

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL
“ANÁLISIS DE CINASAS CELULARES Y SU PAPEL EN LA REPLICACIÓN
DEL VIRUS MAYARO”

MADELAINE ESMERALDA SUGASTI SALAZAR

TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR POR
EL TÍTULO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS CON ESPECIALIZACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ
2022

JOSÉ GONZÁLEZ SANTAMARÍA, Investigador de Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudio de la Salud y Profesor del Programa de maestría en Microbiología Ambiental de la Universidad de Panamá.

CERTIFICA QUE: MADELAINE ESMERALDA SUGASTI SALAZAR

Ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis de Maestría, con el título: ANÁLISIS DE CINASAS CELULARES Y SU PAPEL EN LA REPLICACIÓN DEL VIRUS MAYARO

Revisado este trabajo, autoriza su presentación para ser juzgado, y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Panamá el ____ de ____ de ____

Dr. José González Santamaría

DEDICATORIA

Quiero dedicar mi trabajo de tesis a Dios por guiarme en cada paso que doy y de manera especial a mi familia, que han sido el soporte vital que he necesitado durante este proceso.

AGRADECIMIENTO

A mi familia por siempre apoyar mis planes de vida, por escucharme y aconsejarme.

A mi Tutor de Tesis, el Dr. José González Santamaría, por haberme brindado la oportunidad de entrar a su grupo de investigación y apoyarme con su capacidad y conocimiento científico.

Al grupo de trabajo, conformado por chicas maravillosas, gracias por la buena convivencia y el apoyo durante este periodo.

Al Ministerio de Economía y Finanzas (MEF), quien a través del proyecto “Estudio de la patogénesis molecular de Alfavirus y Phlebovirus en Panamá (19911.012), ha financiado parcialmente esta tesis de posgrado.

A la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de Panamá (SENACYT) a través del Programa Nuevos Investigadores (Proyecto 36-2020, Madelaine Sugasti), que financió parcialmente mi tesis.

A la SENACYT que a través del Sistema Nacional de Investigación (SNI) (Contrato 23-2021, José González Santamaría), ha financiado parcialmente esta tesis.

A la Universidad de Panamá y SENACYT por su apoyo a través del Programa de becas de Postgrado (Contrato No 68-2017).

Al Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, por brindarme los espacios de trabajo, lo cual fue fundamental para llevar a cabo mi proyecto de tesis.

Al Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales y al Licdo. Jorge Ceballos por el acceso y apoyo con el microscopio confocal.

ÍNDICE

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN	6
JUSTIFICACIÓN	8
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	9
1. DISTRIBUCIÓN DE MAYV	9
2. TAXONOMÍA, ESTRUCTURA VIRAL Y GENOMA DEL MAYV	10
3. FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE MAYV	11
4. ESTUDIOS FILOGENÉTICOS DEL MAYV	12
<i>Figura 2. Análisis filogenético por máxima verosimilitud entre las cepas del MAYV.</i>	12
5. MECANISMO DE REPLICACIÓN DE MAYV	13
<i>Figura 3. Ciclo de replicación de MAYV.</i>	14
6. PATOGÉNESIS DE MAYV	14
<i>Figura 4. Patogénesis del virus Mayaro.</i>	15
8. MODO DE TRANSMISIÓN	16
9. DIAGNÓSTICO DEL MAYV	17
10. VACUNAS Y TRATAMIENTOS	18
11. PROTEÍNAS CINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPKs) ERK1/2, JNK Y P38	18
12. CASCADA DE SEÑALIZACIÓN CELULAR DE ERK 1/2	19
13. CASCADA DE SEÑALIZACIÓN CELULAR DE JNK1, 2, 3	20
14. CASCADA DE SEÑALIZACIÓN CELULAR DE P38 (A, B, γ , Δ)	21
15. ROL DE LA FAMILIA DE LAS MAPKs EN LA REPLICACIÓN VIRAL	22
16. FAMILIA DE LAS CINASAS PIM	23
17. IMPLICACIÓN DE LA FAMILIA DE LAS CINASAS PIM EN LA REPLICACIÓN VIRAL	24
OBJETIVOS	25
<i>Objetivo General</i>	25
<i>Objetivo Específicos</i>	25
HIPÓTESIS	25
1. CULTIVO CELULAR Y AMPLIFICACIÓN DE CEPAS VIRALES	27
2. CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES	27
3. EFECTO VIRUCIDA	28
4. TRATAMIENTOS CON LOS INHIBIDORES QUÍMICOS	28
<i>Tabla 1. Compuestos químicos que inhiben la actividad de la familia de las MAPKs y de las cinasas PIM.</i>	29
5. EXPERIMENTOS DE TIEMPO DE ADICIÓN DE LOS FÁRMACOS	29
6. INMUNOBLOT Y ANTICUERPOS UTILIZADOS	30
7. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS INHIBIDORES	31
8. INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA MEDIANTE MICROSCOPÍA CONFOCAL	31
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	32
RESULTADOS	35
ANÁLISIS DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS INHIBIDORES DE LAS CINASAS P38, JNK Y ERK EN CÉLULAS DE CULTIVO PRIMARIO FIBROBLASTOS DE PIEL HUMANA (HDFs) Y CÉLULAS HeLa	35
EL INHIBIDOR SB203580 REDUCE LA PRODUCCIÓN DE LA PROGENIE VIRAL DEL MAYV EN HDFs Y CÉLULAS HeLa	36

VIII

<i>Figura 6. La inhibición de p38 con SB203580 disminuye la producción de progenie del MAYV en HDFs y células HeLa.....</i>	<i>37</i>
LA DISMINUCIÓN DE LOS TÍTULOS VIRALES DEL MAYV EN RESPUESTA AL INHIBIDOR SB203580 ES DEPENDIENTE DE LA DOSIS	38
<i>Figura 7. El efecto de SB203580 sobre la producción viral es dependiente de la concentración.</i>	<i>39</i>
LOS COMPUESTOS SB203580, SP600125 Y U0126 NO POSEEN ACTIVIDAD VIRUCIDA CONTRA EL MAYV	39
<i>Figura 8. Los inhibidores de las MAPKs SB203580, SP600125 y U0126 no muestran actividad virucida contra el MAYV.</i>	<i>40</i>
LA INHIBICIÓN INDUCIDA POR EL COMPUESTO SB203580 EN HDFs Y CÉLULAS HELA REDUCE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA ESTRUCTURAL E1 DEL MAYV.....	40
<i>Figura 9. SB203580 afecta la expresión de la proteína E1 estructural del MAYV tanto en HDFs como en células HeLa</i>	<i>41</i>
LA MOLÉCULA PROTACS NR-7H REDUCE LA REPLICACIÓN DEL MAYV AL ELIMINAR LAS ISOFORMAS P38A Y P38B EN HDFs	42
<i>Figura 10. Eliminación de las isoformas p38α y p38β utilizando el compuesto PROTACs NR-7h en HDFs.</i>	<i>44</i>
LOSMAPIMOD, UN INHIBIDOR DE P38 EN EVALUACIÓN CLÍNICA, DISMINUYE LA REPLICACIÓN DEL MAYV EN HDFs	46
<i>Figura 12. El tratamiento con Losmapimod reduce la replicación del MAYV de una manera dependiente de la dosis en HDFs.....</i>	<i>47</i>
PAPEL DE LA FAMILIA DE LAS CINASAS PIM EN LA REPLICACIÓN DEL MAYV	48
EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS HELA O HDFs TRATADOS CON LAS DROGAS PIM1 INH 2 O AZD1208	49
<i>Figura 13. Toxicidad de los compuestos PIM1 inh 2 o AZD1208 en HDFs o células HeLa</i>	<i>49</i>
LOS COMPUESTOS PIM1 INH 2 Y AZD1208 PREVIENEN PARCIALMENTE EL EFECTO CITOPÁTICO INDUCIDO POR EL MAYV Y REDUCEN LA PRODUCCIÓN DE PROGENIE VIRAL EN CÉLULAS HELA Y HDFs	50
<i>Figura 14. Los inhibidores de las cinasas PIM protegen a las células HeLa o HDFs del efecto citopático inducido por el virus y reducen la replicación del MAYV de manera dependiente de la dosis.</i>	<i>51</i>
LOS INHIBIDORES DE LAS CINASAS PIM NO TIENEN EFECTO VIRUCIDA SOBRE EL MAYV	52
<i>Figura 15. Las drogas PIM1 Inh 2 o AZD1208 no efectan directamente al virus Mayaro</i>	<i>52</i>
EL EFECTO ANTIVIRAL DE LOS INHIBIDORES DE LAS CINASAS PIM ES INDEPENDIENTE DE LA CEPA DEL MAYV EVALUADA	53
<i>Figura 16. El efecto inhibitorio de las drogas que bloquean a las cinasas PIM, es independiente de la cepa de MAYV.....</i>	<i>54</i>
LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL COMPUESTO PIM1 INH 2 O AZD1208 SUPRIME LA REPLICACIÓN DEL MAYV EN UNA ETAPA TARDÍA DESPUÉS DE LA ABSORCIÓN VIRAL	54
<i>Figura 17. La inhibición de las cinasas PIM afecta la replicación del MAYV en una etapa tardía después de la absorción viral</i>	<i>55</i>
LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA ESTRUCTURAL E1 Y NO ESTRUCTURAL NSP1 DE MAYV, SE REDUCE EN PRESENCIA DE LOS INHIBIDORES DE LAS CINASAS PIM	55
<i>Figura 18. Los inhibidores de las cinasas PIM reducen la expresión de las proteínas E1 y nsP1 del MAYV</i>	<i>57</i>
LOS INHIBIDORES DE LAS CINASAS PIM REDUCEN TAMBIÉN LA REPLICACIÓN DE LOS VIRUS EMERGENTES UNA (UNAV) Y ZIKA (ZIKV)	57
<i>Figura 19. Los inhibidores de las cinasas PIM también bloquean la replicación de los arbovirus emergentes UNAV y ZIKV.....</i>	<i>58</i>
DISCUSIÓN	60
CONCLUSIONES.....	67
RECOMENDACIONES.....	69
BIBLIOGRAFÍA.....	70
ANEXOS.....	88

ANEXO 1	89
FOTOGRAFÍAS ILUSTRATIVAS DEL TRABAJO REALIZADO EN EL LABORATORIO MULTIUSUARIOS DEL INSTITUTO CONMEMORATIVO DE ESTUDIOS DE LA SALUD	89
ANEXO 2	90
PUBLICACIONES	90
COMO PRODUCTO DEL TRABAJO DE TESIS, SE OBTUVO LOS SIGUIENTES ARTÍCULOS:	90
1. INHIBITION OF P38 MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE IMPAIRS MAYARO VIRUS REPLICATION IN HUMAN DERMAL FIBROBLASTS AND HELa CELLS	90
2. TARGETING HOST PIM PROTEIN KINASES REDUCES MAYARO VIRUS REPLICATION.....	90

RESUMEN

El virus Mayaro (MAYV) secuestra la maquinaria celular del huésped para replicarse de manera efectiva. Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) p38, JNK y ERK1/2 y la familia de cinasas PIM, han surgido como factores celulares cruciales implicados en diferentes etapas del ciclo viral. Sin embargo, aún no se ha determinado si MAYV y otros arbovirus, utilizan estas enzimas para replicar de manera competente. El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de la inhibición de las MAPKs y de las cinasas PIM en la replicación de MAYV y otros arbovirus, utilizando fibroblastos dérmicos humanos de cultivo primario (HDFs), células HeLa o Vero. La producción de partículas virales en sobrenadantes de células infectadas y tratadas o no con los inhibidores SB203580, SP600125, U0126, Losmapimod, NR-7h, Pim1 Inh 2 o AZD1208, se cuantificaron mediante el ensayo de formación de placas. Además, la expresión de las proteínas virales se analizó mediante inmunoblot e inmunofluorescencia. Se observó que SB203580, un inhibidor de p38, redujo la replicación de MAYV de manera dependiente de la dosis tanto en HDFs como en células HeLa. Además, SB203580, disminuyó significativamente la expresión de la proteína viral E1. De manera similar, la eliminación o inhibición de las isoformas p38 α /p38 β con NR-7h o Losmapimod, respectivamente, afectó la replicación de MAYV de manera dependiente de la dosis. Interesantemente, la inhibición de las cinasas PIM previno parcialmente el daño celular inducido por MAYV y también promovió una disminución en los títulos virales de MAYV, UNAV y ZIKV. Finalmente, la inhibición de la cinasa PIM redujo la expresión de las proteínas E1 y nsP1 de MAYV. En conjunto, estos hallazgos sugieren que tanto p38 como las cinasas PIM, podrían desempeñar un papel importante en la replicación viral y servir como objetivos terapéuticos para controlar la infección por MAYV.

Palabras Clave: MAYV, proteínas cinasas, inhibición de las MAPK, cinasas PIM, inhibidores.

ABSTRACT

Mayaro virus (MAYV) hijacks the host's cellular machinery to effectively replicate. The mitogen-activated protein kinases (MAPKs), specifically p38, JNK and ERK1/2, and the PIM kinase family have emerged as crucial cell factors implicated in different stages of the viral cycle. However, whether MAYV and other arboviruses use these enzymes to replicate remains to be determined. The aim of this study was to evaluate the impact of MAPK or PIM kinase inhibition on the replication of MAYV and other arboviruses using primary human dermal fibroblasts (HDFs), HeLa and Vero cells. Viral yields in the supernatants of infected cells treated with the inhibitors SB203580, SP600125, U0126, Losmapimod, NR-7h, Pim1 Inh 2 or AZD1208 were quantified using plaque forming assays and compared to those of untreated cells. Additionally, viral protein expression was analyzed by immunoblot and immunofluorescence. SB203580, a p38 inhibitor, reduced MAYV replication in a dose-dependent manner in both HDFs and HeLa cells, while SB203580 significantly decreased the expression of the viral E1 protein. Similarly, knockdown or inhibition of the p38 α /p38 β isoforms with NR-7h or Losmapimod, respectively, resulted in a dose-dependent reduction in MAYV replication. Interestingly, PIM kinase inhibition partially prevented MAYV-induced cell damage and promoted a decrease in MAYV, UNAV, and ZIKV viral titers. Moreover, PIM kinase inhibition decreased the expression of MAYV E1 and nsP1 proteins. Taken together, these findings suggest that both p38 and PIM kinases could play an important role in viral replication and serve as therapeutic targets to control MAYV infection.

Keywords: MAYV, protein kinases, MAPK inhibition, PIM kinases, inhibitors.

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN Y FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

INTRODUCCIÓN

El virus Mayaro (MAYV) fue aislado por primera vez en Trinidad y Tobago en la región del Condado de Mayaro en el año 1954, a partir de muestras de trabajadores que presentaban síntomas febriles. Desde entonces, el virus Mayaro se ha ido expandiendo a distintas zonas de América Latina y el Caribe, Norte y Sur América. Además, algunos países de Europa han reportado casos importados procedentes de América (*Muñoz et al., 2012; Lorenz et al., 2017; L. T. M. Figueiredo y Figueiredo, 2015; Anderson et al., 1957; Caicedo et al., 2021; Hassing et al., 2010*)

El MAYV es un arbovirus emergente que pertenece al género *Alfavirus* (familia *Togaviridae*). Este virus se agrupa dentro del complejo antigénico Semliki Forest, que incluye otros virus de gran relevancia en salud pública, entre ellos los virus Chikungunya (CHIKV), Getah (GETV), Ross River (RRV), O'nyong-nyong (ONNV), Bebaru (BEBV) y Una (UNAV) (Esposito y Fonseca, 2017). El genoma de MAYV es una molécula de ARN de cadena positiva, que contiene dos marcos de lectura abierto (ORF), los cuales codifican para proteínas estructurales y no estructurales (Strauss y Strauss, 1994).

La transmisión del virus ocurre en un ciclo enzoótico, el cual incluye varios hospederos (mamíferos) y uno o varios vectores. No obstante, su principal vector son mosquitos del género *Haemagogus* sp., aunque se han aislado cepas del MAYV en mosquitos de otros géneros (*Morales et al., 1961; Muñoz et al., 2012*). Existen evidencias que especies urbanas de mosquitos tales como, *Aedes aegypti* o *A. albopictus*, son competentes para transmitir MAYV (*Glushakova et al., 2018*). Por otra parte, debido a su homología con CHIKV existe la posibilidad de adaptación natural a vectores urbanos, lo que traería consigo su posible expansión geográfica como ocurrió en su momento con los virus Zika (ZIKV) y CHIKV en las Américas (*Hotez y Murray, 2017*).

El MAYV produce la enfermedad conocida como fiebre de Mayaro. Esta se caracteriza por el desarrollo de síntomas inespecíficos, que incluyen: fiebre, mialgia, cefalea, erupción cutánea, artralgia, vómitos y diarrea. De manera

general, estos síntomas duran en promedio de 3 a 5 días y en algunas ocasiones, puede provocar una poliartralgia persistente (*Assunção-Miranda et al., 2013; Tesh et al., 1999*). A pesar de que el MAYV es considerado un patógeno emergente, este ha sido pobremente caracterizado y el conocimiento sobre los mecanismos de patogénesis, tropismo celular y biología del virus son prácticamente desconocidos. Por otro lado, no existen tratamientos o vacunas aprobadas para combatir estas infecciones.

MAYV al igual que otros virus, es un patógeno intracelular obligado que necesita utilizar la maquinaria del huésped para poder replicar con éxito (*Carvalho et al., 2017; Barroso et al., 2002*). En este sentido, existen evidencias que indican que las cinasas son factores celulares claves para la replicación de un amplio rango de virus tanto de ARN como de ADN, y se ha propuesto que la inhibición química de estas proteínas, podría representar una estrategia terapéutica antiviral (*Keck et al., 2015; Keating y Striker, 2012*).

Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) controlan las vías de transducción de señales que regulan actividades celulares esenciales, incluida la proliferación, el crecimiento, la diferenciación, la producción de citocinas, la motilidad, la respuesta al estrés, la supervivencia y la apoptosis. Las MAPKs clásicas incluyen a p38, c-Jun N-terminal cinasa (JNK) y cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2), que en conjunto, modulan programas específicos de expresión génica, lo que permite que las células se adapten a diferentes condiciones fisiológicas (*Plotnikov et al., 2011*). Estudios previos han demostrado que virus de varias familias son capaces de explotar la actividad de las MAPKs para favorecer su replicación (*Cheng et al., 2020; Brunetti et al., 2018; Voss et al., 2014 Rahaus et al., 2004*).

Los sitios de Integración Proviral del virus de la leucemia murina de Moloney (PIM) son una familia de serina/treonina cinasas con actividad constitutiva que consta de tres miembros: PIM1, PIM2 y PIM3 (*Santio y Koskinen, 2017*). Las cinasas PIM regulan la proliferación, supervivencia, metabolismo y migración en diferentes líneas celulares a través de la fosforilación de múltiples

sustratos. Su actividad aberrante se ha observado principalmente en neoplasias malignas hematológicas, así como en tumores sólidos, incluidos los tumores de próstata, páncreas y colon (*Wu et al., 2021; Santio y Koskinen, 2017*). Además, la sobreexpresión de los miembros de las cinasas PIM se ha asociado con un mal pronóstico en pacientes con cáncer (*Stafman et al., 2019*). Por lo tanto, estas enzimas se han convertido en un objetivo atractivo para el desarrollo de fármacos oncológicos en la industria farmacéutica y algunos de estos compuestos han sido evaluados en distintas fases de ensayos clínicos (*Toth y Warfel, 2021; Zhang et al., 2018b*). Varias líneas de evidencia sugieren que las cinasas PIM podrían ser un factor proviral para virus de distintas familias y pueden actuar a través de varios mecanismos (*Pereiro et al., 2020; de Vries et al., 2015; Park et al., 2015a; Rainio et al., 2005*).

Las observaciones previas indican que las MAPKs y la familia de cinasas PIM, podrían ser factores importantes implicados en la replicación viral y actuar como objetivos antivirales potenciales. Sin embargo, aún no se ha investigado si MAYV es capaz de manipular estas vías para replicarse de manera competente.

Justificación

Hasta la fecha no hay tratamientos ni vacunas aprobados para combatir la infección por MAYV. Por otro lado, no existen estudios previos evaluando el papel de las MAPKs p38, JNK o ERK1/2 y el grupo de las cinasas PIM en la replicación de este virus. Además, se requieren investigaciones dirigidas a identificar vías de señalización celular o factores celulares importantes en la replicación de MAYV, ya que estos podrían representar posibles dianas farmacológicas.

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1. Distribución de MAYV

Las enfermedades tropicales desatendidas causadas por arbovirus representan un constante reto para las autoridades de salud pública. La infección producida por MAYV, muchas veces no se logra diferenciar a nivel clínico y es comúnmente asociado con otras arbovirosis (*Mackay y Arden, 2016; LaBeaud, 2008*). Los primeros reportes que muestran evidencias de la circulación del MAYV, se obtuvieron a partir de muestras recolectadas durante la construcción del Canal de Panamá, entre los años 1904 y 1914 (*Srihongse et al., 1974*). No obstante, el MAYV se aisló por primera vez en 1954 en sueros de pacientes que presentaban síntomas febriles en la región del Condado de Mayaro, en Trinidad y Tobago (*Anderson et al., 1957*). A partir de este período, existen evidencias serológicas de la circulación de MAYV en países como Bolivia, Venezuela, Haití, Guyana, Surinam, Panamá, Costa Rica, Guatemala, México y en la cuenca del río Amazonas, donde el reporte de casos ha sido mayor, incluyendo países como Perú, Ecuador y Brasil, donde el virus es endémico en varias regiones (*Caicedo et al., 2021; Figueiredo y Figueiredo, 2015; Munoz-Jordan, 2017; Muñoz et al., 2012; Anderson et al., 1957*). Aunque la transmisión activa del MAYV en zonas urbanas no se ha identificado, un estudio publicado en el año 2015 arrojó datos de la introducción del MAYV en zonas suburbanas de Haití. Seguido a esto, se logró notificar por parte de las autoridades de Guyana Francesa, sobre la presencia del MAYV, en muestras de habitantes de zonas urbanas, durante los años 2017 y 2019 (*World Health Organization, 2021; Blohm et al., 2019; Pan American Health Organization y World Health Organization, 2019*). Por otra parte, en Europa se han identificado casos importados de viajeros procedentes de las Américas a partir del año 2008, muchos de los cuales visitaron zonas endémicas y de vuelta a su país de origen, presentaron síntomas febriles. (*Llagonne-Barets et al., 2016; Theilacker et al., 2013; Hassing et al., 2010*). Hasta la fecha, no existe información sobre la presencia del MAYV en otros continentes. Sin embargo, se

cree que este virus es un agente potencial para causar futuras epidemias (*Caicedo et al., 2021*).

2. Taxonomía, estructura viral y genoma del MAYV

El MAYV pertenece al complejo antigénico Semliki Forest dentro del género *Alfavirus*, junto con otros 7 virus: CHIKV, BEBV, GETV, Semliki Forest (SFV), RRV, ONNV y UNAV. Este grupo de virus tiene una gran homología en las proteínas de superficie, lo cual produce una reactividad cruzada entre las especies al realizar análisis en sueros inmunes (*Henss et al., 2019; Strauss y Strauss, 1994*). El MAYV forma parte de la familia *Togaviridae* y son un grupo de virus envueltos en una nucleocápside icosaédrica que mide aproximadamente 69 ± 2.3 nanómetros de diámetro, la envoltura está recubierta de una bicapa lipídica y glicoproteínas derivadas del huésped que le confieren estabilidad al virus, encapsulando su material genético. Su genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva, contiene aproximadamente 11429 nucleótidos, sin incluir la cola poli de adenina, que a su vez conforman dos marcos de lectura abierto (ORF). El primer ORF (5' proximal) con 7,386 nucleótidos, que inicia con el codón ATG y termina con el codón de parada TAG, se traduce en una poliproteína de 2,436 aminoácidos (P1234), que una vez procesada, da lugar a las proteínas no estructurales (nsP1, nsP2, nsP3 and nsP4), encargadas de la síntesis de ARN viral en el huésped; el segundo ORF (3'proximal) con 3,756 nucleótidos, se traduce a partir del ARNm 26S en la región subgenómica, codificando para una poliproteína de 1,252 aminoácidos que genera las proteínas estructurales de la cápside (C), proteínas de envoltura (E1 y E2) y dos pequeños polipéptidos (E3 y 6k). Dichas proteínas permiten el ensamblaje viral dentro del hospedero, una vez el virus ha replicado (*de Figueiredo y Figueiredo, 2014; De-Simone, 2014; Paul y Bartenschlager, 2013; Lavergne et al., 2006; Khan et al., 2002; Strauss y Strauss, 1994*) (Fig. 1).

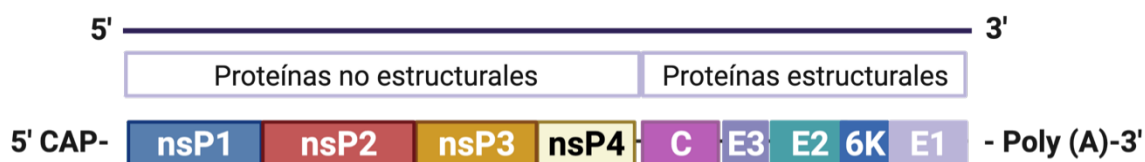


Figura 1. Organización del genoma del virus Mayaro. Adaptado de (*Powers et al., 2001*), figura creada con BioRinder.com

3. Función de las proteínas de MAYV

nsP1 es la única proteína no estructural del MAYV que se asocia a la membrana celular, además, está involucrada en procesos de transcripción y síntesis del genoma mediante metilación de los extremos terminales gracias a su actividad metiltransferasa y guanililtransferasa (*De-Simone, 2014; Lavergne et al., 2006*). El dominio N-terminal de nsP2 posee actividad helicasa, la cual escinde en sitios específicos de la poliproteína y es funcional durante la transcripción y replicación viral (*Ferreira et al., 2000; Strauss y Strauss, 1994*). Estudios previos sugieren que la proteína nsP3 podría desempeñar un rol importante en la transferencia de elementos virales. Sin embargo, su función no está del todo definida (*Parrott et al., 2009*). La actividad polimerasa dependiente de ARN viral de nsP4 permite que se de la replicación del MAYV, en la célula a la cual infecta (*Leung et al., 2011*). Existe una relación entre la proteína E1 y E2 del MAYV, ya que ambas están implicadas en procesos de fusión, en este sentido, la proteína E2 está asociada a los receptores celulares del huésped e involucra procesos de absorción, una vez se da el reconocimiento en la superficie celular, la proteína viral de clase II, E1, promueve la fusión de la membrana endosomal del huésped con la envoltura viral (*Gould et al., 2010*). Estudios sugieren que la proteína E3 se asocia a las proteínas de fusión E1 y E2, proporcionándoles estabilidad y a su vez, contribuye en la traducción del genoma viral (*Parrott et al., 2009; Powers et al., 2006*). La proteína de cápside (C), es la encargada del ensamblaje del virión maduro (*Skoging y Liljeström, 1998*). Finalmente, el segmento corto 6K, que es derivado de la membrana celular, favorece el proceso de gemación de viriones maduros y la permeabilización celular (*Strauss y Strauss, 1994*).

