte TW, Akinaga S, Soga S, Sullivan W, Stensgard B, Toft D, et al. Antibiotic radicicol binds to the N-terminal domain of Hsp90 and shares important biologic activities with geldanamycin. *Cell Stress Chaperones.* 1998;3: 100–8. doi:10.1379/1466-1268(1998)003<0100:arbttn>2.3.co;2

108. C. Potts B, X. Albitar M, C. Anderson K, Baritaki S, Berkers C, Bonavida B, et al. Marizomib, a Proteasome Inhibitor for All Seasons: Preclinical Profile and a Framework for Clinical Trials. *Curr Cancer Drug Targets*. 2011;11: 254–284. doi:10.2174/156800911794519716
109. Chen X, Wu X, Li L, Zhu X. Development of Proteasome Inhibitors for Cancer Therapy. *International Journal of Drug Discovery and Pharmacology*. 2024; 100004. doi:10.53941/ijddp.2024.100004
110. Groll M, C. Potts B. Proteasome Structure, Function, and Lessons Learned from Beta-Lactone Inhibitors. *Curr Top Med Chem*. 2011;11: 2850–2878. doi:10.2174/156802611798281320
111. Tang Q, Wu P, Chen H, Li G. Pleiotropic roles of the ubiquitin-proteasome system during viral propagation. *Life Sci*. 2018;207: 350–354. doi:10.1016/j.lfs.2018.06.014
112. Zhang M, Zhang Q, Zhang Q, Cui X, Zhu L. Promising Antiparasitic Natural and Synthetic Products from Marine Invertebrates and Microorganisms. *Mar Drugs*. 2023;21: 84. doi:10.3390/md21020084
113. Marinho M dos S, Ferreira GM, Grosche VR, Nicolau-Junior N, Campos T de L, Santos IA, et al. Evolutionary Profile of Mayaro Virus in the Americas: An Update into Genome Variability. *Viruses*. 2024;16: 809. doi:10.3390/v16050809
114. Mackay IM, Arden KE. Mayaro virus: a forest virus primed for a trip to the city? *Microbes Infect*. 2016;18: 724–734. doi:10.1016/j.micinf.2016.10.007
115. Hotez PJ, Murray KO. Dengue, West Nile virus, chikungunya, Zika—and now Mayaro? *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11: e0005462. doi:10.1371/journal.pntd.0005462
116. Tesh RB, Watts DM, Russell KL, Damodaran C, Calampa C, Cabezas C, et al. Mayaro Virus Disease: An Emerging Mosquito-Borne Zoonosis in Tropical South America. *Clinical Infectious Diseases*. 1999;28: 67–73. doi:10.1086/515070
117. Long KC, Ziegler SA, Thangamani S, Hausser NL, Kochel TJ, Higgs S, et al. Experimental Transmission of Mayaro Virus by *Aedes aegypti*. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2011;85: 750–757. doi:10.4269/ajtmh.2011.11-0359
118. Sagaya Jansi R, Khusro A, Agastian P, Alfarhan A, Al-Dhabi NA, Arasu MV, et al. Emerging paradigms of viral diseases and paramount role of natural

- resources as antiviral agents. *Science of The Total Environment*. 2021;759: 143539. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.143539
119. Campos D, Sugasti-Salazar M, Valdés-Torres P, Galán-Jurado PE, Zegarra D, González-Santamaría J. Differential susceptibility of human microglia HMC3 cells and brain microvascular endothelial HBEC-5i cells to Mayaro and Una virus infection. *Frontiers in Virology*. 2024;3. doi:10.3389/fviro.2023.1325282
120. Lubkowska A, Pluta W, Strońska A, Lalko A. Role of Heat Shock Proteins (HSP70 and HSP90) in Viral Infection. *Int J Mol Sci*. 2021;22. doi:10.3390/ijms22179366