4. Estudios filogenéticos del MAYV

Hasta la fecha, se han reportado 59 secuencias de genoma completo de aislados de MAYV que infectan humanos y seis secuencias de aislados en mosquitos (Fig. 2). Todos ellos se agrupan en tres genotipos: el primer genotipo designado fue el D, ampliamente distribuido en Trinidad y Tobago, Perú, Guyana, Venezuela, Surinam, Bolivia y Brasil, el cual agrupa secuencias altamente conservadas; seguido del genotipo limitado L, que ha sido encontrado en zonas de Brasil y Haití, el cual mostró mayor divergencia al ser comparado con el genotipo anterior y finalmente, el genotipo N, el cual mostró secuencias intermedias entre el genotipo D y L, presente únicamente en Perú (*Caicedo et al., 2021; Auguste et al., 2015*)

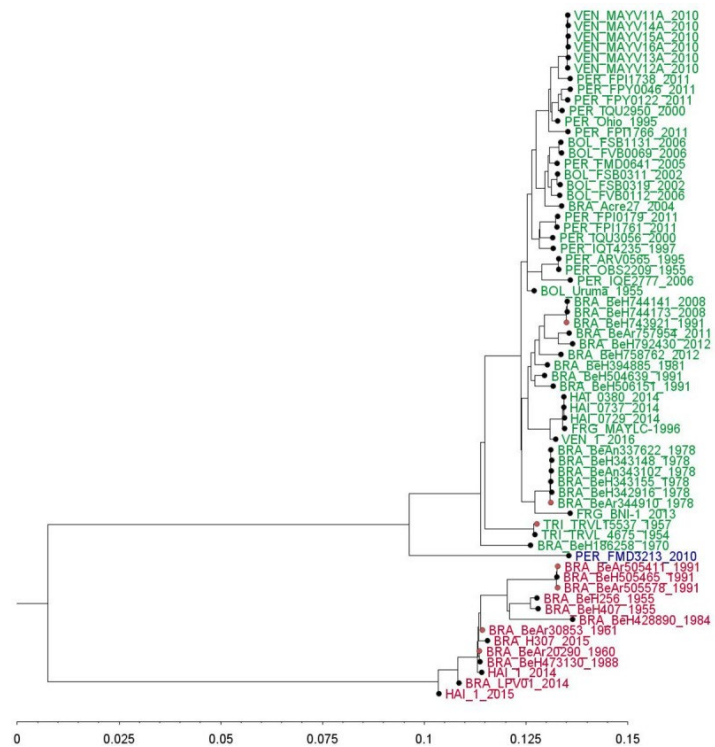


Figura 2. Análisis filogenético por máxima verosimilitud entre las cepas del MAYV. Los genotipos se caracterizaron en: D (color verde), N (color azul) y L (color rojo). Sus orígenes: puntos rosas (aislado de mosquitos), puntos negros (aislado de humanos) Adaptado de (*Caicedo et al., 2021*).

5. Mecanismo de replicación de MAYV

La entrada de MAYV a la célula huésped está mediada por receptores celulares de superficie como el receptor MXRA8, utilizado por varios *Alphavirus* (Zhang et al., 2018). A través de la vía endocítica, ocurre la fusión de la membrana endosomal con la partícula viral. En esta reacción fusogénica se forman endosomas tempranos, lo que representa una ventaja para el virus, ya que logra evitar la actividad de las hidrolasas ácidas de clatrina. Una fracción del MAYV se fusiona con Rab5⁺, favoreciendo la entrada del virus al citosol. No obstante, el MAYV, utiliza de forma alterna, vesículas derivadas de caveolas ricas en colesterol para la liberación del genoma viral al citoplasma (Carvalho et al., 2017). Luego de la liberación de la nucleocápside, los ribosomas se unen al ARN genómico de sentido positivo, el cual es traducido en proteínas no estructurales, que permiten la síntesis y transcripción del ARN genómico de sentido negativo, y al ARNm subgenómico, dando lugar a las proteínas estructurales que permiten el ensamblaje de las estructuras virales inmaduras en el retículo endoplasmático. Posteriormente, dichos viriones inmaduros, atraviesan el aparato de Golgi, para formar partículas virales maduras, que mediante gemación, serán liberadas al espacio extracelular, a través del mecanismo de exocitosis (Fig. 3). (De-Simone, 2014; Torres et al., 2004; Ferreira et al., 2000; Strauss y Strauss, 1994).

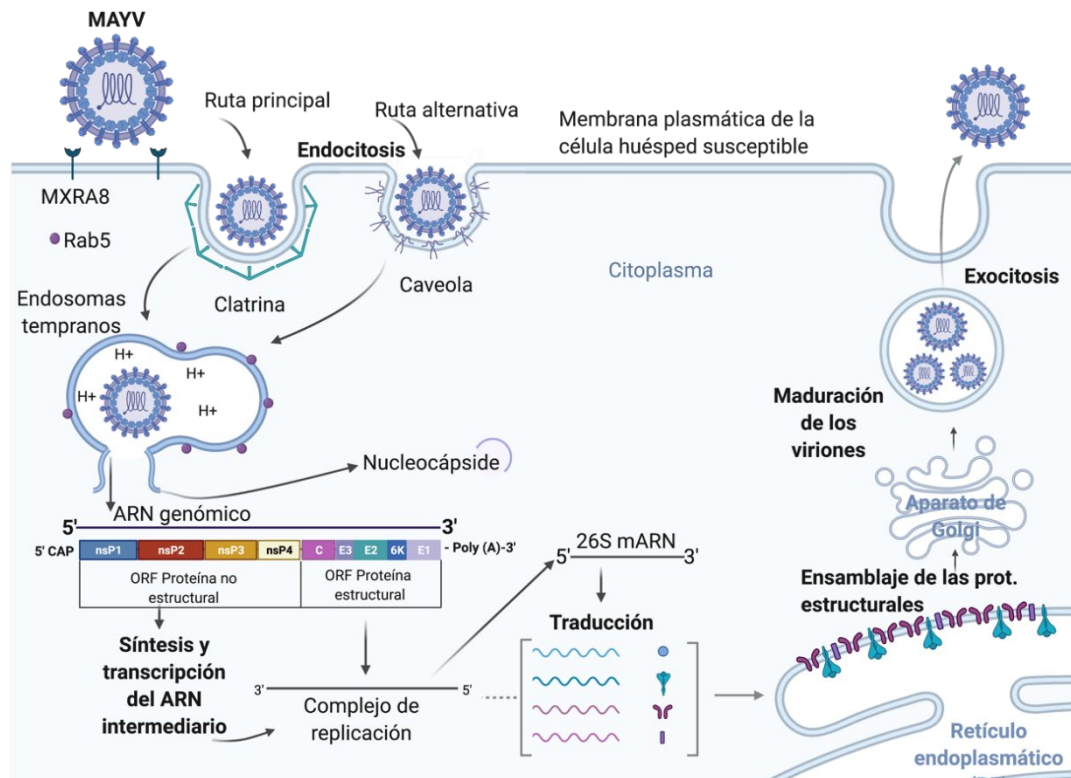


Figura 3. Ciclo de replicación de MAYV. Adaptado de (Diagne et al., 2020), figura creada con BioRinder.com

6. Patogénesis de MAYV

El MAYV, al igual que otros arbovirus, es capaz de infectar vertebrados e invertebrados (Leung et al., 2011). La infección inicia con la entrada del virus a la célula a través de la picadura de un mosquito infectado (Azar et al., 2020). Este Alfavirus es transportado, a través de vasos linfáticos y microvasculatura donde los viriones fusionados a endosomas tempranos o a monocitos, viajan en sangre hasta los órganos dianas (bazo e hígado), donde se da la mayor producción de progenie viral (Assunção-Miranda et al., 2013). Luego, el MAYV es diseminado hacia las regiones del músculo, tejido óseo y articulaciones. Ésta última zona, se asocia con la fase aguda de la enfermedad, ya que se ha descrito una fuerte respuesta inflamatoria producida, que induce la expresión de factores tales como, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y estrés oxidativo, que conlleva el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) en modelos celulares y

animales (Fig. 4). (de Castro-Jorge *et al.*, 2019; Camini *et al.*, 2017; Cavaleiro *et al.*, 2016; Dupuis-Maguiraga *et al.*, 2012). Adicional, se da la producción de citocinas proinflamatorias y mediadores (MCP-1, IL-2, IL-9, IL-13, IL-7, VEGF, IL-17 e IP-10) en humanos y murinos, como producto de la respuesta inmune innata que se genera (Santos *et al.*, 2019; Santiago *et al.*, 2015). Para conocer si existe una asociación entre el curso de una infección por Alfavirus y la artritis reumatoide, múltiples investigadores han mostrado que algunas citocinas secretadas, coinciden en ambas condiciones y que existen similitudes en los genes que se están *modulando* (Assunção-Miranda *et al.*, 2013; Suhrbier y Mahalingam, 2009; Bouquillard y Combe, 2009). Es importante tomar en cuenta que la patogénesis de la infección por Alfavirus, va a depender de factores tales como: el estado del sistema inmune del organismo que se infecta, la virulencia de la cepa viral, la edad del huésped y la capacidad que tenga el virus de infectar (Suhrbier *et al.*, 2012; Gardner *et al.*, 2010).

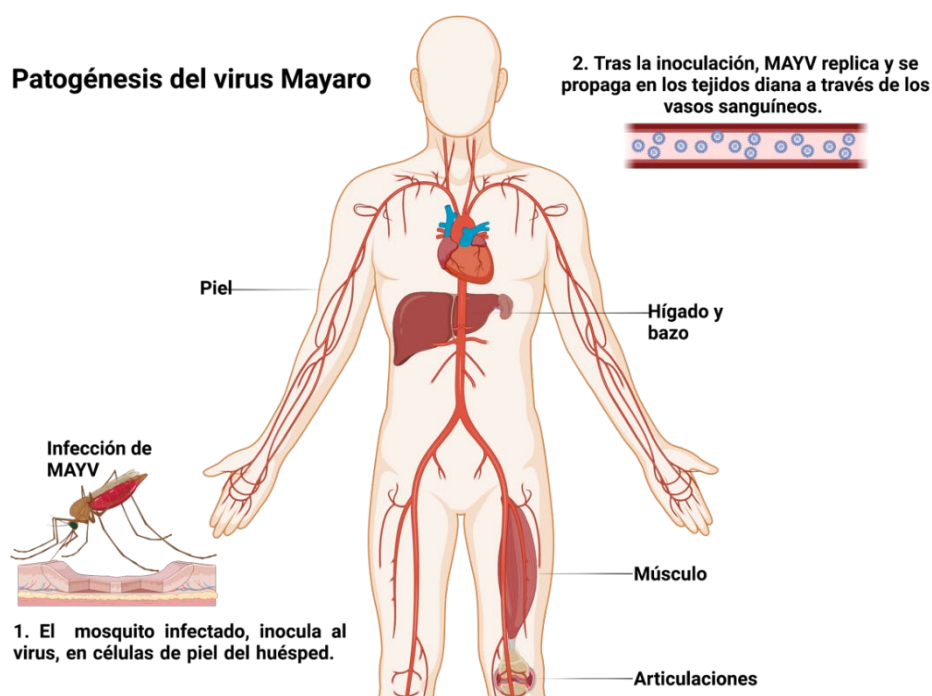


Figura 4. Patogénesis del virus Mayaro. Adaptado de (Diagne *et al.*, 2020) figura creada con BioRinder.com

7. Manifestaciones clínicas

Los síntomas producidos por la infección del MAYV son comúnmente inespecíficos y debilitantes. Su periodo de incubación oscila entre 7 a 12 días, hasta que aparecen los primeros síntomas (*Acosta-Ampudia et al., 2018; Pinheiro et al., 1981*). Varios trabajos han descrito dichos síntomas, tomando en cuenta la fase aguda que tiene una duración de 3 a 5 días, la cual puede incluir fiebre persistente, escalofríos, artralgia, mialgia, dolor retroorbital, diarrea, vómitos, dolor de cabeza, exantema o erupción cutánea, generalmente en brazos, espalda y piernas, náuseas o leucopenia (*Aguilar-Luis et al., 2020; Tesh et al., 1999*). En algunos casos, se ha logrado distinguir la fiebre causada por Mayaro, ya que podría tener una duración de diez días y luego reaparecer de forma intermitente (*McGill, 1995*). Algunos investigadores han descrito una poliartralgia persistente durante varios meses, la cual podría traer consigo complicaciones más graves que involucran enfermedades neurológicas, miocarditis o casos letales (*Santiago et al., 2015; Chen y Lang, 2013*). Mourão y su grupo reportaron en 2015, episodios hemorrágicos espontáneos en cuatro pacientes, aunque son casos raros que no han vuelto a ser identificados (*Mourão et al., 2012*).

8. Modo de transmisión

El ciclo de transmisión del MAYV ocurre en ambientes selváticos, en donde se encuentra su vector principal, el mosquito *Haemagogus janthinomys* y uno o varios reservorios mamíferos, entre ellos primates no humanos (considerados los hospederos primarios), roedores y aves (*Thoisy et al., 2003; Vasconcelos et al., 2001; Pinheiro et al., 1981*). La aparición de enfermedades transmitidas por vectores se ve influenciada por factores como la temperatura, las temporadas lluviosas, la cercanía de las ciudades a zonas rurales, la destrucción de zonas boscosas y sumado a ello, la fácil adaptación de los virus a nuevos hospederos debido a su alta tasa de mutación, lo que representa un tema de gran preocupación, puesto que estas alteraciones son propicias para que se dé la propagación de un virus como el MAYV (*Vasconcelos et al., 2001*). Hasta la fecha,

los brotes del MAYV han sido pocos, debido a que su vector principal está limitado a zonas boscosas, donde la infección en humanos es poco común (*Abad-Franch et al., 2012*). No obstante, varios experimentos de laboratorio sugieren que los mosquitos urbanos, tales como *Aedes aegypti* o *Aedes albopictus*, son competentes para propagar este virus, ya que, además, el virus modula proteínas de los mosquitos para favorecer su propagación (*Vasconcellos et al., 2020; Long et al., 2011*). En consecuencia, existe una preocupación creciente sobre el potencial del MAYV para causar una epidemia a mayor escala similar a otros arbovirus, como el CHIKV o el ZIKV (*Esposito y Fonseca, 2017; Rodríguez-Morales et al., 2017; Mackay y Arden, 2016*). El único modo de transmisión del MAYV descrito en la actualidad, sigue siendo el vectorial, sin embargo, se desconoce si existen otros tipos de transmisión.

9. Diagnóstico del MAYV

Para la detección del MAYV, se han ido explorando distintas técnicas, entre ellas, el uso de métodos virológicos como el aislamiento viral, en donde, a través de cultivo celular (células Vero, por ejemplo) se busca aumentar la concentración de partículas virales, en caso de que las muestras hayan sido obtenidas en etapas tempranas de la infección, donde el título viral es relativamente bajo. No obstante, es un método poco utilizado para diagnóstico (*Pan American Health Organization y World Health Organization, 2019; Sakuma et al., 2018*). En consecuencia, los métodos moleculares han sido ampliamente utilizados para la detección de los Arbovirus, incluyendo al MAYV, ya que estos tienen una alta especificidad y sensibilidad de detección del genoma viral, incluso en etapas tempranas de la viremia. Para ello, se han implementado pruebas de RT-PCR en tiempo real, RT-PCR múltiple y RT-PCR combinada con ELISA (*FG et al., 2017; Wang et al., 2006; Bronzoni et al., 2004; Pfeffer et al., 1997*). Por último, las pruebas serológicas, han permitido detectar la respuesta a la infección por el MAYV, al evaluar los niveles de anticuerpos IgM (que pueden estar presentes 72 h post infección) e IgG (que pueden perdurar años). Las pruebas serológicas más utilizadas son: inhibición de

la hemaglutinación (HI), fijación del complemento (CF), ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas de captura de IgM (MAC-ELISA), inmunoensayo enzimático utilizando células infectadas como antígenos (EIA-ICC) y la prueba de neutralización (NT) que es la prueba serológica estándar para diagnosticar Alfavirus (*Acosta-Ampudia et al., 2018; Juárez et al., 2013; Greiser-Wilke et al., 1991; Truyen y Kaaden, 1990; Greiser-Wilke et al., 1989*).

10. Vacunas y tratamientos

Hasta la fecha no existen vacunas ni tratamientos aprobados comercialmente contra el MAYV. No obstante, varios grupos han investigado y descrito potenciales medicinas para combatir la infección causada por el MAYV. En este sentido, Barroso y sus colegas observaron que el MAYV activa la proteína caseína cinasa 2 en una etapa temprana de la infección en células Vero y que la inhibición química de esta cinasa, disminuye el efecto citopático que induce la infección por MAYV (*Barroso et al., 2002*). Después, otro grupo demostró que los derivados de tienopiridina tienen un efecto antiviral en etapas tempranas y tardías de la infección (*Amorim et al., 2017*). Además, nuestro laboratorio mostró que los inhibidores del proteasoma MG132 y Lactacistina, disminuyen la replicación de MAYV de una manera dependiente de la dosis, lo que sugiere que el sistema ubiquitina-proteasoma juega un papel esencial en la replicación del MAYV (*Llamas-González et al., 2019*). En cuanto al desarrollo de vacunas, distintos grupos han publicado estudios sobre posibles candidatos de vacunas de virus atenuados, vacunas de ADN, vacunas inactivadas, entre otras, que podrían ser prospectos interesantes para utilizar contra MAYV (*Powers et al., 2021; Choi et al., 2019; Weise et al., 2014*). Pese a esto, existe la necesidad de continuar buscando posibles tratamientos para combatir este patógeno.

11. Proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) ERK1/2, JNK y p38

Las MAPKs (ERK1/2, JNK 1-2-3 y p38 α , β , γ , δ) son una familia de serina/treonina cinasas evolutivamente conservadas, que modulan la actividad de

diferentes sustratos, a través de estímulos extracelulares que promueven la activación de cascadas de señalización, controlando así, procesos celulares que en algunos casos, activan factores de transcripción que se traslocan al núcleo y regulan así, la expresión de diferentes genes en respuesta a cambios en el entorno celular. La proliferación celular, diferenciación, motilidad, apoptosis, el metabolismo, la plasticidad sináptica, entre otros, son algunas de las respuestas celulares controladas por las MAPKs (*Zehorai et al., 2010; Keshet y Seger, 2010; Yoon y Seger, 2009; Turjanski et al., 2007; Zhang y Liu, 2002*). Las cinasas reguladas por señales extracelulares se activan cuando se fosforilan sus residuos específicos en el sitio catalítico, lo que asegura una respuesta celular correcta.

12. Cascada de señalización celular de ERK 1/2

Las cinasas ERK1/2 fueron las primeras en ser identificadas y caracterizadas dentro del grupo de las MAPKs en mamíferos (*Rossomando, 1989*). Su activación se da a través de varias moléculas externas como la GTPasa Ras, que interactúan con los receptores de membrana y promueven el reclutamiento de otras proteínas con motivos específicos, lo que conlleva a la fosforilación de sustratos corriente abajo de MEK1/2 (*Niault y Baccarini, 2010*) produciendo la activación de las cinasas ERK1/2, que a través de su mecanismo regulador, permiten la expresión de genes, una vez se haya traslocado al núcleo, gracias al reconocimiento de los dominios de inserción, que facilitan este proceso (*Zehorai et al., 2010*). La regulación de esta vía de señalización, se da mediante la actividad de unas proteínas conocidas como fosfatasas que van dirigidas al motivo Thr-Glu-Tyr y actúan como reguladores negativos de la actividad de la vía de ERK1/2 (*Zhou et al., 2002*). La cascada controlada por la vía de ERK1/2 permite el desarrollo de procesos celulares importantes, como determinación de la morfología, plasticidad neuronal, apoptosis, supervivencia, proliferación celular y diferenciación (*Yoon y Seger, 2009*). La activación descontrolada de esta vía conlleva el desarrollo de diversas patologías crónicas como diabetes, enfermedades neurodegenerativas, cáncer, entre otras (*Plotnikov et al., 2011*).

13. Cascada de señalización celular de JNK1, 2, 3

La cinasa JNK fue descrita por primera vez cuando se identificó su actividad reguladora del factor de transcripción N-terminal c-Jun, el cual está implicado en distintos procesos celulares. La activación de esta vía de señalización puede darse mediante estímulos intra o extracelulares. Estudios previos muestran que la cinasa activada por estrés (JNK), también puede estimularse por otros factores como la radiación, mitógenos, estrés ambiental y estrés redox (*Briata et al., 2005; Ip y Davis, 1998; Pulverer et al., 1991*). La cascada de señalización de JNK inicia con la activación mediada por las GTPasas Rho (Rac1 y Cdc42), las cuales pueden activar de manera secuencial, diversos grupos de cinasas como las MAP3K y MAP4K. En este nivel se transmiten señales que promueven la fosforilación de distintos grupos de proteínas en los residuos de treonina y serina. Las cinasas MKK4 y MKK7, son estimuladas en el nivel de MAPKK, que a su vez fosforila los tres componentes de JNK (JNK1-2-3) en los residuos Thr y Tyr del motivo de fosforilación Thr-Pro-Tyr, al nivel de MAPK (*Plotnikov et al., 2011; Davis, 2000; Lawler et al., 1998; Coso et al., 1995*).

Algunos estudios dirigidos por varios investigadores señalan que, bajo condiciones de estrés se ha logrado identificar la presencia de JNK y de otras proteínas involucradas en esta ruta, tanto en el citoplasma como a nivel nuclear. Los genes de *Jnk1* y *Jnk2* se expresan de forma ubicua, sin embargo, el gen *Jnk3* está restringido a órganos como el testículo, corazón y cerebro (*Davis, 2000; Merritt et al., 1999*). Además, la ruta de JNK regula la expresión de otros genes implicados en procesos celulares como la apoptosis, procesos neuronales, actividad inmunológica, señalización de insulina, entre otros (*Rincón y Davis, 2009; Haeusgen et al., 2009; Dhanasekaran y Reddy, 2008*). En consecuencia, alteraciones en esta vía promueven el desarrollo de enfermedades crónicas como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, inflamación y diabetes (*Kim y Choi, 2010; Tanti y Jager, 2009; Wagner y Nebreda, 2009; Zhang y Kaufman, 2008*). La regulación de esta vía, está mediada por la actividad fosfatasa Ser-Tyr y las fosfatasas de especificidad dual (*Keyse, 2000*).

14. Cascada de señalización celular de p38 (α , β , γ , δ)

La vía controlada por la cinasa p38 posee elementos conectados con la vía de JNK y al igual que esta, su activación principal se da por el estrés producido en el entorno celular. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, este grupo de cinasas pueden responder a otras señales emitidas a nivel celular e iniciar una respuesta en cascada (*Coulthard et al., 2009; Waetzig et al., 2002; Kyriakis y Avruch, 2001*). La respuesta se da una vez ocurre la inducción de los receptores de membrana, que a su vez activan MAP4K y MAP3K, a través de su actividad GTPasa, fosforilando diversos sustratos como MKK3, MKK4 y MKK6, pertenecientes al nivel de MAPKK (*Dhillon et al., 2007; Rubinfeld y Seger, 2005*). Por consiguiente, los reguladores Thr y Tyr son fosforilados en el dominio Thr-Gly-Tyr y las isoformas de la cinasa p38 (α , β , γ , δ) reciben las señales de activación. Las isoformas de p38 α y p38 β se expresan de forma ubicua; sin embargo, las isoformas p38 γ y p38 δ se expresan en tejidos específicos de modo diferencial. No obstante, existen diversas alternativas, descritas en la literatura, que permiten la activación de esta vía, como el mecanismo de autofosforilación, mediado por proteínas adaptadoras que permiten el control de diversos procesos en la ruta. Adicional, la vía de señalización de p38 también interacciona con sustratos de la vía de ERK (*Salvador et al., 2005; Zhong et al., 2000; Ge et al., 2002; Hanks y Hunter, 1995; Raingeaud et al., 1995; Dérjard et al., 1994; Lee et al., 1994*). La cinasa p38 controla una cascada de señalización que involucra procesos celulares importantes, como la regulación de la expresión de genes que participan en respuestas inflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α), senescencia, supervivencia celular y apoptosis. En muchos casos su actividad descontrolada se relaciona directamente con el desarrollo de patologías graves como el Alzheimer, cáncer, diabetes y desarrollo de tumores (*Maruyama et al., 2009; Liu y Cao, 2009; Thornton y Rincon, 2009; Loesch y Chen, 2008; Sohn et al., 2007; Johnson y Bailey, 2003; Kotlyarov et al., 1999; Prichett et al., 1995*).

En resumen, las formas fosforiladas de la familia de las MAPKs (ERK1/2, JNK y p38) como anteriormente señalamos, se traslocan en el núcleo celular,

donde fosforilan numerosos sustratos corriente abajo, incluyendo factores de transcripción, modulando así la expresión de un gran número de genes pro-inflamatorios, de diferenciación y proliferación celular (*Johnson y Nakamura, 2007*). Este módulo de tres niveles de la vía de señalización, media respuestas a estímulos que se conectan mediante señales ultrasensibles y en conjunto con otros componentes celulares, tales como, receptores, transductores y proteínas de andamiaje y forman un sistema de señalización de proteínas activadas por mitógenos (*Keshet y Seger, 2010*). Por lo tanto, las rutas de ERK1/2 (MEKK), JNK y p38 MAPK controlan una amplia gama de funciones claves para la homeostasis celular (*Lee et al., 2016*).

15. Rol de la familia de las MAPKs en la replicación viral

En los últimos años, varios estudios han demostrado que distintas familias de virus tienen la capacidad de manipular rutas que involucran a las proteínas cinasas, con el fin de favorecer su replicación. Tal es el caso del virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV), que al infectar células humanas, activa la cascada de señalización de ERK1/2, lo cual le permite replicar exitosamente dentro del huésped (*Voss et al., 2014*). Se describió que el virus de la varicela-zoster (VZV) también induce la activación de miembros de las MAPK, JNK y p38, promoviendo el aumento de IL6, corriente abajo de la cascada de señalización como consecuencia de la infección (*Rahaus et al., 2004*). Además, se observó, que el virus de la influenza aviar altamente patógeno, (HPAIV) infecta las células endoteliales humanas y promueve la expresión de genes pro-inflamatorios. Börgeling y su grupo lograron ver que a través de la inhibición de p38, se logra controlar y disminuir la expresión de estas citocinas en el curso de la infección por HPAIV (*Börgeling et al., 2014*). Otro estudio mostró que la inhibición de p38 con SB203580 reduce la expresión de citocinas y quimiocinas inducida por el virus del dengue (DENV). Adicional a ello, el bloqueo de esta cinasa, reduce la lesión hepática inducida por DENV (*Sreekanth et al., 2017*). En conjunto, estas investigaciones muestran que la familia de las MAPKs juegan un papel importante

en el ciclo de vida de varios virus, siendo una ruta objetivo para el desarrollo de terapias antivirales.

16. Familia de las cinasas PIM

La familia PIM es una familia de serina/treonina cinasas que constan de tres isoformas: PIM1, PIM2 y PIM3 (*Santio y Koskinen, 2017*). Cada miembro posee un rol importante a nivel celular y se ven relacionados estrechamente con la oncogénesis, debido a que su expresión induce la sobrevivencia celular a través del bloqueo de la apoptosis y en favorecer la proliferación celular. Se ha descrito que PIM1 se sobre expresa en varios tumores tanto sólidos como hematopoyéticos y su aumento se asocia con un peor pronóstico para los pacientes. PIM2 comparte ciertas funciones con PIM1 y, además, posee 3 isoformas, PIM2S, PIM2M y PIM2L y su activación, impide el proceso de apoptosis, favoreciendo la supervivencia celular, lo que conlleva al desarrollo de varios tipos de leucemia, linfomas y mielomas. El aumento en los niveles de PIM3, también conocida como KID-1, al igual que los otros miembros de esta familia, está implicado en procesos de inhibición de la apoptosis, supervivencia celular y la progresión tumoral, y en consecuencia, su expresión no controlada se asocia con distintos tipos de cáncer, tales como adenocarcinomas, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de colon, entre otros (*Szydlowski et al., 2017; Brasó-Maristany et al., 2016; Jiménez-García et al., 2016; Keane et al., 2015; Nakano et al., 2015; Wu et al., 2010; Bullock et al., 2009; Morishita et al., 2008; Popivanova et al., 2007*). Las cinasas Las PIM se descubrieron en un tamizaje de genes que promovían el desarrollo de linfomas en un modelo tumoral de ratón (*Warfel y Kraft, 2015*). En contraste a otras cinasas, la activación de las proteínas PIM no depende de la fosforilación u otras modificaciones post-traduccionales, por lo que ellas se encuentran constitutivamente activas una vez son sintetizadas y su regulación ocurre a nivel transcripcional o traduccional (*Santio y Koskinen, 2017*). En este sentido, hay evidencias de que las proteínas PIM se expresan en respuesta a diversas citocinas o factores de crecimiento, a través de la vía de JAK/STAT

(Zhang *et al.*, 2018). Debido a esto, no es extraño que la expresión no controlada de esta familia de cinasas, esté asociado al desarrollo de distintas patologías (Santio y Koskinen, 2017).

17. Implicación de la familia de las cinasas PIM en la replicación viral

Varias líneas de evidencia sugieren que las cinasas PIM podrían ser un factor proviral para virus de distintas familias y pueden actuar a través de varios mecanismos. Por ejemplo, en las células B primarias infectadas con el virus de Epstein-Barr (EBV) se observó un aumento en los niveles de los genes *Pim-1* y *Pim-2* y estas cinasas mejoraron la actividad transcripcional de la proteína EDNA2 de EBV, probablemente contribuyendo a la inmortalización de las células B (Rainio *et al.*, 2005). En otro estudio, Park y sus colegas revelaron que la cinasa PIM1 interactuaba con la proteína no estructural 5A del virus de la hepatitis C (HCV) y esta interacción promovía la estabilidad de la proteína PIM1. Además, la inhibición de todas las isoformas de las cinasas PIM o la eliminación de estas enzimas redujeron la replicación del HCV de manera dependiente de la dosis (Park *et al.*, 2015). Además, la inhibición de PIM1 en las células epiteliales bronquiales primarias disminuyó la replicación del rinovirus humano 16 (HRV-16), lo que sugiere que la cinasa PIM1 es relevante para la replicación de este patógeno (de Vries *et al.*, 2015). Más recientemente, utilizando el pez cebra como modelo de infección *in vivo*, Pereiro y sus colaboradores encontraron que el tratamiento con los inhibidores pan-PIM cinasas SGI-1776, INCB053914 o AZD1208 bloqueaba la replicación del virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV) (Pereiro *et al.*, 2020). En conjunto, estas observaciones previas indican que las cinasas PIM podrían ser factores importantes implicados en la replicación viral y podrían servir como objetivos antivirales potenciales.

Objetivos

Objetivo General

- Analizar el efecto de los inhibidores de las cinasas celulares p38, JNK, ERK1/2 y PIM sobre la replicación del virus Mayaro.

Objetivo Específicos

- Evaluar la toxicidad de los inhibidores SB203580, SP600125, U0126, NR-7h, Losmapimod, PIM1 Inh 2 y AZD1208 en las líneas celulares utilizadas para infectar con el virus Mayaro.
- Evaluar el efecto de los inhibidores de las cinasas celulares p38, JNK, ERK1/2 y la familia de cinasas PIM sobre la producción de partículas virales.
- Analizar el efecto de los inhibidores de las MAPKs p38, JNK, ERK1/2 y de la familia de cinasas PIM en la expresión de proteínas virales E1 y nsP1.

Hipótesis

Los tratamientos con los inhibidores de la familia de las MAPKs p38, JNK, ERK1/2 o las cinasas PIM afectan la replicación del MAYV.

CAPÍTULO II METODOLOGÍA

1. Cultivo celular y amplificación de cepas virales

Se utilizaron distintas líneas celulares, tales como fibroblastos normales de humanos adultos (PCS-201-012) (HDFs), células Vero-E6 (CRL-1586), Vero (CCL-81) (obtenidos de la American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE. UU) y células HeLa (proporcionadas por la Dra. Carmen Rivas, CIMUS, Coruña, España). Las células se cultivaron en frascos de cultivo de 75 cm² con medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (para HDFs) y medio esencial mínimo de Eagle (MEM) 1X (para células Vero, Vero-E6 y HeLa), ambos suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB) Gibco, inactivado y filtrado, 200 mM de L-glutamina (Gibco) y 10,000 U/mL de Penicilina-Estreptomicina (medio completo). Las células se incubaron a 37 °C en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂ durante 24 horas (h). Cuando las células alcanzaron una confluencia del 90-100%, se trataron con 0.25% de tripsina EDTA 1X, y se realizaron pases a frascos de cultivo de 75 cm² para su mantenimiento o a platos de 6, 12, 24 y 96 pocillos para los experimentos correspondientes. Las cepas del virus AVR0565 (Perú), TRVL 4675 (Trinidad y Tobago) y Guyane (Guyana Francesa) (*Powers et al., 2006; Talarmin et al., 1998*) y Una (UNAV, BT-1495-3, Panamá) (*Causey et al., 1963*) se obtuvieron del Centro de Referencia Mundial de Arbovirus de la University of Texas Medical Branch (UTMB), EEUU. Los virus Chikungunya (CHIKV, Panamá_256137) (*Carrera et al., 2017*) y Zika (ZIKV, 259249) se aislaron del suero de pacientes durante los brotes de CHIKV y ZIKV en Panamá en el año 2014 y 2015, respectivamente. Todas las cepas de virus, se propagaron, titularon y congelaron a -80°C hasta su uso.

2. Cuantificación de la producción de partículas virales

Para la cuantificación de producción de partículas virales se utilizó la técnica de titulación en placas y tinción con violeta cristal. Se realizaron diluciones seriadas 1:10 de los sobrenadantes de las células infectadas control o tratadas con los distintos inhibidores. Para ello, se agregaron 1080 µL de medio MEM 1X sin suero en tubos eppendorf de 1.5 mL y 120 µL de la muestra,

se mezcló con el vórtex y se repitió el procedimiento hasta alcanzar la dilución deseada. Las células fueron crecidas en placas de seis pocillos con una confluencia del 80 al 90% el día que se realizó la titulación; se les retiró el medio de cultivo y se agregaron 500 µL de cada dilución por duplicado. Las placas se incubaron a 37°C durante 1h, seguidamente se retiró el medio de infección y se agregó una solución con medio MEM 2X con 4% de suero + agar (2%) en una relación 1:1. Los platos se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante tres días. Tras el período de incubación, las células fueron fijadas con formaldehído al 4% durante 30 min, luego se retiró el formaldehído y el agar para proceder a la tinción de las placas con una solución de violeta cristal al 0.25% y metanol al 30% durante cinco minutos. Seguido, se retiró el violeta cristal y las placas se lavaron con agua del grifo, se dejaron secando y el número de placas presentes en cada pocillo fue contado. Para calcular las unidades de formadoras de placas (UFP) por mililitro se utilizó la siguiente formula:

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

Los títulos virales de las muestras se expresaron como unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL).

3. Efecto Virucida

Para el ensayo virucida, se preparó una solución madre en medio sin SFB, con 10⁶ o 10⁷ UFP del MAYV y en presencia de los inhibidores de las cinasas, se incubó a 37°C durante 1 h. A continuación, el virus restante se tituló directamente utilizando el ensayo de formación de placas.

4. Tratamientos con los inhibidores químicos

Los inhibidores químicos que se utilizaron en este estudio, fueron disueltos en Dimetilsulfoxido (DMSO) y se almacenaron en alícuotas a -80 o -20°C, según

las indicaciones del fabricante. En la tabla 1, se muestran los datos sobre los distintos inhibidores químicos. Para medir la efectividad de los compuestos químicos sobre la replicación del MAYV, las líneas celulares (Hela, HDFs o Vero) fueron pre-tratadas durante 1 h con los inhibidores: SB203580 (0.5, 2 y 10 μM), SP600125 (0.5, 1 y 5 μM) y U0126 (1, 5 y 10 μM), Losmapimod (1, 5 y 10 μM), tres horas con el inhibidor NR-7h (0.05, 0.2 y 1 μM) y 2 h con los compuestos Inhibidor 2 de PIM-1 (PIM1 Inh 2) (5 y 10 μM) o AZD1208 (5 y 10 μM). A continuación, las células se infectaron con el MAYV a una MOI de 1 (HDFs, Vero) o 10 (HeLa) durante 1 h. Después, retiramos el inóculo, tratamos las células durante 24 h con las drogas y los sobrenadantes fueron obtenidos para su análisis posterior.

Tabla 1. Compuestos químicos que inhiben la actividad de la familia de las MAPKs y de las cinasas PIM.

Inhibidor	Diana	Concentración stock	Casa comercial
SB203580	p38 α y p38 β	10 mM	Cell Signaling Technology
SP600125	JNK1-2-3 MAPK	25 mM	Cell Signaling Technology
U0126	MEK1,2 MAPK	10 mM	Cell Signaling Technology
NR-7h	P38 α y p38 β	10 mM	Tocris
Losmapimod	P38 α y p38 β	10 mM	Selleckchem
Inhibidor 2 de PIM-1	PIM-1	10 mM	Tocris
AZD12008	PIM-1,2,3	10 mM	Tocris

5. Experimentos de tiempo de adición de los fármacos

Las células HeLa fueron sembradas en platos de 12 pocillos, se infectaron con MAYV a una MOI de 10 y al cabo de una hora de absorción del virus (tiempo 0 hpi), agregamos los inhibidores de las cinasas PIM o DMSO en los tiempos 0,

2, 4 y 8 hpi. Luego de 24h de la infección, recolectamos los sobrenadantes celulares para cuantificar la producción de progenie viral mediante el ensayo de formación de placas.

6. Inmunoblot y anticuerpos utilizados

Para el análisis de las proteínas celulares, las células fueron lavadas con tampón PBS y los lisados se obtuvieron con el tampón de carga de proteínas (Laemmli 4x, #1610747) de Bio-Rad con ditioneitol al 10%. Los extractos de proteínas se separaron en geles de poliacrilamida-SDS al 10% en una solución tampón de corrida de electroforesis (Tris-Base 99.8%; Glicina 100%; SDS 20%; pH 8.3). A continuación, las muestras se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en una solución tampón de transferencia (Tris-Base 99.8%; Glicina 100%; H₂O). Las membranas se bloquearon en una solución de leche desnatada al 5% en tampón T-TBS (10 mM de Tris base, pH 7.4; 150 mM de NaCl y 0.05 % de Tween 20) y finalmente fueron incubadas con los anticuerpos correspondientes. Las membranas se lavaron en tampón T-TBS. Los anticuerpos utilizados fueron: Anti-E1, Anti-nsP1 de MAYV policlonales de conejo, ambos diseñados, generados y validados en nuestro laboratorio (*Llamas-González et al., 2019*), anti-GAPDH monoclonal de conejo (D16H11, Cat. # 5174) de Bio-Rad, anti- β -actina monoclonal de conejo (D6A8, Cat. # 8457) y anti-p38 MAPK monoclonal de conejo (D13E1, # 8690), (ambos de Cell Signalling Technology, Danvers, MA, EE. UU), todos incubados a una concentración de 1:1000 a 4 °C durante la noche. Después, las membranas fueron lavadas en tampón T-TBS e incubadas con anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo o anti- IgG de ratón (1:500) conjugados a peroxidasa de rábano durante 1h a temperatura ambiente (TA). Para el revelado, las membranas se colocaron en solución ECL (Cell Signaling Technology) durante 5 min y la señal de quimioluminiscencia se detectó mediante un scanner C-Digit (LI-COR, EEUU).

7. Evaluación de la toxicidad de los inhibidores

Para evaluar la toxicidad de los inhibidores U0126, SB203580, SP600125, Losmapimod, NR-7h, Inh 2 de PIM-1 o AZD1208 en las líneas celulares HDFs, HeLa o Vero se realizaron ensayos de viabilidad celular con MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-bromuro de tetrazolio difenilo). Este método determina la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial de las células viables, por la formación de cristales de formazán insolubles en agua, que se detectan por espectrofotometría a 570 nm (Stockert *et al.*, 2012). Se colocaron las células en platos de 96 pocillos (25,000 células/mL) en medio MEM o DMEM 1X suplementado con 10% de SFB. Al día siguiente, las células fueron tratadas con tres concentraciones de cada inhibidor o con el control (DMSO al 0.1%) por quintuplicado en medio MEM o DMEM 1X sin rojo fenol suplementado al 1% de SFB e incubadas durante 24 y 48 h. Se añadió MTT al 10% del volumen de cultivo celular y los platos se incubaron durante 4 h a 37°C. Se agregó el solvente de MTT directo al sobrenadante para disolver los cristales de formazán y los platos fueron incubados a temperatura ambiente durante 24 h. Finalmente, se determinó la absorbancia mediante el espectrofotómetro lector de microplacas a 570 nm (BioTek, Winooski, VT, EEUU). La viabilidad celular se calculó asumiendo que los valores de la absorbancia de los pocillos en el control tienen un 100% de viabilidad. Los resultados se muestran como el porcentaje de células viables en relación con las células de control no tratadas.

8. Inmunofluorescencia indirecta mediante microscopía confocal

Para detectar antígenos del MAYV mediante inmunofluorescencia, los HDFs o las células Hela fueron crecidos en medio MEM 1X suplementado con 10% de SFB sobre cubreobjetos de vidrio estériles de 10 mm de diámetro en platos de 24 pocillos. Al día siguiente, las células se pre-trataron con los inhibidores indicados durante 1 h y posteriormente se infectaron con el MAYV a una MOI de 1 o 10. A continuación, se agregó medio con los inhibidores o con el

control (DMSO al 0.1 %) y las células se incubaron durante 24 h a 37°C. Al cabo de ese período, las células se lavaron con solución de PBS estéril y se fijaron con paraformaldehído al 2% en PBS durante 30 min. A continuación, se realizaron tres lavados con PBS estéril y se permeabilizó la membrana celular utilizando una solución de Tritón X-100 al 0.25% disuelto en PBS estéril durante 30 min. Se realizaron tres lavados más con PBS estéril y se bloquearon las células con una solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 2% disuelto en PBS durante 10 min. Después, se procedió a incubar con los anticuerpos primarios Anti-MAYV generado en ratón (proporcionado amablemente por el Dr. Scott Weaver, WRCEVA-UTMB, Galveston, TX, EEUU), anti-E1 o anti-nsP1, generado en conejo (validados en nuestro laboratorio contra alfavirus) (*Llamas-González et al., 2019*), a una concentración de 1:100 disuelto en BSA al 2% durante la noche a 4 °C. Se realizaron dos lavados con PBS estéril y se procedió a incubar durante 60 min a TA con los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón o conejo generados en cabra conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor 568 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) a una concentración 1:1000 disuelto en BSA al 2% durante 1 h en la oscuridad. Posteriormente, se hicieron dos lavados con PSB estéril y finalmente se colocó una gota de medio de montaje Prolong Diamond Antifade Mountant con DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) sobre un portaobjeto y los cristales se colocaron sobre la gota con el lado que portaba las células. Los portaobjetos se almacenaron a 4°C hasta la captura de las imágenes con un microscopio confocal FV1000 Flowview (Olympus, Lombard, IL, EEUU). Las imágenes se analizaron con el software ImageJ.

9. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos se analizaron mediante las pruebas estadísticas: Mann-Whitney y la prueba de ANOVA de una o dos vías, seguidas de la prueba posterior de Dunnett o Sidak. Se utilizó el software GraphPad Prism versión 9.1.0 para Mac, para realizar todas las pruebas estadísticas y crear los gráficos. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. Todos

los experimentos se realizaron al menos tres veces con tres réplicas. Para cada experimento, se mostró el promedio y la desviación estándar.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

Análisis de la citotoxicidad de los inhibidores de las cinasas p38, JNK y ERK en células de cultivo primario Fibroblastos de piel humana (HDFs) y células HeLa

Los virus utilizan factores celulares del huésped para poder replicar con éxito. Así, la importancia de las vías de señalización celular activada por mitógenos MAPKs en el curso de distintas infecciones virales ha sido previamente estudiada (*Rahaus et al., 2004*). Sin embargo, en el contexto del MAYV, esto no ha sido abordado. Con el objetivo de explorar el potencial papel de la familia de las MAPKs en la replicación del MAYV, decidimos utilizar un enfoque farmacológico, probando moléculas inhibitorias que bloquean la actividad cinasa de estas enzimas y los procesos de señalización controladas por ellas. De esta manera, decidimos examinar el grado de toxicidad de los inhibidores de las MAPKs SB203580, un inhibidor competitivo de ATP, perteneciente al grupo de piridinil imidazoles, el cual bloquea selectivamente las isoformas p38 α y p38 β (Cuenda *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 2015). SP600125, un compuesto de la serie de antrapirazolona, un inhibidor reversible competitivo de ATP que bloquea las isoformas de JNK-1, -2 y -3 y la expresión de genes inflamatorios (Bennett *et al.*, 2001), y el inhibidor U0126, no competitivo y selectivo de MEK1 y MEK2 que en conjunto, activan mediante mecanismos de fosforilación, la vía de ERK1/2 (Favata *et al.*, 1998). Se trató los HDFs y las células HeLa con dosis crecientes de los compuestos SB203580, SP600125 y U0126 durante 24 h, y se determinó la viabilidad celular mediante el método de MTT. Como se muestra en la Fig. 5, no se observó citotoxicidad, al utilizar los inhibidores SB203580 y U0126, siendo la viabilidad celular igual o superior al 80% a la dosis máxima probada. Por el contrario, el compuesto SP600125, resultó ser significativamente tóxico a la mayor concentración utilizada (5 μ M), en ambas líneas celulares evaluadas, por lo que se decidió utilizar una concentración de 1 μ M en los ensayos posteriores.

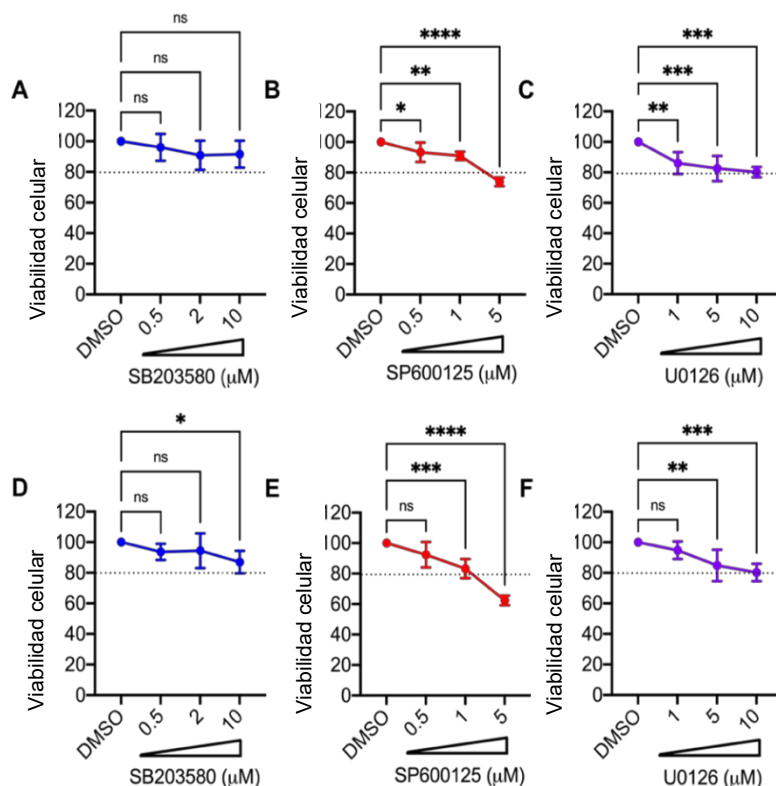


Figura 5. Toxicidad de los inhibidores de las MAPKs SB203580, SP600125 y U0126 en HDFs o células HeLa. Se trataron células HDFs (A, B, C) o HeLa (D, E, F) con las concentraciones indicadas de cada inhibidor o DMSO como control (0.1%), después de 24 h de incubación, se evaluó la viabilidad celular utilizando el método MTT. Las diferencias estadísticamente significativas se evaluaron con la prueba ANOVA de una vía, seguida de la prueba posterior de Dunnett: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns: no significativo. La línea de puntos en los gráficos indica una viabilidad celular del 80%.

El inhibidor SB203580 reduce la producción de la progenie viral del MAYV en HDFs y células HeLa

Para explorar el potencial efecto antiviral de los inhibidores de las MAPKs en el MAYV, se tomó como modelo de estudio células humanas normales HDFs o células tumorales de cáncer cérvico uterino HeLa, que previamente han demostrado ser susceptibles a la infección por el MAYV (Llamas-González *et al.*, 2019). Las células fueron pretratadas con las siguientes concentraciones de los inhibidores SB203580 (10 μ M), SP600125 (1 μ M), U0126 (10 μ M) o DMSO al 0.1% durante 1 h. Al cabo de este período, los fármacos fueron retirados, las células

fueron infectados con el MAYV a una multiplicidad de infección (MOI) de 1 o 10, seguido de 1 h de absorción, el inóculo viral fue retirado y se agregó medio fresco al 2% de SFB con SB203580 (10 μ M), SP600125 (1 μ M), U0126 (10 μ M) o DMSO. Al término de 24 h de incubación, se colectaron los sobrenadantes y la producción de partículas virales infecciosas se cuantificó mediante el método de titulación de placas y tinción con violeta cristal. Los HDFs que fueron tratados con el inhibidor de p38 SB203580, mostraron una disminución significativa en el título viral en comparación con la condición control o DMSO, donde el título fue mayor (Fig. 6A). En células HeLa, se observó una reducción significativa, aunque menor a la observada en HDFs (Fig. 6D). El tratamiento con los inhibidores de JNK, SP600125 o de MEK1/2, U0126, provocó una pequeña disminución, aunque significativa de la progenie viral del MAYV sólo en células HeLa (Fig. 6B, C, E, F). En conjunto, estos hallazgos sugieren que SB203580, un inhibidor de la cinasa p38, provoca una reducción significativa del título viral independientemente de la línea celular probada y en contraste, la bajada del título viral del MAYV, utilizando los compuestos que bloquean la actividad de la cinasa de JNK y MEK1/2, fue dependiente de la línea celular.

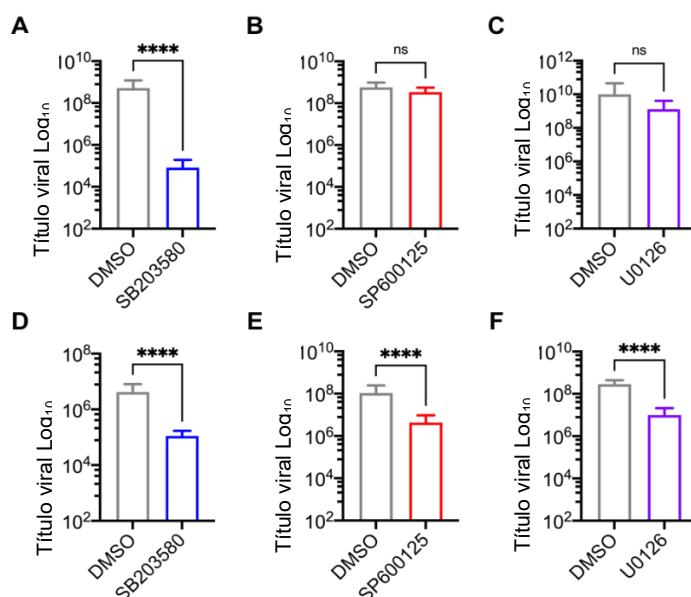


Figura 6. La inhibición de p38 con SB203580 disminuye la producción de progenie del MAYV en HDFs y células HeLa. Se pretrataron HDFs (A - C) o HeLa (D - F) con SB203580, SP600125

o U0126 durante 1 h. Los compuestos fueron eliminados y las células se infectaron con el MAYV a una MOI de 1 (HDFs) o 10 (células HeLa). Después del tiempo de absorción del virus, se añadieron a las células los inhibidores de las MAPKs disueltos en medio fresco y se incubaron durante 24 h. La producción de progenie viral en los sobrenadantes celulares de cada condición experimental, se cuantificó usando el ensayo de formación de placas. Las diferencias estadísticamente significativas se analizaron con la prueba de Mann-Whitney: **** $p < 0,0001$ y ns: no significativo.

La disminución de los títulos virales del MAYV en respuesta al inhibidor SB203580 es dependiente de la dosis

Al demostrar que los inhibidores de las MAPKs tienen un efecto sobre la replicación del MAYV, se decidió investigar mediante un ensayo de dosis-respuesta, si la capacidad del virus para replicar se ve afectada por la concentración del fármaco. En este sentido, los HDFs y las células HeLa, se pretrataron con dosis crecientes de los inhibidores de las MAPKs durante 1 h. Al cabo de este periodo, se agregó el inóculo viral del MAYV utilizando la metodología antes mencionada. Tras 24 h de incubación en presencia o no de los inhibidores, los sobrenadantes fueron colectados y la progenie viral se cuantificó mediante ensayos de titulación. Los resultados revelan que al bloquear químicamente p38 con el fármaco SB203580, se observa una bajada significativa de los títulos virales del MAYV y además, es dosis dependiente en ambas líneas celulares (Fig. 7A, D). También, se observó el mismo efecto de dependencia, únicamente cuando se trató las células HeLa con los compuestos que actúan sobre las cinasas JNK (SP600125) o MEK 1/2 (U0126) (Fig. 7E, F). No obstante, en los HDFs, no se logró ver el mismo efecto (Fig. 7B, C). En conjunto, estos resultados indican que el inhibidor de la cinasa de p38, el compuesto SB203580, afecta la replicación del MAYV de manera dependiente de la dosis e indistintamente del tipo de célula utilizado.