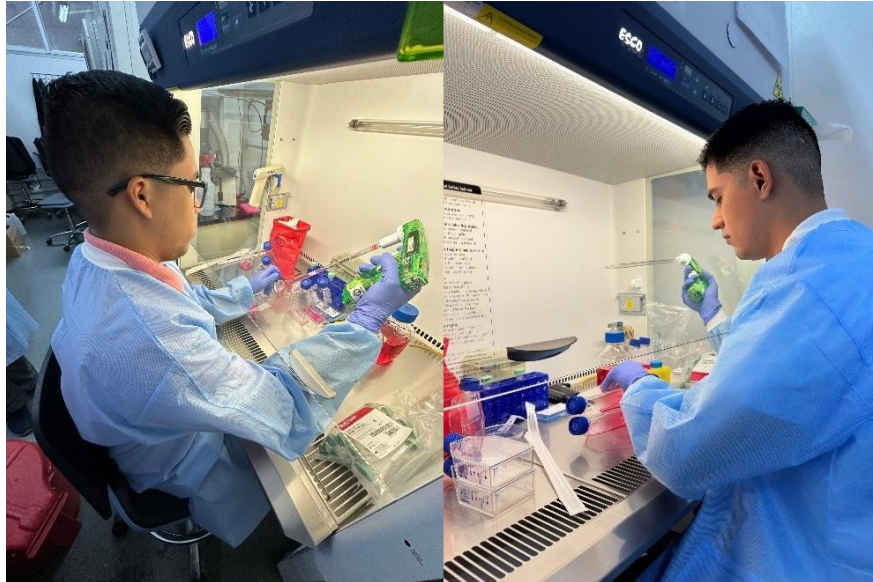
CAPITULO VII

ANEXOS

ANEXO

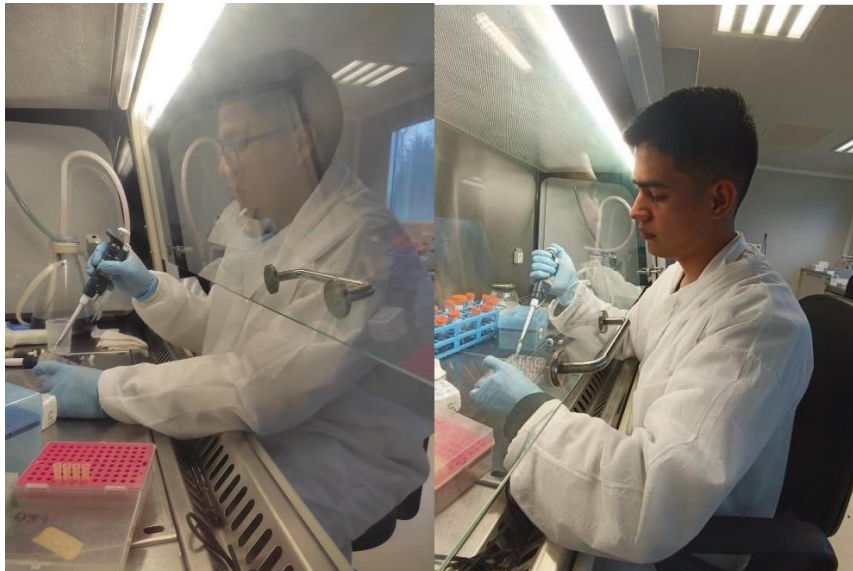
Anexo 1

Trabajo de cultivo celular y ensayos de infección, en el Laboratorio Multiusuarios de investigación del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud.



Anexo 2

Ensayos realizados en el Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMUS) - Universidad de Santiago de Compostela.



Anexo 3

Presentación de resultado en la serie de seminarios de Mecanismos moleculares da enfermidades (MeMoEn) del CiMUS, auspiciado por la Xunta de Galicia.



Anexo 4

Certificación de estancia académica en el Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas, bajo la supervisión de la Dra. Carmen Rivas.



PhD Carmen Rivas
Senior Scientist, CNB-CSIC
CIMUS, Universidad de Santiago de Compostela 15706 Santiago de Compostela
Spain

Santiago de Compostela, 24 de marzo de 2025

A quien pueda interesar:

Por este medio certifico que el estudiante **Félix González Castillo** cédula de identidad personal No. **8-971-2287**, 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 16 de enero de 2025 y terminó el día 14 de marzo del año 2025.

Atentamente,

Dra. Carmen Rivas
Científica Titular, CSIC

PhD Carmen Rivas
Senior Scientist, CNB-CSIC
CIMUS, Universidad de Santiago de Compostela 15706 Santiago de Compostela
Spain

Santiago de Compostela, 24 de marzo de 2025

A quien pueda interesar:

Por este medio certifico que el estudiante **Isaac Tuñón Lorenzo** cédula de identidad personal No. **2-747-1579**, 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 16 de enero de 2025 y terminó el día 14 de marzo del año 2025.

Atentamente,



Dra. Carmen Rivas
Científica Titular, CSIC

Anexo 5

Resultados presentados en la sesión de pósteres en el congreso Pandengue 2025, en Medellín, Colombia. A). De izquierda a derecha (Estudiantes y Asesor Principal). B). Póster presentado en el congreso.