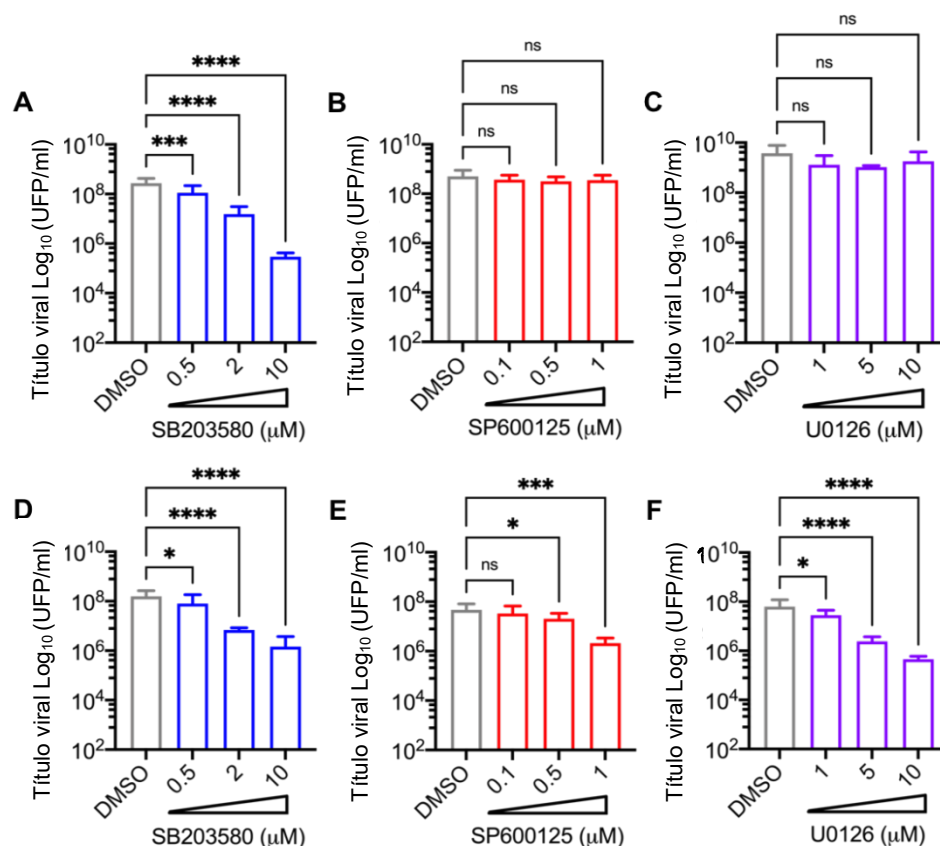


Figura 7. El efecto de SB203580 sobre la producción viral es dependiente de la concentración. Las células HDFs (A, B, C) o HeLa (D, E, F) se pretrataron con dosis crecientes de SB203580, SP600125 o U0126 y luego, se infectaron con el MAYV como se realizó anteriormente. Después de 24h de infección, se midieron los títulos del MAYV en los sobrenadantes celulares usando el ensayo de formación de placas. Las diferencias estadísticamente significativas se evaluaron con la prueba ANOVA de una vía, seguida de la prueba posterior de Dunnett: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ y ns: no significativo.

Los compuestos SB203580, SP600125 y U0126 no poseen actividad virucida contra el MAYV

Dado a que en los ensayos anteriores se observó una bajada de los títulos virales al utilizar los compuestos que inhiben la familia de cinasas p38, JNK y MEK1/2, se quiso examinar si este efecto podría deberse a una actividad directa sobre la infectividad del MAYV. Para explorar esto, se incubó 10^6 UFP del MAYV en medio MEM sin suero y en presencia de los compuestos SB203580, SP600125, U0126 o DMSO como control, a 37°C durante 1 h. Posteriormente, se cuantificó directamente el virus restante en cada condición experimental mediante

el ensayo de titulación antes expuesto. Como se muestra en la Fig. 8, la infectividad del MAYV no se ve afectada con los inhibidores de las MAPKs, demostrándose que las drogas probadas no presentan actividad virucida.

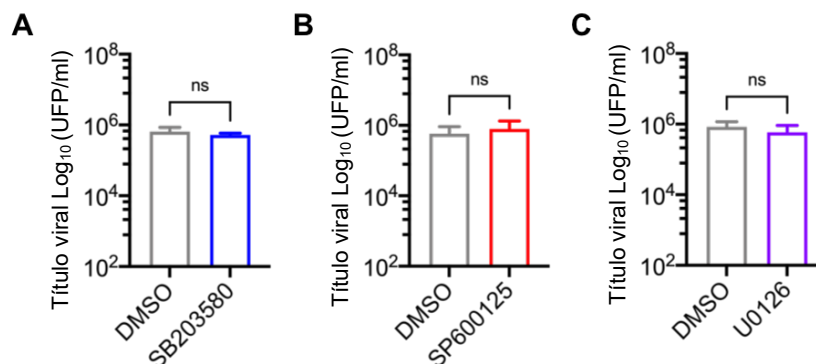


Figura 8. Los inhibidores de las MAPKs SB203580, SP600125 y U0126 no muestran actividad virucida contra el MAYV. Se incubaron 1×10^6 UFP del MAYV en MEM sin suero con SB203580 (A), SP600125 (B) o U0126 (C) a 37°C durante 1 h. Luego, el virus restante para cada condición experimental, se cuantificó directamente usando el ensayo de formación de placas. Las diferencias estadísticas se analizaron mediante la prueba de Mann-Whitney: ns: no significativo.

La inhibición inducida por el compuesto SB203580 en HDFs y células Hela reduce la expresión de la proteína estructural E1 del MAYV

Se ha descrito que la inhibición de las MAPKs, utilizando pequeñas moléculas, suprime la expresión de distintas proteínas virales (Voss *et al.*, 2014; Rahaus *et al.*, 2004). Para investigar sobre el posible mecanismo por el cual los inhibidores de las MAPKs afectan la replicación del MAYV, se pre-incubó ambas líneas celulares durante 1 h con las drogas SB203580, SP600125, U0126 o DMSO, se infectó con el MAYV e incubó durante 16 o 24 h con los distintos tratamientos. Luego, los lisados protéicos fueron obtenidos y a través de ensayos de inmunoblot, se evaluaron los niveles de la proteína E1 del MAYV. Estos ensayos revelaron que el bloqueo de la cinasa p38 con el compuesto SB203580 promueve una reducción significativa en los niveles de la proteína E1 del virus en ambas líneas celulares a partir de 16 h post infección (hpi) (Fig. 9A, B). En el caso del inhibidor de JNK, SP600125, se notó una ligera disminución de la proteína E1, luego de 16 h de infección, en las líneas celulares probadas (Fig. 9C, D). No

obstante, en el caso de las células que fueron tratadas con U0126, el inhibidor de MEK1/2, no se observó diferencias en la expresión de la proteína E1 del MAYV (Fig. 9E, F). Estos resultados, indican que la inhibición de la cinasa p38 suprime la expresión de la proteína E1 del MAYV, independientemente de la línea celular estudiada.

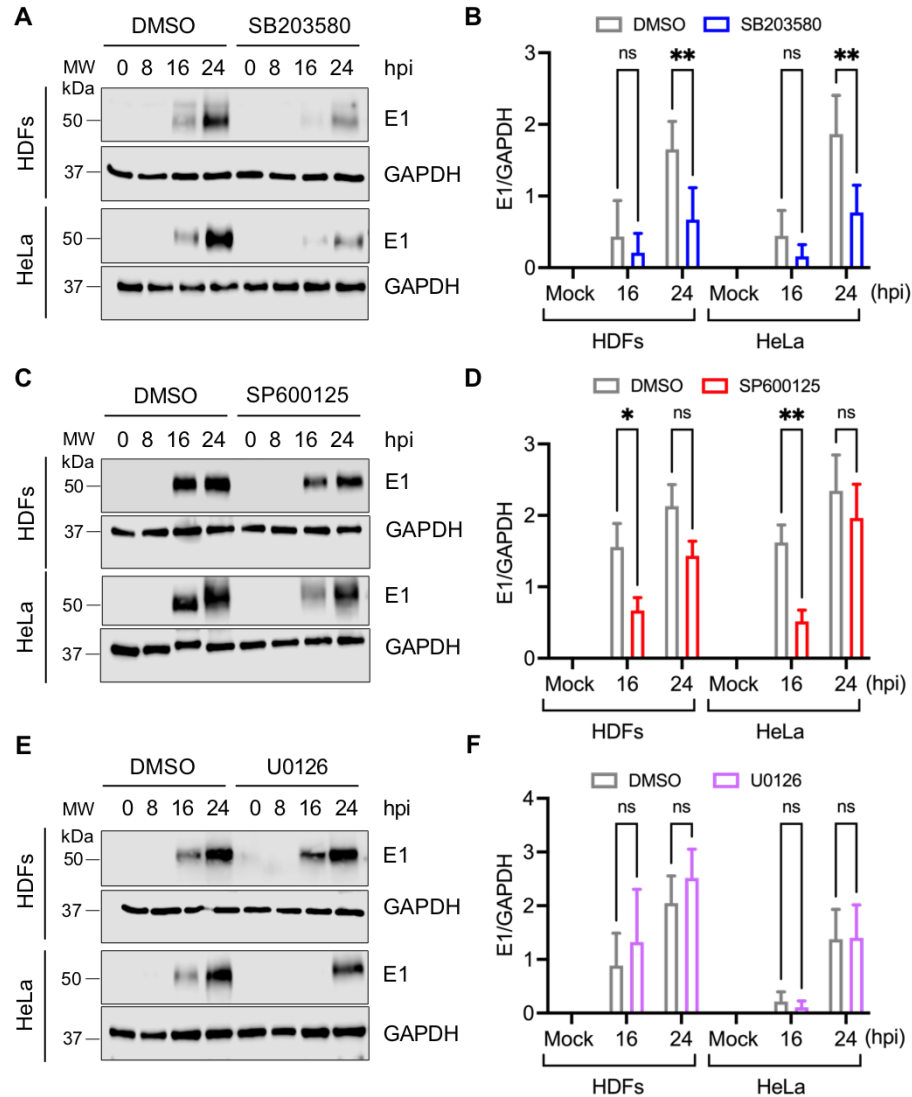


Figura 9. SB203580 afecta la expresión de la proteína E1 estructural del MAYV tanto en HDFs como en células HeLa. Las células HDFs o HeLa se pretrataron con SB203580 (A), SP600125 (C) o U0126 (E) y luego, se infectaron con el MAYV como se indicó anteriormente. En diferentes momentos posteriores a la infección, se evaluaron los niveles de proteína viral estructural E1 usando inmunoblot. La proteína GAPDH se utilizó como control de carga. MW: peso

molecular. kDa: kilodaltons. (**B, D, F**) El análisis densitométrico de la proteína E1 se realizó utilizando el software ImageJ y se normalizó con la proteína GAPDH. Los datos se analizaron con la prueba ANOVA de dos vías, seguida de la prueba posterior de Sidak. Se muestran diferencias estadísticamente significativas: * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$ y ns: no significativo.

La molécula PROTACs NR-7h reduce la replicación del MAYV al eliminar las isoformas p38 α y p38 β en HDFs

La inhibición de la cinasa p38 utilizando el compuesto SB203580 sugiere que esta proteína podría desempeñar un papel clave en el curso de la infección del MAYV. Para corroborar esta hipótesis, se exploró un nuevo enfoque farmacológico, utilizando pequeñas moléculas quimeras conocidas como PROTACs (Proteolysis Targeting Chimeras), que inducen la proteólisis de proteínas dianas. Los PROTACs han surgido como una herramienta terapéutica promisorio que permite la degradación de proteínas específicas, mediante un mecanismo dependiente del sistema ubiquitina-proteasoma (Cromm y Crews, 2017). Estas pequeñas moléculas heterobifuncionales contienen tres elementos estructurales claves: un ligando de unión a la proteína de interés, un ligando de unión a una E3 ubiquitina ligasa y un enlazador que permite la unión de estos dos componentes (Canovas y Nebreda, 2021; Sun *et al.*, 2019; ; Cromm y Crews, 2017). Los PROTACs funcionan reconociendo un sustrato proteico específico y reclutando una E3 ubiquitina ligasa que promueve la poliubiquitinación de la proteína de interés y su posterior degradación en el proteosoma (Sun *et al.*, 2019; Cromm y Crews, 2017). La familia de p38 MAPK está conformada por cuatro isoformas: p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ (Coulthard *et al.*, 2009; Canovas y Nebreda, 2021). Las isoformas p38 α y p38 β se expresan de forma ubicua en la mayoría de los tejidos. Sin embargo, p38 γ y p38 δ se expresan en algunos tejidos de forma restringida (Canovas y Nebreda, 2021b). Recientemente, se ha visto que el compuesto PROTACs NR-7h en concentraciones nanomolares es capaz de inducir la degradación específica de las isoformas p38 α y p38 β , bloqueando así la señalización descendente que se induce por estrés y citocinas (Donoghue *et al.*, 2020a). Considerando esto, exploramos el efecto de NR-7h sobre nuestro

modelo de infección celular, tratando HDFs a concentraciones crecientes a partir de 50 nM hasta 1 μ M durante 24 h. Después, los niveles de p38 α y p38 β se evaluaron con un anticuerpo que reconoce ambas isoformas. A través de este ensayo, no detectamos p38 en las células tratadas con NR-7h, incluso a pequeñas concentraciones como 50 nM. Sin embargo, se observó altos niveles de las isoformas p38 α /p38 β en HDFs tratados con DMSO (Fig. 10A, C). A continuación, quisimos determinar el momento en el que iniciaba la proteólisis de p38 α /p38 β , para ello, se trataron los HDFs en una cinética de tiempo con NR-7h (1 μ M) y se evaluó los niveles de la proteína p38. En estos experimentos se observó, que a partir de 2 h de tratamiento con NR-7h en los HDFs, se induce eficientemente la degradación de p38 α /p38 β , como se muestra en la Fig. 10 (panel B y D). Para investigar si la replicación del MAYV en HDFs, se ve afectada por la degradación de las isoformas p38 α /p38 β , se realizó el pre-tratamientos con la molécula NR-7h (1 μ M) o DMSO durante 3 h. Al cabo de este período, las células fueron infectadas con el MAYV a una MOI de 1 en presencia de NR-7h o DMSO. Luego de 1h de absorción del virus, se retiró el inóculo, se agregaron los tratamientos en medio fresco y se incubaron durante 24 h. A continuación, a través de la técnica de inmunofluorescencia, se analizó la presencia de antígenos del MAYV. En las células tratadas con NR-7h obtuvimos una clara reducción de células positivas al antígeno del MAYV respecto a la condición tratada con DMSO, donde observamos un alto número de células positivas teñidas de color rojo (Fig. 11A). Para corroborar estos resultados, pre-tratamos HDFs con distintas dosis del compuesto NR-7h e infectamos con el MAYV como se indicó anteriormente. Al cabo de 24 h de incubación, los sobrenadantes fueron colectados y sometidos a cuantificación mediante el ensayo de formación de placa. En células tratadas con NR-7h, notamos una disminución de los títulos virales, el cual dependía de la dosis utilizada (Fig. 11B). A través de los ensayos de citotoxicidad (Fig. 11C), comprobamos que la molécula NR-7h no afecta la viabilidad de los HDFs, demostrando que el efecto inducido sobre la replicación del MAYV no está relacionado con la toxicidad celular. Quisimos explorar si la degradación de

p38 α /p38 β tenía un efecto sobre la expresión de la proteína viral E1. Para ello, realizamos ensayos de infección con el MAYV en los HDFs tratados con NR-7h o DMSO a distintos tiempos con el MAYV, agregamos tratamientos con la droga o DMSO y evaluamos los niveles de la proteína estructural E1 del MAYV en los lisados celulares usando la técnica de inmunoblot. Los resultados revelaron que la eliminación de las isoformas p38 α /p38 β promueve una disminución en los niveles de la proteína viral E1 a las 24 hpi (Fig. 11D, E). En conjunto, nuestros hallazgos corroboran la importancia de la cinasa p38 en la replicación del MAYV.

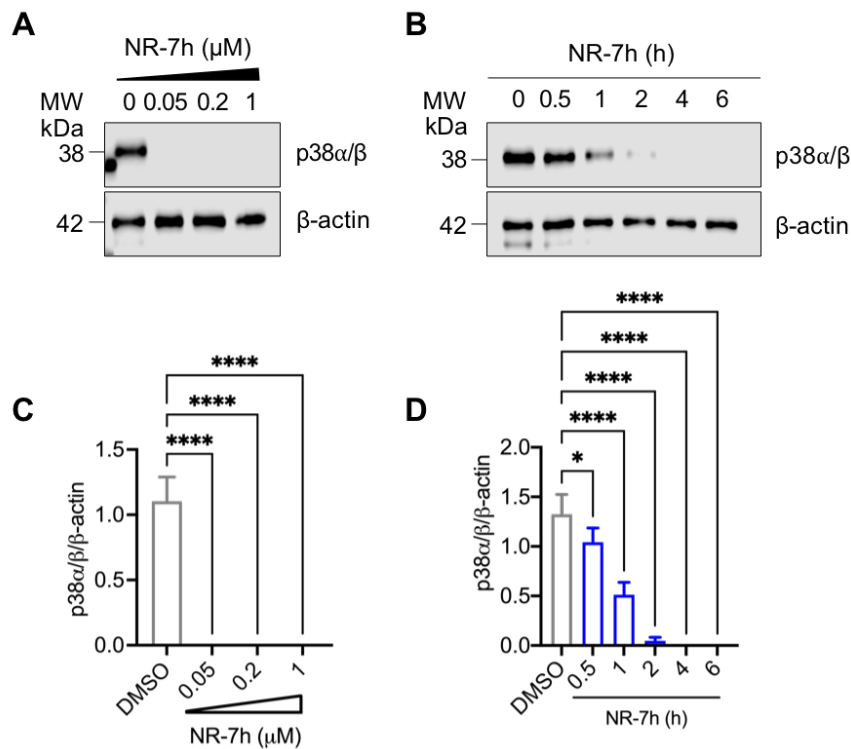


Figura 10. Eliminación de las isoformas p38 α y p38 β utilizando el compuesto PROTACs NR-7h en HDFs. (A) Las células HDFs se trataron con dosis crecientes de NR-7h; tras 24h de incubación, se analizaron los niveles de la proteína p38 α /p38 β mediante inmunoblot. La proteína β -actina se utilizó como control de carga. MW: peso molecular. kDa: kilodaltons. (B) Los HDFs se trataron con NR-7h a una concentración de 1 μ M; a distintos tiempos, se evaluaron los niveles de proteína p38 α /p38 β como se describió anteriormente. (C, D) El análisis densitométrico de las proteínas p38 α /p38 β se realizó utilizando el software ImageJ y se normalizó con la proteína β -actina. Las diferencias estadísticas se analizaron utilizando la prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba posterior de Dunnett: * $p < 0.05$ y **** $p < 0.0001$.

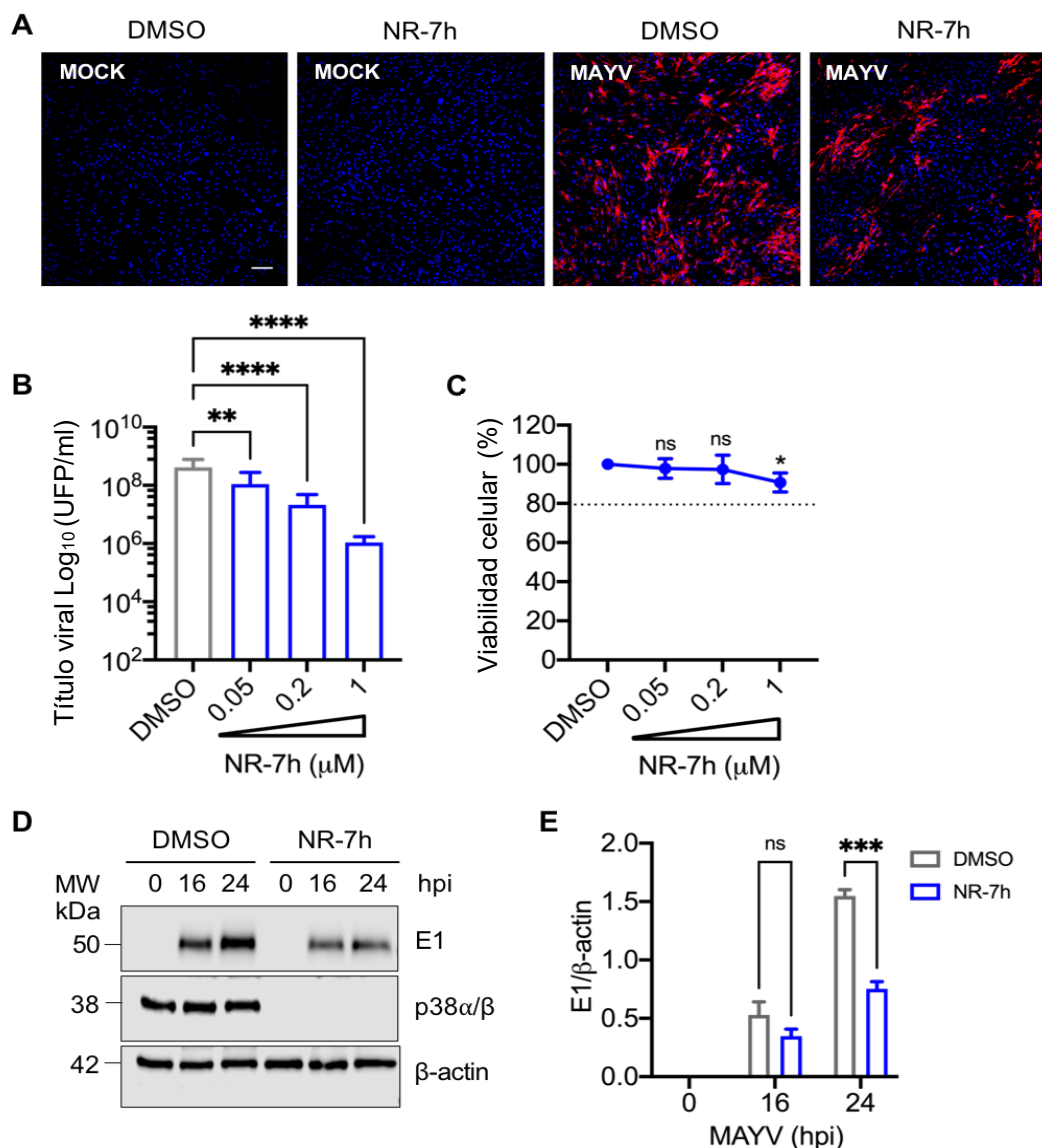


Figura 11. La degradación de las isoformas p38α y p38β inducida químicamente usando el compuesto PROTACs NR-7h afecta la replicación del MAYV. (A) Los HDFs se pretrataron con DMSO o NR-7h a una concentración de 1 μM durante 3h y luego las células se infectaron con MAYV como se indicó anteriormente. Después de 24h de infección, las células positivas para el antígeno del MAYV se analizaron usando un ensayo de inmunofluorescencia como se indicó anteriormente. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal y se analizaron con el software ImageJ. Barra de escala, 100 μm. (B) Los HDFs se pretrataron con concentraciones crecientes de NR-7h y luego se infectaron con el MAYV como se realizó anteriormente. Después de 24 h de infección, se evaluó la producción de progenie viral en los sobrenadantes de células usando el ensayo de formación de placas. Los títulos virales

se expresaron como unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL). **(C)** Los HDF se trataron con las concentraciones indicadas de NR-7h durante 24h y luego se determinó la viabilidad celular como se realizó anteriormente. La línea de puntos en el gráfico indica una viabilidad celular del 80%. **(D)** Los HDFs se trataron previamente con NR-7h y luego se infectaron como se indicó anteriormente. En distintos intervalos de tiempo, se analizaron los niveles de proteína viral E1 o p38 α /p38 β mediante inmunoblot. Se utilizó la proteína β -actina como control de carga. MW: peso molecular. kDa: kilodaltons. **(E)** Las bandas de intensidad de la proteína viral E1 se analizaron con el software ImageJ y se normalizaron con la proteína β -actina. Los datos se analizaron con la prueba ANOVA de una o dos vías seguida de la prueba posterior de Dunnett o Sidak. Las diferencias estadísticamente significativas se indican: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ y ns: no significativo.

Losmapimod, un inhibidor de p38 en evaluación clínica, disminuye la replicación del MAYV en HDFs

Diversas empresas farmacéuticas han desarrollado moléculas capaces de inhibir la actividad de la cinasa p38, debido a su implicación en múltiples patologías, entre ellas, enfermedades inflamatorias, trastornos neurodegenerativos y cáncer (Canovas y Nebreda, 2021; Coulthard et al., 2009; Cuenda, 2007). En un intento por explotar p38 como un potencial blanco terapéutico contra el MAYV, decidimos probar Losmapimod, un inhibidor altamente selectivo y potente contra las isoformas p38 α y p38 β , que ha sido evaluado en pacientes, mostrando ser seguro y tolerable a nivel clínico (Ino et al., 2015). Para investigar la posible actividad antiviral de Losmapimod contra el MAYV, los HDFs fueron pretratados con una concentración de 10 μ M de la droga o DMSO. Después, las células fueron infectadas como explicamos previamente y mediante la técnica de inmunofluorescencia detectamos el número de células positivas al antígeno del MAYV. En estos ensayos, observamos que el tratamiento con Losmapimod provocó una reducción del número de células positivas para el antígeno del MAYV, en comparación a la condición control (Fig. 12A). Con el fin de determinar si el compuesto Losmapimod afecta la replicación del MAYV, pretratamos los HDFs con dosis crecientes del inhibidor, las células se infectaron e incubaron durante 24 h en presencia de la droga o DMSO y al cabo de este periodo, los

sobrenadantes fueron colectados y sometidos al ensayo de formación de placas. Como se muestra en la Fig. 12B y C; hay una disminución de los títulos del MAYV, dependiente de la dosis del inhibidor y a su vez, las concentraciones probadas de Losmapimod son inocuas y no afectan la viabilidad en los HDFs. Por último, se evaluó el nivel de la proteína E1 del MAYV a distintos tiempos de infección en los HDFs tratados con Losmapimod y observamos una reducción en la expresión de la proteína viral E1 versus la condición tratada con DMSO (Fig. 12D y E). Todos estos resultados confirman que la cinasa p38 juega un papel importante en la replicación del MAYV y esta enzima podría ser un objetivo farmacológico clave para controlar la infección por el MAYV.

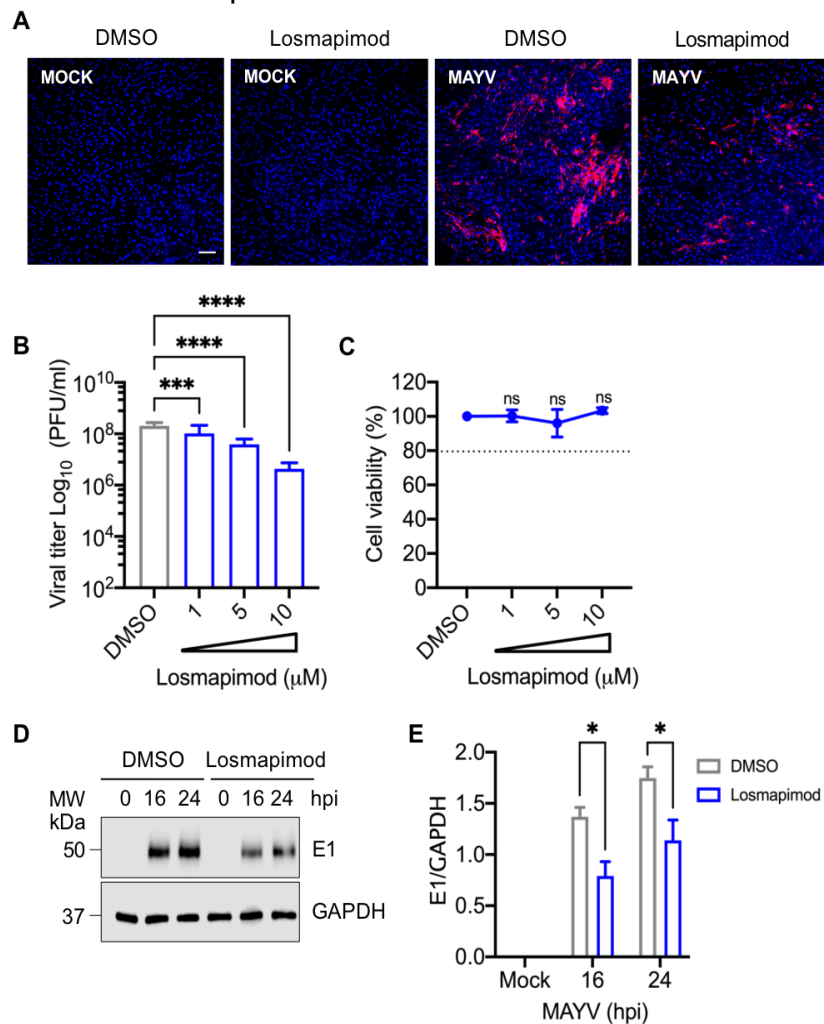


Figura 12. El tratamiento con Losmapimod reduce la replicación del MAYV de una manera dependiente de la dosis en HDFs. (A) Los HDFs cultivados en cubreobjetos de vidrio, se

pretrataron con Losmapimod a una concentración de 10 μ M o DMSO durante 1 h. Después de esto, las células se infectaron con el MAYV y se incubaron con DMSO o Losmapimod en medio fresco durante 24 h. Luego, se evaluaron las células positivas al antígeno del MAYV como se indicó anteriormente. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI. Las imágenes se capturaron con un microscopio confocal y se examinaron con el software ImageJ. Barra de escala, 100 μ m. **(B)** Los HDFs se pretrataron con Losmapimod a las concentraciones indicadas y luego, se infectaron como se indicó anteriormente. La producción de progenie viral en los sobrenadantes celulares recogidos a las 24 hpi se analizó usando el ensayo de formación de placas. Los títulos virales se expresaron como unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL). **(C)** Los HDFs se trataron con las concentraciones indicadas de Losmapimod y después de 24 h de incubación, se evaluó la viabilidad celular como se indicó anteriormente. La línea de puntos en el gráfico indica una viabilidad celular del 80%. **(D)** Se analizaron los niveles de la proteína viral E1 en HDFs tratadas con Losmapimod o sin tratar mediante inmunoblot. La proteína GAPDH se utilizó como control de carga. **(E)** El análisis densitométrico de la proteína viral E1 se realizó con el software ImageJ y se normalizó con la proteína GAPDH. Los datos se analizaron con la prueba ANOVA de una o dos vías seguida de la prueba posterior de Dunnett o Sidak. Se muestran las diferencias estadísticamente significativas: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ y ns: no significativo.

Papel de la familia de las cinasas PIM en la replicación del MAYV

Algunas líneas de investigación sugieren que esta familia de cinasas podría ser importante durante la replicación viral. No obstante, hasta donde conocemos, no hay estudios previos analizando el papel de las cinasas PIM en la replicación de los virus transmitidos por artrópodos. Por esta razón, decidimos llevar a cabo ensayos exploratorios, con el fin de evaluar el posible efecto de dos inhibidores de estas cinasas sobre el MAYV: el compuesto PIM1 Inh 2, que inhibe específicamente a la isoforma PIM1 (*Yin et al., 2012*) o la molécula AZD1208, un compuesto que inhibe a los tres miembros de las proteínas PIM, siendo ambos, inhibidores selectivos y competitivos de ATP (*Keeton et al., 2014*).

Evaluación de la viabilidad de células HeLa o HDFs tratados con las drogas PIM1 Inh 2 o AZD1208

Para evaluar el grado de toxicidad de los compuestos PIM1 Inh 2 o AZD1208 en nuestros modelos celulares, tratamos las células HeLa o los HDFs con dosis de 1, 5 o 10 μM de los distintos inhibidores. Al cabo de 24 o 48h de incubación, medimos la viabilidad celular a través del método de MTT. En estos ensayos encontramos con ambos compuestos una viabilidad celular superior al 85% luego del tratamiento, lo que indica que las dosis probadas de los inhibidores y el tiempo de incubación fueron bien toleradas en estas líneas celulares (Fig. 13A- D).

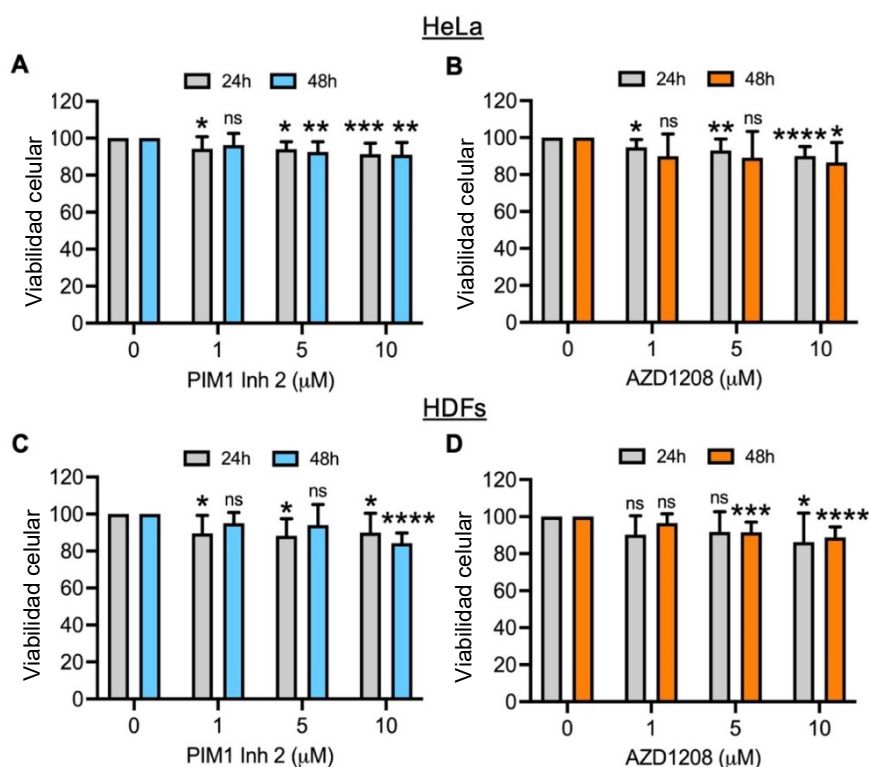


Figura 13. Toxicidad de los compuestos PIM1 inh 2 o AZD1208 en HDFs o células HeLa. Se trataron células HeLa (A, B) o HDFs (C, D) a las concentraciones indicadas de cada inhibidor o DMSO como control (0,1%), luego de 24 h de incubación, se evaluó la viabilidad celular utilizando el método MTT. Las diferencias estadísticamente significativas se evaluaron con la prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba posterior de Dunnett: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns: no significativo. Este análisis se realizó para cada tiempo de incubación del fármaco.

Los compuestos PIM1 Inh 2 y AZD1208 previenen parcialmente el efecto citopático inducido por el MAYV y reducen la producción de progenie viral en células HeLa y HDFs

El MAYV, al igual que otros alfavirus, induce un fuerte efecto citopático en distintas líneas celulares (*Sugasti-Salazar et al., 2021; Pezzi et al., 2019; Barroso et al., 2002*). En consecuencia, decidimos examinar si los inhibidores de las cinasas PIM ejercen un efecto protector sobre las células HeLa o los HDFs, respecto al daño producido por el MAYV. Para ello, pretratamos ambas líneas celulares durante 2 h con una dosis de 10 μ M de los inhibidores de las cinasas PIM o DMSO (al 0.1%). A continuación, retiramos los compuestos e infectamos las células con el MAYV. Al cabo de 1 h, retiramos el inóculo viral e incubamos con los tratamientos durante 48 h. Como se muestra en la Fig. 14 A, los HDFs experimentaron un fuerte efecto citopático, tras 48 h de infección (hpi) con el MAYV en la condición que fue tratada con DMSO. Por el contrario, los HDFs infectados y tratados con los inhibidores de las cinasas PIM: PIM1 Inh 2 o AZD1208, mostraron una protección parcial pero sustancial (Fig. 14A, panel inferior). En el caso de las células HeLa, hubo un menor efecto citopático después de las 48 hpi. A pesar de esto, observamos cierta protección en las células que fueron tratadas con los inhibidores de las cinasas PIM (Fig. 14A, panel superior). Para explorar el impacto de los inhibidores de las cinasas PIM en la producción de la progenie del MAYV, realizamos ensayos similares en el que las células HeLa o HDFs se trataron previamente con dosis crecientes de PIM1 Inh 2, AZD1208 o DMSO durante 2 h. Después, las drogas se eliminaron y ambas líneas celulares se infectaron con el MAYV. Luego de 1h de absorción del virus, se agregó medio fresco con los inhibidores de las cinasas PIM o DMSO y el rendimiento de las partículas virales en los sobrenadantes celulares se cuantificó después de 24 h de incubación, utilizando el ensayo de formación de placas. El resultado de este experimento mostró que PIM1 Inh 2 provocó una disminución en los títulos virales del MAYV, similar a la observada con AZD1208, de alrededor de 2 logaritmos, a la dosis máxima probada (10 μ M), lo que sugiere que la inhibición de la isoforma

PIM1 fue suficiente para bloquear la replicación del MAYV. Además, se comprobó que este efecto fue dependiente de la concentración de los inhibidores. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la replicación del MAYV disminuye de manera dependiente de la dosis probada de cualquiera de los compuestos analizados (Fig. 14B-E).

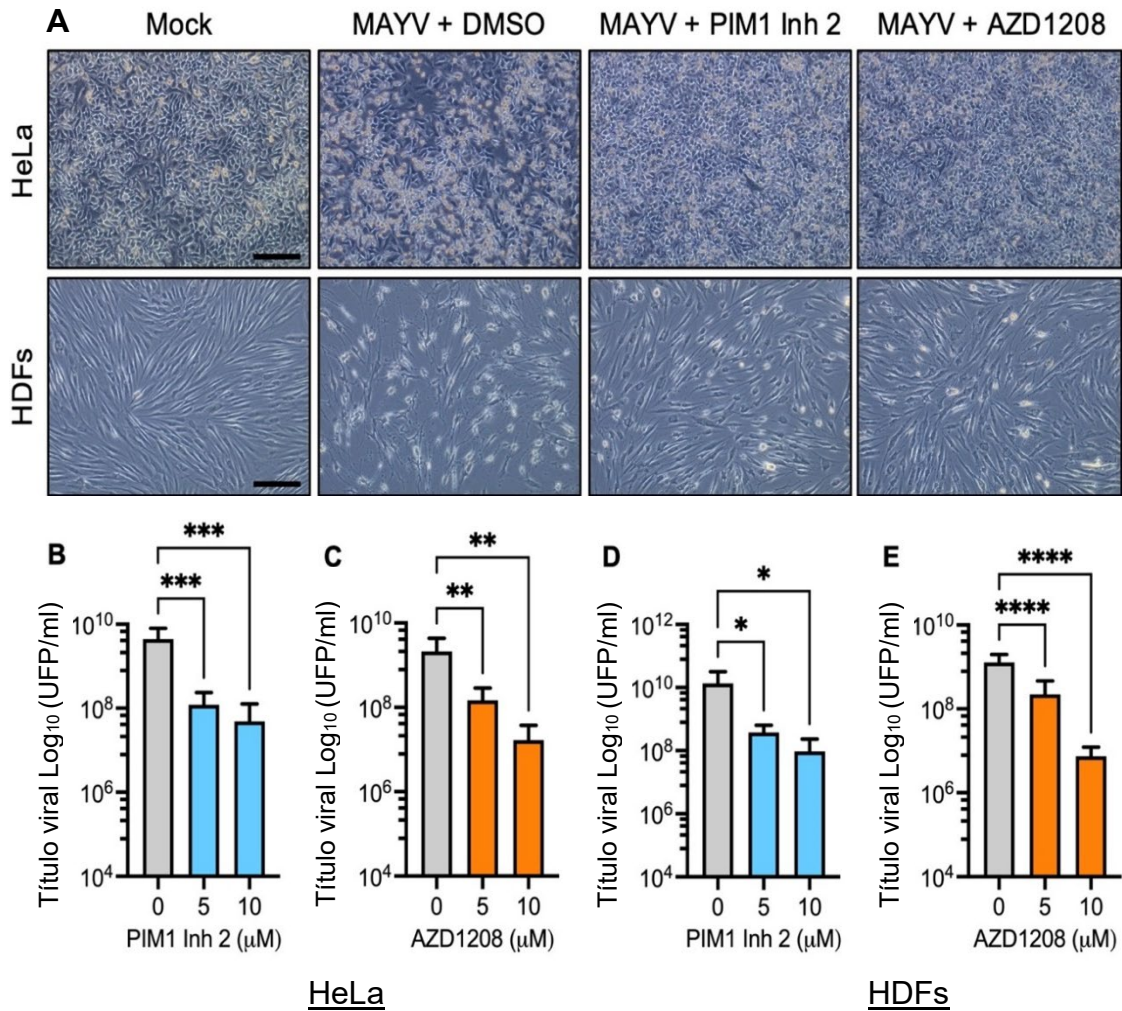


Figura 14. Los inhibidores de las cinasas PIM protegen a las células HeLa o HDFs del efecto citopático inducido por el virus y reducen la replicación del MAYV de manera dependiente de la dosis. (A) Las células HeLa o HDFs se pretrataron con PIM1 Inh 2 o AZD1208 a una concentración de 10 μ M durante 2 h. Se usó DMSO al 0,1% como control. Luego, los compuestos se eliminaron y las células se infectaron con la cepa de MAYV AVR0565 a una MOI de 1 (HDFs) o 10 (células HeLa) durante 48 h. El efecto citopático se evaluó con un microscopio invertido y una cámara MCI70-HD (Leica). Barra de escala: 100 μ m. (B, C) Células HeLa o HDFs (D, E) fueron

pretratadas con los inhibidores de las cinasas a las concentraciones indicadas y después, infectadas con el MAYV como explicamos previamente. Los títulos virales en los sobrenadantes celulares tras 24h de incubación, se evaluaron mediante el ensayo de formación de placas. Los títulos virales se representaron como unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/ml). Todos los datos se analizaron con la prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba posterior de Dunnett. Las diferencias estadísticas se denotan como: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns: no significativo.

Los inhibidores de las cinasas PIM no tienen efecto virucida sobre el MAYV

Para comprobar si el efecto de los inhibidores de las cinasas PIM podría deberse a una actividad directa sobre las partículas del MAYV, realizamos un ensayo de efecto virucida, en el cual se incubó 10^7 UFP del MAYV con los inhibidores de las cinasas PIM o DMSO, disueltos en medio MEM sin suero durante 2h a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, las soluciones con los virus fueron sometidos al ensayo de formación de placas y tinción con violeta de cristal. Nuestros resultados indicaron que los inhibidores de las cinasas PIM no presentaron actividad virucida sobre el MAYV, razón por la cual podemos decir que los compuestos están actuando sobre algún factor celular importante para el virus y no directamente sobre él (Fig. 15).

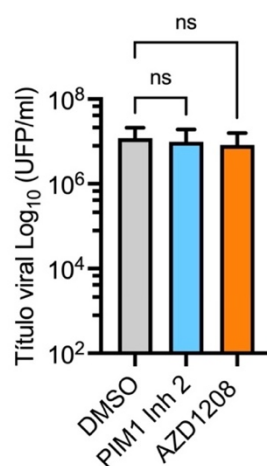


Figura 15. Las drogas PIM1 Inh 2 o AZD1208 no efectan directamente al virus Mayaro. Se incubaron 1×10^7 UFP del MAYV con los inhibidores de cinasas PIM en medio libre de suero durante 2 h a 37°C. A continuación, el virus se tituló directamente utilizando el ensayo de formación de placas. Los datos se analizaron con la prueba de Mann y Whitney. Las diferencias estadísticas se denotaron como: ns: no significativa.

El efecto antiviral de los inhibidores de las cinasas PIM es independiente de la cepa del MAYV evaluada

En los ensayos anteriores se utilizó la cepa del MAYV AVR0565 aislada en San Martín, Perú (1995), como modelo de estudio (*Powers et al., 2006*). Para confirmar que la actividad inhibitoria detectada con los inhibidores de cinasas PIM también ocurre en otras cepas del MAYV, investigamos los posibles efectos de estos compuestos sobre la replicación de la cepa TRVL 4675 (Condado de Mayaro, Trinidad y Tobago, 1954) o la cepa Guyane de Guayana Francesa, 1996; (*Powers et al., 2006*). En consecuencia, las células HeLa o los HDFs se trataron previamente con las drogas o DMSO y se infectaron como se mencionó anteriormente. Después de 24 h de incubación, se cuantificaron los títulos virales en los sobrenadantes celulares, utilizando el ensayo de formación de placas. Los estudios revelaron que tanto PIM1 Inh 2 como AZD1208, disminuyeron significativamente los títulos virales de MAYV en comparación con las células tratadas con DMSO, en cualquiera de las cepas probadas en ambas líneas celulares (Fig. 16A-H). Estos resultados corroboran que el efecto inhibitorio de las drogas que bloquean la actividad de las cinasas PIM sobre la replicación del MAYV es independiente de las cepas del MAYV analizadas.

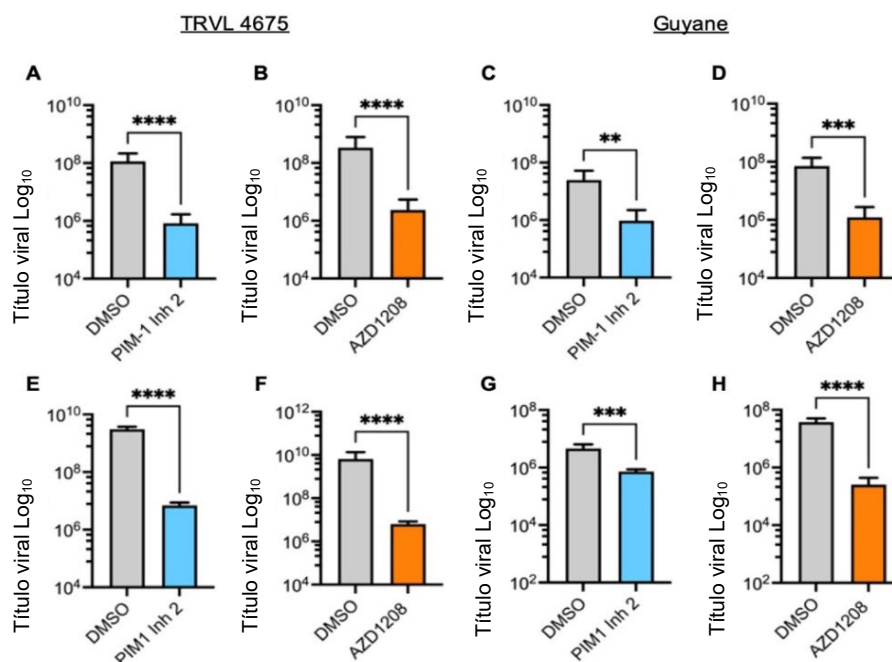


Figura 16. El efecto inhibitorio de las drogas que bloquean a las cinasas PIM, es independiente de la cepa de MAYV. Las células HeLa (A-D) o HDFs (E-H) se pretrataron con los inhibidores de las cinasas PIM o DMSO como se describió anteriormente. Luego, las células fueron infectadas con las cepas de MAYV TRVL 4675 o Guyane y se trataron con los compuestos durante 24h. A continuación, se evaluaron los títulos virales en los sobrenadantes de las células usando el ensayo de formación de placas. Los títulos virales se representaron como unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/ml). Los datos se analizaron con la prueba de Mann y Whitney. Las diferencias estadísticas se denotan como: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

La actividad inhibitoria del compuesto PIM1 Inh 2 o AZD1208 suprime la replicación del MAYV en una etapa tardía después de la absorción viral

Puesto que los experimentos de infección realizados anteriormente fueron llevados a cabo mediante el pretratamiento celular con los inhibidores de las cinasas PIM, quisimos analizar si el efecto antiviral de estos compuestos se mantiene después de la absorción del virus. Por lo tanto, realizamos un experimento de tiempo de adición, en el que cada compuesto se agregó a las células HeLa en los tiempos indicados después de la absorción viral. Luego de ello, las células se incubaron durante 24 h y a continuación, se evaluaron los títulos virales en los sobrenadantes de las células como se indicó anteriormente (Fig. 17A). Como se muestra en la Fig. 17, ambos compuestos pudieron disminuir la producción de progenie viral en las células HeLa hasta 8h después de la absorción del virus, lo que indica que la inhibición de las cinasas PIM afectan un paso clave posterior a la entrada en el ciclo de vida de MAYV (Fig. 17A-C).

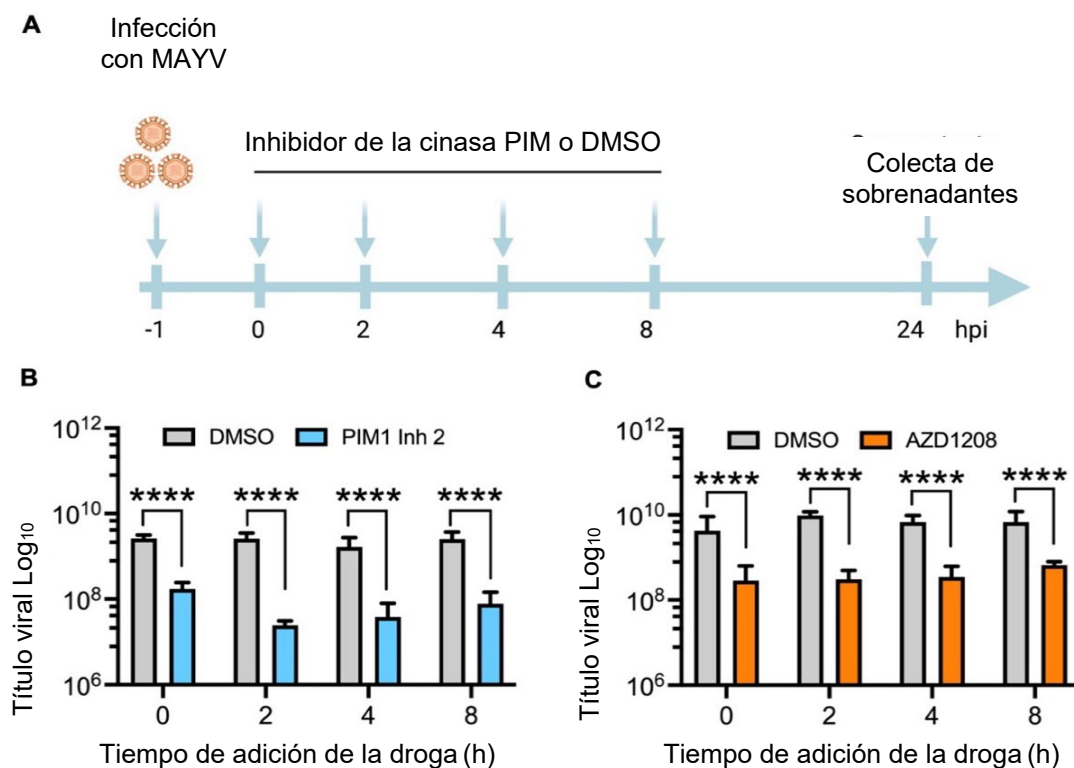
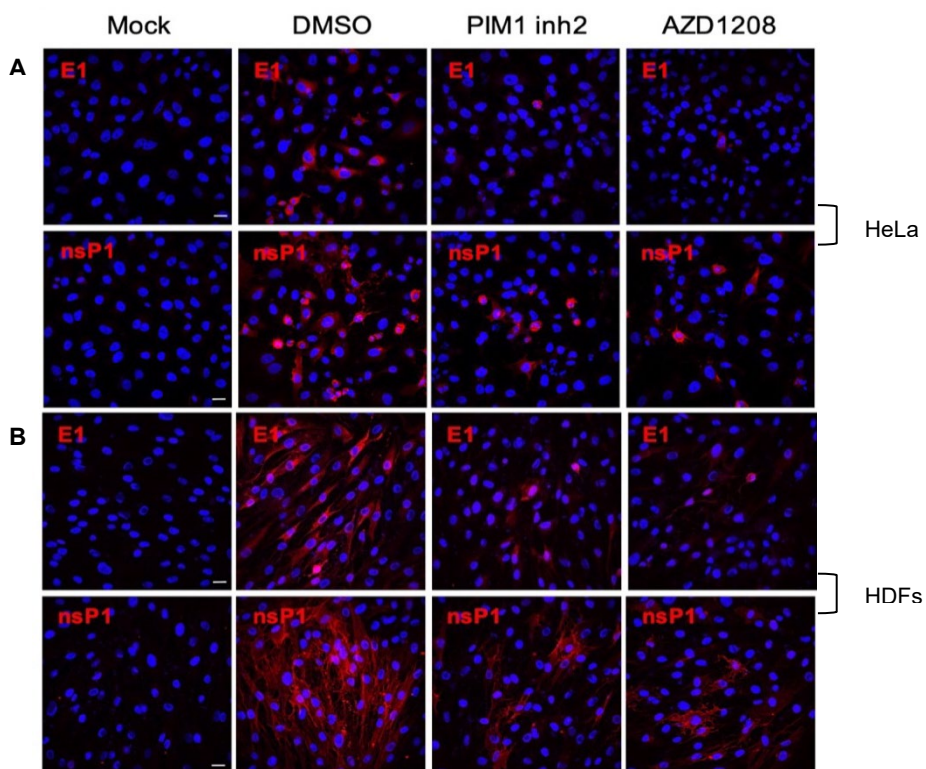


Figura 17. La inhibición de las cinasas PIM afecta la replicación del MAYV en una etapa tardía después de la absorción viral. (A) Diagrama que muestra el diseño del experimento de tiempo de adición en células HeLa tratadas con PIM1 Inh 2 o AZD1208. Este panel fue creado con Biorender.com. **(B, C)** Las células HeLa se infectaron con la cepa de MAYV AVR0565 a una MOI de 10. Después de 1h de absorción del virus, las células se trataron con inhibidores de cinasas PIM o DMSO en los tiempos indicados y luego se incubaron a 37°C durante 24 h. A continuación, se cuantificaron los títulos virales en los sobrenadantes de las células utilizando el ensayo de formación de placas. Los títulos virales se representaron como unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL). Los datos se analizaron con la prueba de Mann y Whitney. Las diferencias estadísticas se denotan como: **** $p < 0,0001$.

La expresión de la proteína estructural E1 y no estructural nsP1 de MAYV, se reduce en presencia de los inhibidores de las cinasas PIM

Nuestros resultados previos sugieren que los inhibidores de las cinasas PIM estaban afectando un paso crucial posterior a la entrada del virus, en el ciclo de replicación del MAYV. Por lo cual, investigamos el posible efecto de estos compuestos sobre la expresión de las proteínas virales E1 y nsP1 del MAYV. Así, utilizamos un microscopio confocal de inmunofluorescencia para evaluar la presencia de estas proteínas virales en células HeLa o HDFs tratadas o no con

las drogas que inhiben la actividad de PIM durante 24 h. Para ello, las células fueron pretratadas, infectadas e incubadas durante 24 h siguiendo el procedimiento detallado en la metodología. Nuestros resultados indican que el tratamiento con los inhibidores de las cinasas PIM fomentan una disminución importante de las células positivas para ambas proteínas virales en comparación con las células que se trataron con DMSO y este efecto fue similar en ambas líneas celulares (Fig. 18A, B). Para caracterizar aún más los hallazgos anteriores, realizamos un experimento de cinética de infección y en diferentes períodos de tiempo evaluamos los niveles de las proteínas virales utilizando inmunoblot. En estos experimentos, detectamos una clara caída en los niveles de cualquiera de las proteínas virales en ambas líneas celulares tratadas con los inhibidores de cinasas PIM (Fig. 18C-F). En conjunto, nuestros resultados muestran que los inhibidores de las cinasas PIM (inh 2 de PIM1 y AZD1208) promueven una supresión considerable de la expresión de las proteínas virales E1 y nsP1 del MAYV.



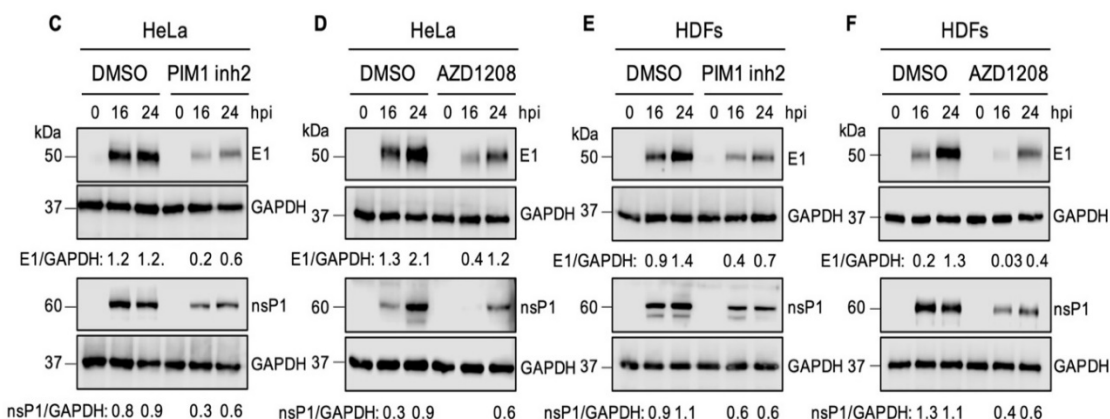


Figura 18. Los inhibidores de las cinasas PIM reducen la expresión de las proteínas E1 y nsP1 del MAYV. Las células HeLa (A) o HDFs (B) se trataron previamente con inhibidores de cinasas PIM o DMSO y después, se infectaron con la cepa de MAYV AVR0565 como se indicó anteriormente. Tras 24h de infección, las células positivas para las proteínas E1 y nsP1 se analizaron mediante un ensayo de inmunofluorescencia. Barra de escala: 20 μ m. El experimento de cinética de infección se realizó en células HeLa (C, D) o HDFs (E, F) tratadas con los inhibidores de las cinasas PIM o DMSO para evaluar los niveles de proteínas E1 y nsP1 de MAYV mediante inmunoblot. La proteína GAPDH se usó como control de carga. kDa: kilodaltons. El análisis densitométrico de las proteínas E1 y nsP1 se realizó con el software ImageJ y se normalizó con la proteína GAPDH.

Los inhibidores de las cinasas PIM reducen también la replicación de los virus emergentes Una (UNAV) y Zika (ZIKV)

Existen pocos estudios evaluando la inhibición de las PIM cinasas como una estrategia antiviral. Sin embargo, se ha reportado que la inhibición de la familia de cinasas PIM afecta la replicación de HRV-16, HCV y SVCV (*Pereiro et al., 2020; Park et al., 2015*). Para explorar si los inhibidores de las cinasas PIM podrían afectar la replicación de otros arbovirus emergentes, decidimos probar el efecto de estos compuestos en los alfavirus Chikungunya (CHIKV) y Una (UNAV); y el Flavivirus Zika (ZIKV). Para ello, pretratamos las células Vero con Inh 2 de PIM1, AZD1208 o DMSO y a continuación infectamos las células con CHIKV, UNAV o ZIKV; a las 24h de incubación, se evaluaron los títulos virales en los sobrenadantes de las células usando el ensayo de formación de placas. Como se muestra en la Fig. 19, ambos compuestos fueron capaces de reducir la replicación

de UNAV y ZIKV mientras que en el CHIKV, los inhibidores de cinasas PIM no mostraron ningún efecto (Fig. 19A-F). El efecto antiviral que producen los inhibidores de las cinasas PIM en UNAV o ZIKV no parece estar asociado con la toxicidad celular de estos compuestos (Fig. 19G). Estos hallazgos revelan que los inhibidores de las cinasas PIM también muestran actividad antiviral contra otros arbovirus como UNAV y ZIKV; sugiriendo que esta familia de proteínas, podría representar un posible blanco antiviral de amplio espectro.

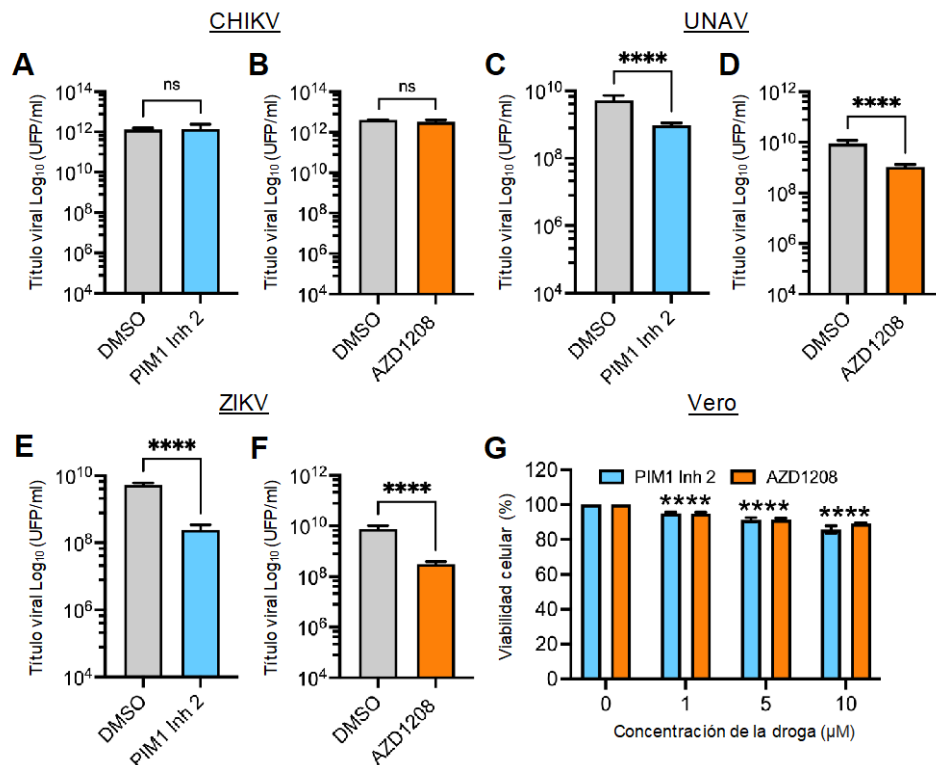


Figura 19. Los inhibidores de las cinasas PIM también bloquean la replicación de los arbovirus emergentes UNAV y ZIKV. Las células Vero se pretrataron con los inhibidores de las cinasas PIM o DMSO durante 2h. Luego, los compuestos se retiraron y las células se infectaron con CHIKV (**A, B**), UNAV (**C, D**) o ZIKV (**E, F**) a una MOI de 1. Después de 1 h de absorción del virus, se eliminaron los inóculos virales y las células se trataron e incubaron durante 24 h. A continuación, se cuantificaron los títulos virales como se indicó anteriormente. Los títulos virales se representaron como unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL). (**G**) Las células Vero se trataron con las concentraciones indicadas de PIM1 Inh 2 o AZD1208 durante 48 h. Se usó DMSO al 0,1% como control. La viabilidad celular se determinó usando el método MTT como se realizó anteriormente. Los datos se analizaron con la prueba de Mann & Whitney o la prueba

ANOVA de una vía seguida de la prueba posterior de Dunnett. Las diferencias estadísticas se denotan como: **** $p < 0,0001$; ns: no significativo.

DISCUSIÓN

El MAYV es un arbovirus emergente, el cual ha sido poco caracterizado, pero con una creciente actividad registrada en la región de América Latina (*Ganjan y Riviere-Cinnamond, 2020*). Existen evidencias de que los mosquitos urbanos como *Aedes aegypti* o *Aedes albopictus* tienen la capacidad de transmitir este virus (*Dieme et al., 2020; Pereira et al., 2020*) y a pesar de su potencial para causar epidemias a gran escala, como ocurrió antes con CHIKV o ZIKV (*Pereira et al., 2021*), no existen vacunas ni compuestos antivirales aprobados para combatir este patógeno (*Acosta-Ampudia et al., 2018*). El MAYV, al igual que otros virus, necesita manipular una serie de procesos celulares del huésped para poder replicarse con éxito (*Llamas-González et al., 2019; El-Bacha et al., 2004; Barroso et al., 2002*). Por lo tanto, una estrategia razonable para descubrir posibles tratamientos consiste en identificar vías celulares o proteínas requeridas para la replicación del MAYV. Con respecto a esto, las cinasas son enzimas que regulan funciones vitales de las células y también parecen desempeñar un papel crucial en la replicación de algunos virus (*Beziau et al., 2020; Rauch et al., 2011*).

Las MAPKs p38, JNK y ERK1/2 son enzimas que regulan funciones celulares esenciales y han surgido como factores celulares cruciales implicados en diferentes etapas del ciclo viral. Además, varios autores han propuesto que la inhibición de estas enzimas podría representar una alternativa terapéutica antiviral (*Grimes y Grimes, 2020; Zhang et al., 2017; Voss et al., 2014; Keating y Striker, 2012*).

En este estudio, se analizó el impacto de inhibir las vías de las MAPK p38, JNK y ERK1/2 en la replicación del MAYV, usando dos modelos celulares de infección: células primarias HDFs o células HeLa. Para ello, se usó los inhibidores de la familia de las MAPKs SB203580, SP600125 o U0126. Estos resultados indican que el inhibidor de p38 SB203580 promueve una reducción significativa dependiente de la dosis en los títulos del MAYV tanto en HDFs como en células HeLa. Por otro lado, la inhibición de las vías JNK o ERK1/2 promovida por

SP600125 o U0126, respectivamente, solo parece afectar levemente la replicación del MAYV en células HeLa. Es importante destacar que los efectos observados de los inhibidores de las MAPKs en la replicación de MAYV, no parecen ser el resultado de la actividad virucida de estos compuestos. Informes anteriores han demostrado que la inhibición de p38 afecta la replicación de virus de diferentes familias, entre ellos: enterovirus 71, virus de la hepatitis C, virus de la influenza, CHIKV y SARS-CoV-2 (*Cheng et al., 2020; Bouhaddou et al., 2020; Nayak et al., 2019; Zhang et al., 2017; Börgeling et al., 2014*).

En un intento por explorar un posible mecanismo por el cual los inhibidores de las MAPKs afectan la replicación del MAYV, analizamos la expresión de la proteína estructural E1 en HDFs o células HeLa tratadas con estos compuestos. Nuestros datos revelan que el inhibidor de p38, el compuesto SB203580 promueve una atenuación significativa de la expresión de la proteína viral E1 en ambas líneas celulares analizadas. Por el contrario, solo se observó una ligera reducción en la expresión de la proteína viral E1 luego de la inhibición de las vías JNK o ERK1/2, lo que sugiere nuevamente que p38 puede tener una función importante en la replicación del MAYV. Estos hallazgos están de acuerdo con estudios previos que muestran que el bloqueo de la actividad de p38 puede reducir la expresión de varias proteínas virales (*Bouhaddou et al., 2020; Cheng et al., 2020; Peng et al., 2014*).

Para probar aún más la importancia de p38 en el proceso de replicación del MAYV, se realizó un experimento de eliminación de las isoformas p38 α y p38 β en HDFs infectados con el MAYV utilizando un nuevo tipo de moléculas conocidas como PROTRACs. La tecnología PROTAC permite que cualquier proteína sea objeto de degradación a través de un mecanismo dependiente del sistema ubiquitina-proteosoma (*Sun et al., 2019*). Recientemente, Donoghue y colaboradores (*Donoghue et al., 2020*), demostraron que el compuesto PROTAC NR-7h es capaz de inducir la degradación de las isoformas p38 α y p38 β , bloqueando así la señalización de p38 corriente abajo. De manera similar, estos datos revelan que la eliminación de las isoformas p38 α y p38 β en los HDFs

tratados con NR-7h promueve una disminución de las células positivas al antígeno del MAYV y los títulos virales, de manera dependiente de la dosis. Además, se observó una disminución en la expresión de la proteína viral E1, lo que confirma que p38 podría desempeñar un papel importante en la replicación del MAYV. Estudios anteriores han demostrado que los compuestos PROTACs, dirigidos directamente a varias proteínas virales, podrían ser una estrategia terapéutica antiviral (*de Wispelaere et al., 2019; Montrose y Krissansen, 2014*).

Dado al papel destacado de la cinasa p38 en el control de una plétora de procesos celulares, su desregulación se ha asociado con numerosas patologías (*Canovas y Nebreda, 2021*). Por lo tanto, la industria farmacéutica ha desarrollado diversas moléculas inhibitoras dirigidas a esta cinasa (*Coulthard et al., 2009*). Entre ellos, Losmapimod, un potente inhibidor de las isoformas p38 α y p38 β que ha sido evaluado en diferentes ensayos clínicos y ha demostrado ser bien tolerado y seguro (*O'Donoghue et al., 2016; Ino et al., 2015*). Para validar estos hallazgos anteriores, se trató a los HDFs con el compuesto Losmapimod y luego, se evaluó su impacto sobre la replicación del MAYV. Estos resultados indican nuevamente que la inhibición de la cinasa p38 con este fármaco afecta la replicación de MAYV de manera dependiente de la dosis. Además, se observó una reducción en la expresión de la proteína viral E1, lo que sugiere que p38 podría servir como un objetivo terapéutico para controlar la infección por MAYV. Zhang y col. (*X. Zhang et al., 2019*) demostraron que Losmapimod es capaz de inhibir la entrada del virus Lassa, aunque a través de un mecanismo que no implica la inhibición de p38. En otro estudio, se demostró que Losmapimod interrumpe la replicación del SARS-CoV-2 en un modelo de células epiteliales alveolares primarias, lo que sugiere que p38 es un objetivo potencial para el tratamiento de COVID-19 (*Hekman et al., 2020*). De hecho, Losmapimod se está probando actualmente en un ensayo clínico con pacientes infectados con COVID-19 (*Canovas y Nebreda, 2021*).

Aunque nuestros análisis *in vitro* apuntan a la cinasa p38 como un objetivo celular probable para tratar la infección por el MAYV, estos hallazgos deben corroborarse en estudios exhaustivos en animales para determinar la viabilidad

de usar inhibidores de p38 como medicamentos antivirales. Sin embargo, en base a estos resultados, proponemos que la cinasa p38 juega un papel clave en la replicación del MAYV y se destacó esta MAPK como una diana terapéutica candidata para combatir la infección por el MAYV.

Las cinasas PIM, son otra familia proteínas que controlan actividades celulares importantes, entre ellas: proliferación, supervivencia, metabolismo y migración (*Santio y Koskinen, 2017*). Además, estas cinasas están implicadas en diferentes condiciones patológicas, como neoplasias malignas hematológicas y tumores sólidos. Se ha descrito que su desregulación está asociado con un mal pronóstico en los pacientes (*Toth y Warfel, 2021; Stafman et al., 2019*). Debido a esto, las cinasas PIM se han convertido en un objetivo atractivo para el tratamiento del cáncer (*Toth y Warfel, 2021; Zhang et al., 2018*). Hay muy pocos estudios analizando a las cinasas PIM como posibles dianas antivirales (*Pereiro et al., 2020; Park et al., 2015*). Por esta razón, se decidió evaluar el impacto de la inhibición de este grupo de proteínas en la replicación del MAYV y otros arbovirus. Estos resultados indican que el tratamiento de células HeLa o HDFs con los inhibidores de cinasas PIM, PIM1 Inh 2, que bloquea la actividad de la isoforma PIM1 o AZD1208, un inhibidor de cinasas pan-PIM que inhibe todas las isoformas (PIM1-3), promovió una protección celular parcial, pero importante del efecto citopático inducido por el MAYV. Además, observamos una reducción significativa dependiente de la dosis, en la producción de la progenie del MAYV, en ambas líneas celulares tratadas con los inhibidores de las cinasas PIM en comparación con las células tratadas con DMSO. Notablemente, la inhibición de la isoforma PIM1 fue suficiente para promover una disminución en los títulos del virus, lo que sugiere que esta isoforma es relevante para la replicación del MAYV. Adicional a esto, se comprobó que la actividad de inhibición observada, por parte de los compuestos que bloquean a PIM, no parece estar asociada con un efecto virucida directo sobre las partículas del MAYV, ni afectando la viabilidad celular. Al mismo tiempo, para demostrar aún más la importancia de la inhibición de las cinasas PIM en la replicación del MAYV, analizamos el efecto de estos compuestos en otras

cepas del MAYV, entre ellas, TRVL 4675 y Guyane. En estos experimentos, encontramos una clara disminución en la replicación del MAYV independientemente de la cepa de virus probada. En conjunto, estos hallazgos sugieren que estas proteínas pueden ser factores relevantes en la replicación del MAYV. Nuestros resultados están de acuerdo con informes anteriores que indican que la inhibición de las cinasas PIM puede afectar la replicación de los virus (*de Vries et al., 2015; Park et al., 2015*).

Con el fin de explorar si la actividad anti-MAYV de los inhibidores de las cinasas PIM permanece después de la absorción viral, se realizó un experimento de tiempo de adición con las drogas para abordar esta pregunta. Estos análisis revelaron que ambos compuestos pudieron reducir la replicación del MAYV hasta 8 h después de la absorción viral en células HeLa, lo que indica que la inhibición química de las proteínas PIM impacta en un paso clave posterior a la entrada en el ciclo de vida del MAYV. En consecuencia, decidimos evaluar el efecto de los inhibidores de las cinasas PIM en la expresión de las proteínas virales E1 y nsP1, mediante ensayos de inmunofluorescencia e inmunoblot. Nuestros resultados del análisis de microscopía confocal indican que el tratamiento con los inhibidores de las cinasas PIM, provocó una reducción importante de las células positivas para las proteínas E1 y nsP1 del MAYV, en ambas líneas celulares analizadas. Asimismo, el experimento de cinética de infección mostró que los niveles de ambas proteínas virales se redujeron en las células tratadas con estos fármacos, lo que sugiere que el bloqueo de las cinasas PIM afecta la expresión de las proteínas del MAYV. Se observaron resultados similares en células Huh7.5 pretratadas con el inhibidor de pan-PIM cinasas, SGI-1776, que promovió una reducción de las proteínas NS5A, NS3 y Core del VHC de manera dependiente de la dosis (*Park et al., 2015b*).

Habiendo demostrado que los inhibidores de las cinasas PIM reducen la replicación del MAYV, decidimos evaluar si estos compuestos podrían alterar la replicación de otros arbovirus emergentes o reemergentes. De este modo, las células Vero se pretrataron con los inhibidores de las cinasas PIM o DMSO, se

infectaron con CHIKV, UNAV o ZIKV y tras 24 h de incubación con estos compuestos, se determinaron los títulos virales como se explicó anteriormente. Estos experimentos demostraron que los inhibidores de las cinasas PIM también afectan la replicación de UNAV y ZIKV, lo que indica que las cinasas PIM podrían ser posibles objetivos antivirales de amplio espectro.

Aunque los inhibidores de las cinasas PIM, utilizados en este trabajo, aún no han sido aprobados para su uso en humanos, AZD1208, ha demostrado ser eficaz en modelos preclínicos de leucemia mieloide aguda (*Keeton et al., 2014*). Sin embargo, el uso de estas moléculas para el tratamiento de infecciones virales, al igual que las drogas antes estudiadas, requieren análisis adicionales en modelos de infección en animales para demostrar su eficacia y seguridad como fármacos antivirales. Este estudio revela por primera vez, que las cinasas PIM podrían representar un objetivo antiviral para el MAYV y otros arbovirus emergentes.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y

RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de este estudio son:

- Los inhibidores SB203580 y U0126 son inocuos a las concentraciones probadas en HDFs y células HeLa. Sin embargo, el compuesto SP600125, resultó ser citotóxico a la mayor concentración probada, por lo cual se decidió utilizar una dosis menor.
- El tratamiento con el compuesto SB203580 afecta la replicación del virus Mayaro de forma significativa. Adicional, se confirmó que este efecto es dosis dependiente tanto en HDFs como en células HeLa.
- Ninguno de los inhibidores de las MAPK probados en este estudio poseen actividad virucida aparente contra el MAYV.
- El bloqueo químico de la cinasa p38, promovido por el compuesto SB203580, conduce a una reducción significativa en los niveles de la proteína E1 del MAYV en HDFs y células HeLa.
- No se detectó presencia de las isoformas p38 α y p38 β en células de piel humanas que fueron tratadas a partir de 2 h, con pequeñas concentraciones del compuesto NR-7h.
- Se observó una clara reducción de células positivas al antígeno del MAYV y una disminución de los títulos virales en presencia de la molécula PROTACs NR-7h, siendo este efecto dependiente de la dosis utilizada. Además, la droga NR-7h actúa sin afectar la viabilidad celular de los HDFs.
- La eliminación química de p38 α /p38 β con NR-7h tiene un efecto negativo sobre la expresión de la proteína viral E1 del MAYV en HDFs.
- Losmapimod, un fármaco utilizado a nivel clínico, reduce el número de células positivas del MAYV y afecta la producción de su progenie viral, siendo las concentraciones probadas, inocuas para los HDFs.
- Se observó una reducción en la expresión de la proteína E1 del MAYV en células tratadas con el compuesto Losmapimod.

- La viabilidad de las células HeLa, HDFs o Vero en presencia de los compuestos PIM1 Inh 2 y AZD1208 es superior al 85%, tras 48 h de tratamiento.
- Las drogas PIM1 Inh 2 y AZD1208, que inhiben la actividad de las cinasas PIM, brindan un efecto protector celular notorio en HDFs, tras su infección por el MAYV. A su vez, la producción de la progenie viral de Mayaro se ve afectada por la presencia de los inhibidores en ambas líneas celulares probadas.
- Los inhibidores de las cinasas PIM no presentan actividad virucida contra el MAYV.
- El efecto inhibitorio de los compuestos PIM1 Inh 2 y AZD1208 afecta la replicación del MAYV y este efecto es además, independiente de las cepas de analizadas.
- El tratamiento con los inhibidores de PIM afecta la replicación del MAYV en una etapa tardía tras la absorción viral.
- La expresión de las proteínas E1 y nsP1 de MAYV se reduce considerablemente en células tratadas con los compuestos que suprimen la actividad de las cinasas PIM.
- Los compuestos PIM1 Inh 2 y AZD1208 exhiben actividad antiviral contra otros arbovirus como UNAV y ZIKV.
- Nuestros hallazgos muestran que moléculas químicas capaces de inhibir dos grupos importantes de familias de cinasas, presentan actividad antiviral contra el MAYV y otros arbovirus.

RECOMENDACIONES

- Es importante continuar con investigaciones que aporten información sobre enfermedades infecciosas emergentes en Panamá.
- La exploración de moléculas capaces de bloquear la actividad de factores celulares que afecten la replicación de varios virus, generan nuevas expectativas en el contexto del desarrollo de nuevos fármacos.
- Se deben explorar los posibles mecanismos por los cuales estos compuestos reducen los títulos virales y la expresión protéica de MAYV.
- Estudios a nivel clínico son necesarios para evaluar la efectividad y tolerancia de estos compuestos en modelos animales y humanos.

BIBLIOGRAFÍA

- A Cuenda, S. R. (2007). p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1773, 1358–1375.
- Abad-Franch, F., Grimmer, G. H., Paula, V. S. de, Figueiredo, L. T. M., Braga, W. S. M., & Luz, S. L. B. (2012). Mayaro Virus Infection in Amazonia: A Multimodel Inference Approach to Risk Factor Assessment. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(10), e1846. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0001846>
- Acosta-Ampudia, Y., Monsalve, D. M., Rodríguez, Y., Pacheco, Y., Anaya, J. M., & Ramírez-Santana, C. (2018a). Mayaro: an emerging viral threat? *Emerging Microbes and Infections*, 7(1), 163. 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0163-5>
- Aguilar-Luis, M. A., del Valle-Mendoza, J., Silva-Caso, W., Gil-Ramirez, T., Levy-Blitchtein, S., Bazán-Mayra, J., Zavaleta-Gavidia, V., Cornejo-Pacherres, D., Palomares-Reyes, C., & del Valle, L. J. (2020). An emerging public health threat: Mayaro virus increases its distribution in Peru. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 92, 253–258. <https://doi.org/10.1016/J.IJID.2020.01.024>
- Amorim, R., de Meneses, M. D. F., Borges, J. C., da Silva Pinheiro, L. C., Caldas, L. A., Cirne-Santos, C. C., de Mello, M. V. P., de Souza, A. M. T., Castro, H. C., de Palmer Paixão, I. C. N., Campos, R. de M., Bergmann, I. E., Malirat, V., Bernardino, A. M. R., Rebello, M. A., & Ferreira, D. F. (2017). Thieno[2,3-b] pyridine derivatives: a new class of antiviral drugs against Mayaro virus. *Archives of Virology*, 162(6), 1577–1587. <https://doi.org/10.1007/S00705-017-3261-0>
- Anderson, C. R., Wattley, G. H., Ahin, N. W., Downs, W. G., & Reese, A. A. (1957a). Mayaro Virus: A New Human Disease Agent. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 6(6), 1012–1016. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1957.6.1012>
- Assunção-Miranda, I., Cruz-Oliveira, C., & da Poian, A. T. (2013). Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of alphavirus-induced arthritis. *BioMed Research International*, 2013, 973516. <https://doi.org/10.1155/2013/973516>
- Auguste, A. J., Liria, J., Forrester, N. L., Giambalvo, D., Moncada, M., Long, K. C., Morón, D., de Manzione, N., Tesh, R. B., Halsey, E. S., Kochel, T. J., Hernandez, R., Navarro, J. C., & Weaver, S. C. (2015). Evolutionary and ecological characterization of mayaro virus strains isolated during an outbreak, Venezuela, 2010. *Emerging Infectious Diseases*, 21(10), 1742–1750. <https://doi.org/10.3201/eid2110.141660>
- Azar, S. R., Campos, R. K., Bergren, N. A., Camargos, V. N., & Rossi, S. L. (2020). Epidemic Alphaviruses: Ecology, Emergence and Outbreaks.

- Microorganisms* 2020, Vol. 8, Page 1167, 8(8), 1167.
<https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8081167>
- Barroso, M. M. S., Lima, C. S., Silva-Neto, M. A. C., & da Poian, A. T. (2002). Mayaro virus infection cycle relies on casein kinase 2 activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296(5), 1334–1339. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02093-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02093-4)
- Bennett, B. L., Sasaki, D. T., Murray, B. W., O’Leary, E. C., Sakata, S. T., Xu, W., Leisten, J. C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., Bhagwat, S. S., Manning, A. M., & Anderson, D. W. (2001). SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), 13681–13686. <https://doi.org/10.1073/pnas.251194298>
- Beziau, A., Brand, D., & Piver, E. (2020). The role of phosphatidylinositol phosphate kinases during viral infection. *Viruses*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/V12101124>
- Blohm, G., Elbadry, M. A., Mavian, C., Stephenson, C., Loeb, J., White, S., Telisma, T., Chavannes, S., Rochar, V. M. B. De, Salemi, M., Lednicky, J. A., & Morris, J. G. (2019). Mayaro as a Caribbean traveler: Evidence for multiple introductions and transmission of the virus into Haiti. *International Journal of Infectious Diseases*, 87, 151–153. <https://doi.org/10.1016/J.IJID.2019.07.031>
- Börgeling, Y., Schmolke, M., Viemann, D., Nordhoff, C., Roth, J., & Ludwig, S. (2014). Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase impairs influenza virus-induced primary and secondary host gene responses and protects mice from lethal H5N1 infection. *Journal of Biological Chemistry*, 289(1), 13–27. <https://doi.org/10.1074/JBC.M113.469239>
- Bouhaddou, M., Memon, D., Meyer, B., White, K. M., Rezelj, V. v., Correa Marrero, M., Polacco, B. J., Melnyk, J. E., Ulferts, S., Kaake, R. M., Batra, J., Richards, A. L., Stevenson, E., Gordon, D. E., Rojc, A., Obernier, K., Fabius, J. M., Soucheray, M., Miorin, L., ... Krogan, N. J. (2020). The Global Phosphorylation Landscape of SARS-CoV-2 Infection. *Cell*, 182(3), 685-712.e19. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.06.034>
- Bouquillard, É., & Combe, B. (2009). A report of 21 cases of rheumatoid arthritis following Chikungunya fever. A mean follow-up of two years. *Joint Bone Spine*, 76(6), 654–657. <https://doi.org/10.1016/J.JBSPIN.2009.08.005>
- Brasó-Maristany, F., Filosto, S., Catchpole, S., Marlow, R., Quist, J., Francesch-Domenech, E., Plumb, D. A., Zakka, L., Gazinska, P., Liccardi, G., Meier, P., Gris-Oliver, A., Cheang, M. C. U., Perdrix-Rosell, A., Shafat, M., Noël, E., Patel, N., McEachern, K., Scaltriti, M., ... Tutt, A. N. (2016). PIM1 kinase regulates cell death, tumor growth and chemotherapy response in triple-negative breast cancer. *Nature Medicine*, 22(11), 1303–1313. <https://doi.org/10.1038/NM.4198>
- Briata, P., Forcales, S. V., Ponassi, M., Corte, G., Chen, C. Y., Karin, M., Puri, P. L., & Gherzi, R. (2005). p38-dependent phosphorylation of the mRNA

- decay-promoting factor KSRP controls the stability of select myogenic transcripts. *Molecular Cell*, 20(6), 891–903. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2005.10.021>
- Bronzoni, R. V. M., Moreli, M. L., Cruz, A. C. R., & Figueiredo, L. T. M. (2004). Multiplex nested PCR for Brazilian Alphavirus diagnosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(8), 456–461. <https://doi.org/10.1016/J.TRSTMH.2003.09.002>
- Brunetti, J. E., Foscaldi, S., Quintana, V. M., Scolaro, L. A., López, N., & Castilla, V. (2018). Role of the ERK1/2 signaling pathway in the replication of junín and tacaribe viruses. *Viruses*, 10(4), 199. <https://doi.org/10.3390/V10040199>
- Bullock, A. N., Russo, S., Amos, A., Pagano, N., Bregman, H., Debreczeni, J. É., Lee, W. H., von Delft, F., Meggers, E., & Knapp, S. (2009). Crystal structure of the PIM2 kinase in complex with an organoruthenium inhibitor. *PloS One*, 4(10), e7112. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0007112>
- Caicedo, E. Y., Charniga, K., Rueda, A., Dorigatti, I., Mendez, Y., Hamlet, A., Carrera, J. P., & Cucunubá, Z. M. (2021). The epidemiology of Mayaro virus in the Americas: A systematic review and key parameter estimates for outbreak modelling. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 15(6), e0009418. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0009418>
- Camini, F. C., da Silva Caetano, C. C., Almeida, L. T., da Costa Guerra, J. F., de Mello Silva, B., de Queiroz Silva, S., de Magalhães, J. C., & de Brito Magalhães, C. L. (2017). Oxidative stress in Mayaro virus infection. *Virus Research*, 236, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.04.017>
- Canovas, B., & Nebreda, A. R. (2021a). Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2021 22:5, 22(5), 346–366. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00322-w>
- Carvalho, C. A. M., Silva, J. L., Oliveira, A. C., & Gomes, A. M. O. (2017). On the entry of an emerging arbovirus into host cells: Mayaro virus takes the highway to the cytoplasm through fusion with early endosomes and caveolae-derived vesicles. *PeerJ*, 5, e3245. <https://doi.org/10.7717/peerj.3245>
- CAUSEY, O. R., CASALS, J., SHOPE, R. E., & UDOMSAKDI, S. (1963). AURA AND UNA, TWO NEW GROUP A ARTHROPOD-BORNE VIRUSES. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 12, 777–781. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.1963.12.777>
- Cavalheiro, M. G., Da Costa, L. S., Campos, H. S., Alves, L. S., Assunção-Miranda, I., & Da Poian, A. T. (2016). Macrophages as target cells for Mayaro virus infection: Involvement of reactive oxygen species in the inflammatory response during virus replication. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 88(3), 1485–1499. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620150685>
- Chen, Z., & Lang, D. (2013). The effectiveness of disease management interventions on health-related quality of life of patients with established

- arthritogenic alphavirus infections: a systematic review protocol. *JBIR Database of Systematic Reviews and Implementation Reports*, 11(9), 56–72. <https://doi.org/10.11124/JBISRIR-2013-934>
- Cheng, Y., Sun, F., Wang, L., Gao, M., Xie, Y., Sun, Y., Liu, H., Yuan, Y., Yi, W., Huang, Z., Yan, H., Peng, K., Wu, Y., & Cao, Z. (2020). Virus-induced p38 MAPK activation facilitates viral infection. *Theranostics*, 10(26), 12223–12240. <https://doi.org/10.7150/THNO.50992>
- Choi, H., Kudchodkar, S. B., Reuschel, E. L., Asijaid, K., Borole, P., Ho, M., Wojtak, K., Reed, C., Ramos, S., Bopp, N. E., Aguilar, P. V., Weaver, S. C., Kim, J. J., Humeau, L., Tebas, P., Weiner, D. B., & Muthumani, K. (2019). Protective immunity by an engineered DNA vaccine for mayaro virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(2), e0007042. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007042>
- Coso, O. A., Chiariello, M., Kalinec, G., Kyriakis, J. M., Woodgett, J., & Gutkind, J. S. (1995). Transforming G protein-coupled receptors potentially activate JNK (SAPK). Evidence for a divergence from the tyrosine kinase signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(10), 5620–5624. <https://doi.org/10.1074/JBC.270.10.5620>
- Coulthard, L. R., White, D. E., Jones, D. L., McDermott, M. F., & Burchill, S. A. (2009a). p38MAPK: stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends in Molecular Medicine*, 15(8), 369–379. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2009.06.005>
- Cromm, P. M., & Crews, C. M. (2017). Targeted Protein Degradation: from Chemical Biology to Drug Discovery. *Cell Chemical Biology*, 24(9), 1181–1190. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2017.05.024>
- Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y. N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T. F., Young, P. R., & Lee, J. C. (1995). SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Letters*, 364(2), 229–233. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00357-F](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00357-F)
- Davis, R. J. (2000). Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases. *Cell*, 103(2), 239–252. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00116-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00116-1)
- de Castro-Jorge, L. A., de Carvalho, R. V. H., Klein, T. M., Hiroki, C. H., Lopes, A. H., Guimarães, R. M., Fumagalli, M. J., Floriano, V. G., Agostinho, M. R., Silhessarenko, R. D., Ramalho, F. S., Cunha, T. M., Cunha, F. Q., da Fonseca, B. A. L., & Zamboni, D. S. (2019). The NLRP3 inflammasome is involved with the pathogenesis of Mayaro virus. *PLOS Pathogens*, 15(9), e1007934. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1007934>
- de Vries, M., Smithers, N. P., Howarth, P. H., Nawijn, M. C., & Davies, D. E. (2015). Inhibition of Pim1 kinase reduces viral replication in primary bronchial epithelial cells. *European Respiratory Journal*, 45(6), 1745–1748. <https://doi.org/10.1183/09031936.00206514>
- de Wispelaere, M., Du, G., Donovan, K. A., Zhang, T., Eleuteri, N. A., Yuan, J. C., Kalabathula, J., Nowak, R. P., Fischer, E. S., Gray, N. S., & Yang, P. L. (2019). Small molecule degraders of the hepatitis C virus protease

- reduce susceptibility to resistance mutations. *Nature Communications*, 10(1), 3468. <https://doi.org/10.1038/S41467-019-11429-W>
- Dérjard, B., Hibi, M., Wu, I. H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., & Davis, R. J. (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*, 76(6), 1025–1037. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90380-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90380-8)
- Dhanasekaran, D. N., & Reddy, E. P. (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 2008 27:48, 27(48), 6245–6251. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.301>
- Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O., & Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 2007 26:22, 26(22), 3279–3290. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210421>
- Diagne, C. T., Bengue, M., Choumet, V., Hamel, R., Pompon, J., & Missé, D. (2020). Mayaro Virus Pathogenesis and Transmission Mechanisms. *Pathogens*, 9(9), 1–23. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9090738>
- Dieme, C., Ciota, A. T., & Kramer, L. D. (2020). Transmission potential of Mayaro virus by *Aedes albopictus*, and *Anopheles quadrimaculatus* from the USA. *Parasites and Vectors*, 13(1), 613. <https://doi.org/10.1186/S13071-020-04478-4>
- Donoghue, C., Cubillos-Rojas, M., Gutierrez-Prat, N., Sanchez-Zarzalejo, C., Verdaguer, X., Riera, A., & Nebreda, A. R. (2020a). Optimal linker length for small molecule PROTACs that selectively target p38 α and p38 β for degradation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 201, 112451. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2020.112451>
- Dupuis-Maguiraga, L., Noret, M., Brun, S., Grand, R. Le, Gras, G., & Roques, P. (2012). Chikungunya Disease: Infection-Associated Markers from the Acute to the Chronic Phase of Arbovirus-Induced Arthralgia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(3), e1446. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0001446>
- El-Bacha, T., Menezes, M. M. T., Azevedo Silva, M. C., Sola-Penna, M., & da Poian, A. T. (2004). Mayaro virus infection alters glucose metabolism in cultured cells through activation of the enzyme 6-phosphofructo 1-kinase. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266(1–2), 191–198. <https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000049154.17866.00>
- Esposito, D. L. A., & Fonseca, B. A. L. da. (2017). Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? In *Brazilian Journal of Infectious Diseases* (Vol. 21, Issue 5, pp. 540–544). Elsevier Editora Ltda. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.06.002>
- Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feeser, W. S., van Dyk, D. E., Pitts, W. J., Earl, R. A., Hobbs, F., Copeland, R. A., Magolda, R. L., Scherle, P. A., & Trzaskos, J. M. (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(29), 18623–18632. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.29.18623>

- Ferreira, D. F., Santo, M. P. E., Rebello, M. A., & Rebello, M. C. S. (2000). Weak bases affect late stages of Mayaro virus replication cycle in vertebrate cells. *Journal of Medical Microbiology*, 49(4), 313–318. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-4-313>
- FG, N., VAD, N., VC, S., BTD, N., DSG, R., & PFDC, V. (2017). Multiplexed reverse transcription real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of Mayaro, Oropouche, and Oropouche-like viruses. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 112(7), 510–513. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160062>
- Figueiredo, M. L. G. de, & Figueiredo, L. T. M. (2014). Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47(6), 677–683. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0246-2014>
- Figueiredo, L. T. M., & Figueiredo, L. T. M. (2015). The recent arbovirus disease epidemic in Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(3), 233–234. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0179-2015>
- Ganjan, N., & Riviere-Cinamond, A. (2020). Mayaro virus in Latin America and the Caribbean. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*, 44, e14. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.14>
- Gardner, J., Anraku, I., Le, T. T., Larcher, T., Major, L., Roques, P., Schroder, W. A., Higgs, S., & Suhrbier, A. (2010). Chikungunya Virus Arthritis in Adult Wild-Type Mice. *Journal of Virology*, 84(16), 8021–8032. <https://doi.org/10.1128/JVI.02603-09>
- Ge, B., Gram, H., di Padova, F., Huang, B., New, L., Ulevitch, R. J., Luo, Y., & Han, J. (2002). MAPKK-independent activation of p38 α mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38 α . *Science*, 295(5558), 1291–1294. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1067289>
- Giovanni De-Simone, S. (2014). Mayaro Virus Disease. *Journal of Human Virology & Retrovirology*, 1(3), 00018. <https://doi.org/10.15406/JHVRV.2014.01.00018>
- Glushakova, L. G., Alto, B. W., Kim, M. S., Wiggins, K., Eastmond, B., Moussatche, P., Burkett-Cadena, N. D., & Benner, S. A. (2018). Optimization of cationic (Q)-paper for detection of arboviruses in infected mosquitoes. *Journal of Virological Methods*, 261, 71–79. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2018.08.004>
- Gould, E. A., Coutard, B., Malet, H., Morin, B., Jamal, S., Weaver, S., Gorbalenya, A., Moureau, G., Baronti, C., Delogu, I., Forrester, N., Khasnatinov, M., Gritsun, T., Lamballerie, X. de, & Canard, B. (2010). Understanding the alphaviruses: Recent research on important emerging pathogens and progress towards their control. *Antiviral Research*, 87(2), 111. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2009.07.007>
- Greiser-Wilke, I. M., Moennig, V., Kaaden, O. R., & Shope, R. E. (1991). Detection of alphaviruses in a genus-specific antigen capture enzyme immunoassay using monoclonal antibodies. *Journal of Clinical*

- Microbiology*, 29(1), 131–137. <https://doi.org/10.1128/JCM.29.1.131-137.1991>
- Greiser-Wilke, I., Moennig, V., Kaaden, O. R., & Figueiredo, L. T. M. (1989). Most alphaviruses share a conserved epitopic region on their nucleocapsid protein. *Journal of General Virology*, 70(3), 743–748. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-3-743/CITE/REFWORKS>
- Grimes, J. M., & Grimes, K. v. (2020). p38 MAPK inhibition: A promising therapeutic approach for COVID-19. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 144, 63–65. <https://doi.org/10.1016/J.YJMCC.2020.05.007>
- Haeusgen, W., Boehm, R., Zhao, Y., Herdegen, T., & Waetzig, V. (2009). Specific activities of individual c-Jun N-terminal kinases in the brain. *Neuroscience*, 161(4), 951–959. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2009.04.014>
- Hanks, S. K., & Hunter, T. (1995). The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification1. *The FASEB Journal*, 9(8), 576–596. <https://doi.org/10.1096/FASEBJ.9.8.7768349>
- Hassing, R. J., Leparac-Goffart, I., Blank, S. N., Thevarayan, S., Tolou, H., van Doornum, G., & van Genderen, P. J. (2010). Imported Mayaro virus infection in the Netherlands. *Journal of Infection*, 61(4), 343–345. <https://doi.org/10.1016/J.JINF.2010.06.009>
- Hekman, R. M., Hume, A. J., Goel, R. K., Abo, K. M., Huang, J., Blum, B. C., Werder, R. B., Suder, E. L., Paul, I., Phanse, S., Youssef, A., Alysandratos, K. D., Padhorny, D., Ojha, S., Mora-Martin, A., Kretov, D., Ash, P., Varma, M., Zhao, J., ... Emili, A. (2020). Actionable Cytopathogenic Host Responses of Human Alveolar Type 2 Cells to SARS-CoV-2. *Molecular Cell*, 80(6), 1104–1122.e9. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2020.11.028>
- Henss, L., Yue, C., Kandler, J., Faddy, H. M., Simmons, G., Panning, M., Lewis-Ximenez, L. L., Baylis, S. A., & Schnierle, B. S. (2019). Establishment of an Alphavirus-Specific Neutralization Assay to Distinguish Infections with Different Members of the Semliki Forest Complex. *Viruses*, 11(1), 82. <https://doi.org/10.3390/V11010082>
- Hotez, P. J., & Murray, K. O. (2017). Dengue, West Nile virus, chikungunya, Zika-and now Mayaro? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(8), e0005462. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005462>
- Ino, H., Takahashi, N., Terao, T., Igarashi, H., & Sarai, N. (2015a). Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of losmapimod in healthy Japanese volunteers. *Clinical Pharmacology in Drug Development*, 4(4), 262–269. <https://doi.org/10.1002/CPDD.190>
- Ip, Y. T., & Davis, R. J. (1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) - From inflammation to development. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(2), 205–219. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(98\)80143-9](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(98)80143-9)
- Jiménez-García, M. P., Lucena-Cacace, A., Robles-Friás, M. J., Narlik-Grassow, M., Blanco-Aparicio, C., & Carnero, A. (2016). The role of

- PIM1/PIM2 kinases in tumors of the male reproductive system. *Scientific Reports*, 6, 38079. <https://doi.org/10.1038/SREP38079>
- Johnson, G. L., & Nakamura, K. (2007). The c-jun kinase/stress-activated pathway: Regulation, function and role in human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1341–1348. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.12.009>
- Johnson, G. V. W., & Bailey, C. D. C. (2003). The p38 MAP kinase signaling pathway in Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*, 183(2), 263–268. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00268-1](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00268-1)
- Juarez, D., Long, K. C., Aguilar, P., Kochel, T. J., & Halsey, E. S. (2013). Assessment of plaque assay methods for alphaviruses. *Journal of Virological Methods*, 187(1), 185–189. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2012.09.026>
- Keane, N. A., Reidy, M., Natoni, A., Raab, M. S., & O'Dwyer, M. (2015). Targeting the Pim kinases in multiple myeloma. *Blood Cancer Journal*, 5(7), e325. <https://doi.org/10.1038/BCJ.2015.46>
- Keating, J. A., & Striker, R. (2012). Phosphorylation events during viral infections provide potential therapeutic targets. *Reviews in Medical Virology*, 22(3), 166–181. <https://doi.org/10.1002/RMV.722>
- Keck, F., Ataey, P., Amaya, M., Bailey, C., & Narayanan, A. (2015). Phosphorylation of single stranded RNA virus proteins and potential for novel therapeutic strategies. *Viruses*, 7(10), 5257–5273. <https://doi.org/10.3390/V7102872>
- Keeton, E. K., McEachern, K., Dillman, K. S., Palakurthi, S., Cao, Y., Grondine, M. R., Kaur, S., Wang, S., Chen, Y., Wu, A., Shen, M., Gibbons, F. D., Lamb, M. L., Zheng, X., Stone, R. M., DeAngelo, D. J., Platanias, L. C., Dakin, L. A., Chen, H., ... Huszar, D. (2014a). AZD1208, a potent and selective pan-Pim kinase inhibitor, demonstrates efficacy in preclinical models of acute myeloid leukemia. *Blood*, 123(6), 905–913. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2013-04-495366>
- Keshet, Y., & Seger, R. (2010). The MAP Kinase Signaling Cascades: A System of Hundreds of Components Regulates a Diverse Array of Physiological Functions. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 661, pp. 3–38). https://doi.org/10.1007/978-1-60761-795-2_1
- Keyse, S. M. (2000). Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(2), 186–192. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(99\)00075-7](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(99)00075-7)
- Khan, A. H., Morita, K., del Carmen Parquet, M., Hasebe, F., Mathenge, E. G. M., & Igarashi, A. (2002). Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *Journal of General Virology*, 83(12), 3075–3084. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-12-3075/CITE/REFWORKS>
- Kim, E. K., & Choi, E. J. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular*

- Basis of Disease*, 1802(4), 396–405.
<https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2009.12.009>
- Kotlyarov, A., Neininger, A., Schubert, C., & Eckert, R. (1999) MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis. *Nature cell biology*, 1(2), 94–97. <https://doi.org/10.1038/10061>.
- Kyriakis, J. M., & Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological Reviews*, 81(2), 807–869. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.2001.81.2.807>
- LaBeaud, A. D. (2008). Why Arboviruses Can Be Neglected Tropical Diseases. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2(6), e247. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0000247>
- Lavergne, A., Thoisy, B. de, Lacoste, V., Pascalis, H., Pouliquen, J. F., Mercier, V., Tolou, H., Dussart, P., Morvan, J., Talarmin, A., & Kazanji, M. (2006). Mayaro virus: Complete nucleotide sequence and phylogenetic relationships with other alphaviruses. *Virus Research*, 117(2), 283–290. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2005.11.006>
- Lawler, S., Fleming, Y., Goedert, M., & Cohen, P. (1998). Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro. *Current Biology*, 8(25), 1387–1391. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)00019-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)00019-0)
- Lee, C., Kim, Y., & Jeon, J. H. (2016). JNK and p38 mitogen-activated protein kinase pathways contribute to porcine epidemic diarrhea virus infection. *Virus Research*, 222, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.05.018>
- Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M. J., Keys, J. R., Land vatter, S. W., Strickler, J. E., McLaughlin, M. M., Siemens, I. R., Fisher, S. M., Livi, G. P., White, J. R., Adams, J. L., & Young, P. R. (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, 372, 739. <http://dx.doi.org/10.1038/372739a0>
- Leung, J. Y. S., Ng, M. M. L., & Chu, J. J. H. (2011). Replication of alphaviruses: A review on the entry process of alphaviruses into cells. *Advances in Virology*, 2011, 249640. <https://doi.org/10.1155/2011/249640>
- Liu, Z., & Cao, W. (2009). p38 Mitogen-Activated Protein Kinase: A Critical Node Linking Insulin Resistance and Cardiovascular Diseases in Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 9(1), 38–46. <https://doi.org/10.2174/187153009787582397>
- Llagonne-Barets, M., Icard, V., Leparç-Goffart, I., Prat, C., Perpoint, T., André, P., & Ramière, C. (2016). A case of Mayaro virus infection imported from French Guiana. *Journal of Clinical Virology*, 77, 66–68. <https://doi.org/10.1016/J.JCV.2016.02.013>
- Llamas-González, Y. Y., Campos, D., Pascale, J. M., Arbiza, J., González-Santamaría, J., Llamas-González, Y. Y., Campos, D., Pascale, J. M.,

- Arbiza, J., & González-Santamaría, J. (2019). A Functional Ubiquitin-Proteasome System is Required for Efficient Replication of New World Mayaro and Una Alphaviruses. *Viruses*, 11(4), 370. <https://doi.org/10.3390/v11040370>
- Loesch, M., & Chen, G. (2008). The p38 MAPK stress pathway as a tumor suppressor or more? *Frontiers in Bioscience*, 13(9), 3581–3593. <https://doi.org/10.2741/2951>
- Long, K. C., Ziegler, S. A., Thangamani, S., Hausser, N. L., Kochel, T. J., Higgs, S., & Tesh, R. B. (2011). Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(4), 750–757. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0359>
- Lorenz, C., Azevedo, T. S., Virginio, F., Aguiar, B. S., Chiaravalloti-Neto, F., & Suesdek, L. (2017). Impact of environmental factors on neglected emerging arboviral diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(9), e0005959. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005959>
- Mackay, I. M., & Arden, K. E. (2016). Mayaro virus: a forest virus primed for a trip to the city? *Microbes and Infection*, 18(12), 724–734. <https://doi.org/10.1016/J.MICINF.2016.10.007>
- Maruyama, J., Naguro, I., Takeda, K., & Ichijo, H. (2009). Stress-Activated MAP Kinase Cascades in Cellular Senescence. *Current Medicinal Chemistry*, 16(10), 1229–1235. <https://doi.org/10.2174/092986709787846613>
- McGill, P. E. (1995). Viral infections: α -viral arthropathy. *Baillière's Clinical Rheumatology*, 9(1), 145–150. [https://doi.org/10.1016/S0950-3579\(05\)80151-7](https://doi.org/10.1016/S0950-3579(05)80151-7)
- Merritt, S. E., Mata, M., Nihalani, D., Zhu, C., Hu, X., & Holzman, L. B. (1999). The mixed lineage kinase DLK utilizes MKK7 and not MKK4 as substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 274(15), 10195–10202. <https://doi.org/10.1074/JBC.274.15.10195>
- Montrose, K., & Krissansen, G. W. (2014). Design of a PROTAC that antagonizes and destroys the cancer-forming X-protein of the hepatitis B virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453(4), 735–740. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2014.10.006>
- Morales, A., Vidales, H., & Groot, H. (1961). Virus Isolations from Forest Mosquitoes in San Vicente de Chucuri, Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 10(3), 397–402. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1961.10.397>
- Morishita, D., Katayama, R., Sekimizu, K., Tsuruo, T., & Fujita, N. (2008). Pim kinases promote cell cycle progression by phosphorylating and down-regulating p27Kip1 at the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cancer Research*, 68(13), 5076–5085. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0634>
- Mourão, M. P. G., Bastos, M. de S., Figueiredo, R. P. de, Gimaque, J. B. L., Galusso, E. dos S., Kramer, V. M., Oliveira, C. M. C. de, Naveca, F. G., & Figueiredo, L. T. M. (2012). Mayaro Fever in the City of Manaus, Brazil,

- 2007–2008. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 12(1), 42.
<https://doi.org/10.1089/VBZ.2011.0669>
- Muñoz, M., Navarro, J. C., & Navarro, J. C. (2012). Virus Mayaro: un arbovirus reemergente en Venezuela y Latinoamérica. *Biomédica*, 32(2), 288–302.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i2.647>
- Munoz-Jordan, J. L. (2017). Diagnosis of Zika Virus Infections: Challenges and Opportunities. *The Journal of Infectious Diseases*, 216(suppl_10), S951–S956. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix502>
- Nakano, H., Hasegawa, T., Saito, N., Furukawa, K., Mukaida, N., Kojima, H., Okabe, T., & Nagano, T. (2015). Design and synthesis of an in vivo-efficacious PIM3 kinase inhibitor as a candidate anti-pancreatic cancer agent. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(24), 5687–5693.
<https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2015.10.098>
- Nayak, T. K., Mamidi, P., Sahoo, S. S., Sanjai Kumar, P., Mahish, C., Chatterjee, S., Subudhi, B. B., Chattopadhyay, S., & Chattopadhyay, S. (2019). P38 and JNK Mitogen-Activated Protein Kinases Interact with Chikungunya Virus Non-structural Protein-2 and Regulate TNF Induction during Viral Infection in Macrophages. *Frontiers in Immunology*, 10, 786.
<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.00786>
- Niault, T. S., & Baccarini, M. (2010). Targets of Raf in tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 31(7), 1165–1174.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgp337>
- O'Donoghue, M. L., Glaser, R., Cavender, M. A., Aylward, P. E., Bonaca, M. P., Budaj, A., Davies, R. Y., Dellborg, M., Fox, K. A. A., Gutierrez, J. A. T., Hamm, C., Kiss, R. G., Kovar, F., Kuder, J. F., Im, K. A., Lepore, J. J., Lopez-Sendon, J. L., Ophuis, T. O., Parkhomenko, A., ... Morrow, D. A. (2016). Effect of losmapimod on cardiovascular outcomes in patients hospitalized with acute myocardial infarction: A randomized clinical trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 315(15), 1591–1599. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2016.3609>
- Pan American Health Organization, & World Health Organization. (2019). Mayaro Fever. *Epidemiological Alert*, May, 1–5.
- Park, C., Min, S., Park, E.-M., Lim, Y.-S., Kang, S., Suzuki, T., Shin, E.-C., & Hwang, S. B. (2015a). Pim Kinase Interacts with Nonstructural 5A Protein and Regulates Hepatitis C Virus Entry. *Journal of Virology*, 89(19), 10073–10086. <https://doi.org/10.1128/JVI.01707-15>
- Parrott, M. M., Sitarski, S. A., Arnold, R. J., Picton, L. K., Hill, R. B., & Mukhopadhyay, S. (2009). Role of Conserved Cysteines in the Alphavirus E3 Protein. *Journal of Virology*, 83(6), 2584–2591.
<https://doi.org/10.1128/JVI.02158-08>
- Paul, D., & Bartenschlager, R. (2013). Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. *World Journal of Virology*, 2(2), 32–48. <https://doi.org/10.5501/WJLV.2.12.32>
- Peng, H., Shi, M., Zhang, L., Li, Y., Sun, J., Zhang, L., Wang, X., Xu, X., Zhang, X., Mao, Y., Ji, Y., Jiang, J., & Shi, W. (2014). Activation of JNK1/2

- and p38 MAPK signaling pathways promotes enterovirus 71 infection in immature dendritic cells. *BMC Microbiology*, 14, 147. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-147>
- Pereira, T. N., Carvalho, F. D., de Mendonça, S. F., Rocha, M. N., & Moreira, L. A. (2020). Vector competence of *aedes aegypti*, *aedes albopictus*, and *culex quinquefasciatus* mosquitoes for Mayaro virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(4), 1–13. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0007518>
- Pereira, T. N., Virginio, F., Souza, J. I., & Moreira, L. A. (2021). Emergent Arboviruses: A Review About Mayaro virus and Oropouche orthobunyavirus. *Frontiers in Tropical Diseases*, 2, 737436 <https://doi.org/10.3389/FITD.2021.737436>
- Pereiro, P., Álvarez-Rodríguez, M., Valenzuela-Muñoz, V., Gallardo-Escárate, C., Figueras, A., & Novoa, B. (2020a). RNA-Seq analysis reveals that spring viraemia of carp virus induces a broad spectrum of PIM kinases in zebrafish kidney that promote viral entry. *Fish and Shellfish Immunology*, 99, 86–98. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2020.01.055>
- Pezzi, L., Rodriguez-Morales, A. J., Reusken, C. B., Ribeiro, G. S., LaBeaud, A. D., Lourenço-de-Oliveira, R., Brasil, P., Lecuit, M., Failloux, A. B., Gallian, P., Jaenisch, T., Simon, F., Siqueira, A. M., Rosa-Freitas, M. G., Vega Rua, A., Weaver, S. C., Drexler, J. F., Vasilakis, N., de Lamballerie X, ... Simmons, G. (2019). GloPID-R report on chikungunya, o'nyong-nyong and Mayaro virus, part 3: Epidemiological distribution of Mayaro virus. *Antiviral Research*, 172, 104610. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2019.104610>
- Pfeffer, M., Proebster, B., Kinney, R. M., & Kaaden, O. R. (1997). Genus-specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 57(6), 709–718. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.1997.57.709>
- Pinheiro, F. P., Freitas, R. B., Rosa, J. F. T. da, Gabbay, Y. B., Mello, W. A., & LeDuc, J. W. (1981). An Outbreak of Mayaro Virus Disease in Belterra, Brazil: I. Clinical and Virological Findings. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 30(3), 674–681. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.1981.30.674>
- Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., & Seger, R. (2011a). The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(9), 1619–1633. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2010.12.012>
- Popivanova, B. K., Li, Y. Y., Zheng, H., Omura, K., Fujii, C., Tsuneyama, K., & Mukaida, N. (2007). Proto-oncogene, Pim-3 with serine/threonine kinase activity, is aberrantly expressed in human colon cancer cells and can prevent Bad-mediated apoptosis. *Cancer Science*, 98(3), 321–328. <https://doi.org/10.1111/J.1349-7006.2007.00390.X>

- Powers, A. M., Aguilar, P. v., Chandler, L. J., Brault, A. C., Meakins, T. A., Watts, D., Russell, K. L., Olson, J., Vasconcelos, P. F. C., da Rosa, A. T., Weaver, S. C., & Tesh, R. B. (2006). Genetic relationships among Mayaro and Una viruses suggest distinct patterns of transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(3), 461–469. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.2006.75.461>
- Powers, A. M., Brault, A. C., Shirako, Y., Strauss, E. G., Kang, W., Strauss, J. H., & Weaver, S. C. (2001). Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses. *Journal of Virology*, 75(21), 10118. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.21.10118-10131.2001>
- Powers, J. M., Haese, N. N., Denton, M., Ando, T., Kreklywich, C., Bonin, K., Streblow, C. E., Kreklywich, N., Smith, P., Broeckel, R., Defilippis, V., Morrison, T. E., Heise, M. T., & Streblow, D. N. (2021). Non-replicating adenovirus based mayaro virus vaccine elicits protective immune responses and cross protects against other alphaviruses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(4), e0009308. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0009308>
- Prichett, W., Hand, A., & Sheilds..., J. (1995). Mechanism of action of bicyclic imidazoles defines a translational regulatory pathway for tumor necrosis factor alpha. *Journal of inflammation*, 45(2), 97–105. <https://europepmc.org/article/med/7583362>
- Pulverer, B. J., Kyriakis, J. M., Avruch, J., Nikolakaki, E., & Woodgett, J. R. (1991). Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature*, 353(6345), 670–674. <https://doi.org/10.1038/353670A0>
- Rahaus, M., Desloges, N., & Wolff, M. H. (2004a). Replication of varicella-zoster virus is influenced by the levels of JNK/SAPK and p38/MAPK activation. *Journal of General Virology*, 85(12), 3529–3540. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.80347-0>
- Rahaus, M., Desloges, N., & Wolff, M. H. (2004b). Replication of varicella-zoster virus is influenced by the levels of JNK/SAPK and p38/MAPK activation. *Journal of General Virology*, 85(12), 3529–3540. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80347-0>
- Raingaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J., & Davis, R. J. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(13), 7420–7426. <https://doi.org/10.1074/JBC.270.13.7420>
- Rainio, E. M., Ahlfors, H., Carter, K. L., Ruuska, M., Matikainen, S., Kieff, E., & Koskinen, P. J. (2005). Pim kinases are upregulated during Epstein-Barr virus infection and enhance EBNA2 activity. *Virology*, 333(2), 201–206. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2005.01.001>
- Rauch, J., Volinsky, N., Romano, D., & Kolch, W. (2011). The secret life of kinases: Functions beyond catalysis. *Cell Communication and Signaling*, 9(1), 23. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-23>

- Rincón, M., & Davis, R. J. (2009). Regulation of the immune response by stress-activated protein kinases. *Immunological Reviews*, 228(1), 212–224. <https://doi.org/10.1111/J.1600-065X.2008.00744.X>
- Rodríguez-Morales, A. J., Paniz-Mondolfi, A. E., Villamil-Gómez, W. E., & Navarro, J. C. (2017). Mayaro, Oropouche and Venezuelan Equine Encephalitis viruses: Following in the footsteps of Zika? *Travel Medicine and Infectious Disease*, 15, 72–73. <https://doi.org/10.1016/J.TMAID.2016.11.001>
- Rossomando, E. F. (1989). Application of high-performance liquid chromatography to enzyme activity determination. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 492(C), 361–375. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)84475-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)84475-8)
- Rubinfeld, H., & Seger, R. (2005). The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Molecular Biotechnology*, 31(2), 151–174. <https://doi.org/10.1385/MB:31:2:151>
- Sakuma, C., Sekizuka, T., Kuroda, M., Kasai, F., Saito, K., Ikeda, M., Yamaji, T., Osada, N., & Hanada, K. (2018). Novel endogenous simian retroviral integrations in Vero cells: implications for quality control of a human vaccine cell substrate. *Scientific Reports* 2018 8:1, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18934-2>
- Salvador, J. M., Mittelstadt, P. R., Guszczynski, T., Copeland, T. D., Yamaguchi, H., Appella, E., Fornace, A. J., & Ashwell, J. D. (2005). Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor–proximal tyrosine kinases. *Nature Immunology* 2005 6:4, 6(4), 390–395. <https://doi.org/10.1038/ni1177>
- Santiago, F. W., Halsey, E. S., Siles, C., Vilcarromero, S., Guevara, C., Silvas, J. A., Ramal, C., Ampuero, J. S., & Aguilar, P. V. (2015). Long-Term Arthralgia after Mayaro Virus Infection Correlates with Sustained Pro-inflammatory Cytokine Response. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(10), e0004104. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0004104>
- Santio, N. M., & Koskinen, P. J. (2017a). PIM kinases: From survival factors to regulators of cell motility. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 93, 74–85 <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.10.016>
- Santos, F. M., Dias, R. S., de Oliveira, M. D., Costa, I. C. T. A., Fernandes, L. de S., Pessoa, C. R., da Matta, S. L. P., Costa, V. V., Souza, D. G., da Silva, C. C., & de Paula, S. O. (2019). Animal model of arthritis and myositis induced by the mayaro virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(5), e0007375. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007375>
- Shi, Q., Cheng, L., Liu, Z., Hu, K., Ran, J., Ge, D., & Fu, J. (2015). The p38 MAPK inhibitor SB203580 differentially modulates LPS-induced interleukin 6 expression in macrophages. *Central-European Journal of Immunology*, 40(3), 276. <https://doi.org/10.5114/CEJI.2015.54586>
- Skoging, U., & Liljeström, P. (1998). Role of the C-terminal tryptophan residue for the structure-function of the alphavirus capsid protein. *Journal of*

- Molecular Biology*, 279(4), 865–872.
<https://doi.org/10.1006/JMBI.1998.1817>
- Sohn, S. J., Thompson, J., & Winoto, A. (2007). Apoptosis during negative selection of autoreactive thymocytes. *Current Opinion in Immunology*, 19(5), 510–515. <https://doi.org/10.1016/J.COI.2007.06.001>
- Sreekanth, G. P., Chuncharunee, A., Cheunsuchon, B., Noisakran, S., Yenchitsomanus, P. thai, & Limjindaporn, T. (2017). JNK1/2 inhibitor reduces dengue virus-induced liver injury. *Antiviral Research*, 141, 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.02.003>
- Srihongse, S., Galindo, P., & Eldridge, B. F. (1974). A survey to assess potential human disease hazards along proposed sea level canal routes in Panama and Colombia. V. Arbovirus infection in non-human vertebrates. *Military Medicine*, 139(6), 449–453.
- Stafman, L. L., Waldrop, M. G., Williams, A. P., Aye, J. M., Stewart, J. E., Mroczek-Musulman, E., Yoon, K. J., Whelan, K., & Beierle, E. A. (2019). The presence of PIM3 increases hepatoblastoma tumorigenesis and tumor initiating cell phenotype and is associated with decreased patient survival. *Journal of Pediatric Surgery*, 54(6), 1206–1213. <https://doi.org/10.1016/J.JPEDSURG.2019.02.029>
- Strauss, J. H., & Strauss, E. G. (1994). The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiological Reviews*, 58(3), 491–562. <https://doi.org/10.1128/MR.58.3.491-562.1994>
- Sugasti-Salazar, M., Llamas-González, Y. Y., Campos, D., & González-Santamaría, J. (2021). Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase impairs mayaro virus replication in human dermal fibroblasts and hela cells. *Viruses*, 13(6), 1156. <https://doi.org/10.3390/V13061156>
- Suhrbier, A., Jaffar-Bandjee, M. C., & Gasque, P. (2012). Arthritogenic alphaviruses-an overview. *Nature Reviews Rheumatology*, 8(7), 420–429. <https://doi.org/10.1038/NRRHEUM.2012.64>
- Suhrbier, A., & Mahalingam, S. (2009). The immunobiology of viral arthritides. *Pharmacology & Therapeutics*, 124(3), 301–308. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2009.09.005>
- Sun, X., Gao, H., Yang, Y., He, M., Wu, Y., Song, Y., Tong, Y., & Rao, Y. (2019). PROTACs: great opportunities for academia and industry. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2019 4:1, 4(1), 1–33. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0101-6>
- Szydłowski, M., Prochorec-Sobieszek, M., Szumera-Ciećkiewicz, A., Derezińska, E., Hoser, G., Wasilewska, D., Szymańska-Giemza, O., Jabłońska, E., Białopiotrowicz, E., Sewastianik, T., Polak, A., Czardybon, W., Gałęzowski, M., Windak, R., Zaucha, J. M., Warzocha, K., Brzózka, K., & Juszczynski, P. (2017). Expression of PIM kinases in Reed-Sternberg cells fosters immune privilege and tumor cell survival in Hodgkin lymphoma. *Blood*, 130(12), 1418–1429. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2017-01-760702>

- Talarmin, A., Chandler, L. J., Kazanji, M., de Thoisy, B., Debon, P., Lelarge, J., Labeau, B., Bourreau, E., Vié, J. C., Shope, R. E., & Sarthou, J. L. (1998). Mayaro virus fever in French Guiana: isolation, identification, and seroprevalence. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59(3), 452–456. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.1998.59.452>
- Tanti, J. F., & Jager, J. (2009). Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(6), 753–762. <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2009.07.004>
- Tesh, R. B., Watts, D. M., Russell, K. L., Damodaran, C., Calampa, C., Cabezas, C., Ramirez, G., Vasquez, B., Hayes, C. G., Rossi, C. A., Powers, A. M., Hice, C. L., Chandler, L. J., Cropp, B. C., Karabatsos, N., Roehrig, J. T., & Gubler, D. J. (1999a). Mayaro virus disease: an emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South America. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 28(1), 67–73. <https://doi.org/10.1086/515070>
- Theilacker, C., Held, J., Allering, L., Emmerich, P., Schmidt-Chanasit, J., Kern, W. V., & Panning, M. (2013). Prolonged polyarthralgia in a German traveller with Mayaro virus infection without inflammatory correlates. *BMC Infectious Diseases*, 13(1), 369. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-369>
- Thoisy, B. de, Gardon, J., Salas, R. A., Morvan, J., & Kazanji, M. (2003). Mayaro Virus in Wild Mammals, French Guiana. *Emerging Infectious Diseases*, 9(10), 1326. <https://doi.org/10.3201/EID0910.030161>
- Thornton, T. M., & Rincon, M. (2009). Non-classical p38 map kinase functions: Cell cycle checkpoints and survival. *International Journal of Biological Sciences*, 5(1), 44–52. <https://doi.org/10.7150/IJBS.5.44>
- Torres, J. R., Russell, K. L., Vasquez, C., Tesh, R. B., Salas, R., & Watts, D. M. (2004). Family Cluster of Mayaro Fever, Venezuela - Volume 10, Number 7—July 2004 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerging Infectious Diseases*, 10(7), 1304–1306. <https://doi.org/10.3201/EID1007.030860>
- Toth, R. K., & Warfel, N. A. (2021). Targeting PIM kinases to overcome therapeutic resistance in cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 20(1), 3–10. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-20-0535>
- Truyen, U., & Kaaden, O. -R. (1990). Studies on the Role of Linear Epitopes in Neutralization of Alphaviruses. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 37(1–10), 118–124. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0450.1990.TB01034.X>
- Turjanski, A. G., Vaqué, J. P., & Gutkind, J. S. (2007). MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* 2007 26:22, 26(22), 3240–3253. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210415>
- Vasconcellos, A. F., Mandacaru, S. C., Oliveira, A. S. de, Fontes, W., Melo, R. M., Sousa, M. V. de, Resende, R. O., & Charneau, S. (2020). Dynamic proteomic analysis of *Aedes aegypti* Aag-2 cells infected with Mayaro

- virus. *Parasites & Vectors*, 13, 297. <https://doi.org/10.1186/S13071-020-04167-2>
- Vasconcelos, P. F., Travassos da Rosa, A. P., Rodrigues, S. G., Travassos da Rosa, E. S., Dégallier, N., & Travassos da Rosa, J. F. (2001b). Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. *Cadernos de Saude Publica*, 17 Suppl, 155–164. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2001000700025>
- Voss, K., Amaya, M., Mueller, C., Roberts, B., Kehn-Hall, K., Bailey, C., Petricoin, E., & Narayanan, A. (2014). Inhibition of host extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation decreases new world alphavirus multiplication in infected cells. *Virology*, 468, 490–503. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2014.09.005>
- Waetzig, G. H., Seegert, D., Rosenstiel, P., Nikolaus, S., & Schreiber, S. (2002). p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is Activated and Linked to TNF- α Signaling in Inflammatory Bowel Disease. *The Journal of Immunology*, 168(10), 5342–5351. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.168.10.5342>
- Wagner, E. F., & Nebreda, Á. R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 9(8), 537–549. <https://doi.org/10.1038/NRC2694>
- Wang, E., Paessler, S., Aguilar, P. v., Carrara, A. S., Ni, K., Greene, I. P., & Weaver, S. C. (2006). Reverse transcription-PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection and differentiation of alphavirus infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(11), 4000–4008. <https://doi.org/10.1128/JCM.00175-06/ASSET/155DD069-0717-437B-8E96-18395FD0B4AD/ASSETS/GRAPHIC/ZJM0110668800004.JPEG>
- Warfel, N. A., & Kraft, A. S. (2015). PIM kinase (and Akt) biology and signaling in tumors. *Pharmacology & Therapeutics*, 151, 41. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2015.03.001>
- Weise, W. J., Hermance, M. E., Forrester, N., Adams, A. P., Langsjoen, R., Gorchakov, R., Wang, E., Alcorn, M. D. H., Tsetsarkin, K., & Weaver, S. C. (2014). A Novel Live-Attenuated Vaccine Candidate for Mayaro Fever. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(8), e2969. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002969>
- World Health Organization. (2021). *Mayaro virus disease - French Guiana, France*.
- Wu, J., Chu, E., & Kang, Y. (2021). Pim kinases in multiple myeloma. *Cancers*, 13(17), 4304. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13174304>
- Wu, Y., Wang, Y. Y., Nakamoto, Y., Li, Y. Y., Baba, T., Kaneko, S., Fujii, C., & Mukaida, N. (2010). Accelerated hepatocellular carcinoma development in mice expressing the Pim-3 transgene selectively in the liver. *Oncogene*, 29(15), 2228–2237. <https://doi.org/10.1038/ONC.2009.504>

- Yin, J., Shine, L., Raycroft, F., Deeti, S., Reynolds, A., Ackerman, K. M., Glaviano, A., O'Farrell, S., O'Leary, O., Kilty, C., Kennedy, C., McLoughlin, S., Rice, M., Russell, E., Higgins, D. G., Hyde, D. R., & Kennedy, B. N. (2012). Inhibition of the Pim1 oncogene results in diminished visual function. *PloS One*, 7(12), e52177. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0052177>
- Yoon, S., & Seger, R. (2009). The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Http://Dx.Doi.Org/10.1080/02699050500284218*, 24(1), 21–44. <https://doi.org/10.1080/02699050500284218>
- Zehorai, E., Yao, Z., Plotnikov, A., & Seger, R. (2010). The subcellular localization of MEK and ERK—A novel nuclear translocation signal (NTS) paves a way to the nucleus. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 314(2), 213–220. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2009.04.008>
- Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2008). From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*, 454(7203), 455–462. <https://doi.org/10.1038/NATURE07203>
- Zhang, R., Kim, A. S., Fox, J. M., Nair, S., Basore, K., Klimstra, W. B., Rimkunas, R., Fong, R. H., Lin, H., Poddar, S., Crowe, J. E., Doranz, B. J., Fremont, D. H., & Diamond, M. S. (2018). Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. *Nature* 2018 557(7706), 570–574. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0121-3>
- ZHANG, W., & LIU, H. T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*, 12(1), 9–18. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290105>
- Zhang, X., Song, M., Kundu, J. K., Lee, M.-H., & Liu, Z.-Z. (2018). PIM Kinase as an Executional Target in Cancer. *Journal of Cancer Prevention*, 23(3), 109–116. <https://doi.org/10.15430/JCP.2018.23.3.109>
- Zhang, X., Yan, F., Tang, K., Chen, Q., Guo, J., Zhu, W., He, S., Banadyga, L., Qiu, X., & Guo, Y. (2019). Identification of a clinical compound losmapimod that blocks Lassa virus entry. *Antiviral Research*, 167, 68–77. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2019.03.014>
- Zhang, Z., Wang, B., Wu, S., Wen, Y., Wang, X., Song, X., Zhang, J., Hou, L., & Chen, W. (2017). PD169316, a specific p38 inhibitor, shows antiviral activity against Enterovirus71. *Virology*, 508, 150–158. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2017.05.012>
- Zhong, S. P., Ma, W. Y., & Dong, Z. (2000). ERKs and p38 kinases mediate ultraviolet B-induced phosphorylation of histone H3 at serine 10. *Journal of Biological Chemistry*, 275(28), 20980–20984. <https://doi.org/10.1074/JBC.M909934199>
- Zhou, B., Wang, Z. X., Zhao, Y., Brautigan, D. L., & Zhang, Z. Y. (2002). The specificity of extracellular signal-regulated kinase 2 dephosphorylation by protein phosphatases. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 31818–31825. <https://doi.org/10.1074/JBC.M203969200>

ANEXOS

ANEXO 1

Fotografías ilustrativas del trabajo realizado en el Laboratorio Multiusuarios del Instituto Conmemorativo de Estudios de la Salud



ANEXO 2

Publicaciones

Como producto del trabajo de tesis, se obtuvo los siguientes artículos:

1. Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Impairs Mayaro Virus Replication in Human Dermal Fibroblasts and HeLa Cells

Autores: **Madelaine Sugasti-Salazar**, Yessica Y. Llamas-González, Dalkiria Campos y **José González-Santamaría**
Artículo publicado el 12 de Junio 2021.

2. Targeting Host PIM Protein Kinases Reduces Mayaro Virus Replication

Autores: **Madelaine Sugasti-Salazar**, Dalkiria Campos, Patricia Valdés-Torres, Paola Elaine Galán-Jurado y **José González-Santamaría**

Artículo publicado el 14 de febrero de 2022.

Article

Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Impairs Mayaro Virus Replication in Human Dermal Fibroblasts and HeLa Cells

Madelaine Sugasti-Salazar ^{1,2} , Yessica Y. Llamas-González ^{1,3} , Dalkiria Campos ¹ and José González-Santamaría ^{1,*} 

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

² Programa de Maestría en Microbiología Ambiental, Universidad de Panamá, Panamá 0824, Panamá

³ Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad de la República, Montevideo 11200, Uruguay

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

Abstract: Mayaro virus (MAYV) hijacks the host's cell machinery to effectively replicate. The mitogen-activated protein kinases (MAPKs) p38, JNK, and ERK1/2 have emerged as crucial cellular factors implicated in different stages of the viral cycle. However, whether MAYV uses these MAPKs to competently replicate has not yet been determined. The aim of this study was to evaluate the impact of MAPK inhibition on MAYV replication using primary human dermal fibroblasts (HDFs) and HeLa cells. Viral yields in supernatants from MAYV-infected cells treated or untreated with inhibitors SB203580, SP600125, U0126, or Losmapimod were quantified using plaque assay. Additionally, viral protein expression was analyzed using immunoblot and immunofluorescence. Knockdown of p38 α /p38 β isoforms was performed in HDFs using the PROTACs molecule NR-7h. Our data demonstrated that HDFs are highly susceptible to MAYV infection. SB203580, a p38 inhibitor, reduced MAYV replication in a dose-dependent manner in both HDFs and HeLa cells. Additionally, SB203580 significantly decreased viral E1 protein expression. Similarly, knockdown or inhibition of p38 α /p38 β isoforms with NR-7h or Losmapimod, respectively, affected MAYV replication in a dose-dependent manner. Collectively, these findings suggest that p38 could play an important role in MAYV replication and could serve as a therapeutic target to control MAYV infection.

Keywords: Mayaro; MAPKs; p38; SB203580; PROTACs; NR-7; Losmapimod; replication; inhibition



Citation: Sugasti-Salazar, M.; Llamas-González, Y.Y.; 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. <https://doi.org/10.3390/v13061156>

Academic Editor: Remi N. Charrel

Received: 24 April 2021

Accepted: 12 June 2021

Published: 17 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Mayaro virus (MAYV) is an emerging, neglected arbovirus belonging to the *Togaviridae* family within the *Alphavirus* genus [1,2]. MAYV was isolated for the first time from the sera of forest workers in Trinidad and Tobago in 1954 [3]. Since then, several studies have revealed increasing activity of this virus in different Latin American countries, including Brazil, Peru, French Guiana, Ecuador, Bolivia, Colombia, Venezuela, Haiti, Panama, and Trinidad and Tobago [4–14].

MAYV causes the disease known as Mayaro fever, which is characterized by non-specific symptoms, including fever, myalgia, rash, headache, retro-orbital pain, diarrhea, vomiting, lymphadenopathy, leukopenia, and arthralgia [15]. MAYV is transmitted through the bites of sylvatic mosquitos, mainly members of the *Haemagogus* genus [15]. However, several laboratory experiments suggest that urban mosquitos, such as *Aedes aegypti* or *Aedes albopictus*, can also spread this virus [16,17]. Consequently, there is a growing concern about MAYV's potential to cause a larger-scale epidemic similar to other arboviruses, such as chikungunya and Zika [18,19].

As an obligatory intracellular pathogen, MAYV relies on the cell machinery to efficiently replicate. In line with this, Barroso and colleagues observed that MAYV activates

casein kinase 2 in an early stage of infection in Vero cells [20]. The inhibition of casein kinase 2 with dichloro-1-(beta-D-ribofuranosyl) benzimidazole decreased MAYV-induced cytopathic effects [20]. Shortly after, the same research group found that MAYV was able to modify glucose metabolism through activation of the enzyme 6-phosphofructo 1-kinase [21]. Additionally, our laboratory showed that proteasome inhibitors MG132 and Lactacystin decrease MAYV replication in a dose-dependent manner, suggesting that the ubiquitin-proteasome system plays an essential role in MAYV replication [22].

In the last decade, growing evidence has suggested that kinases are critical cellular factors for replication in a range of RNA and DNA viruses, and it has been proposed that chemical inhibition of these proteins may represent an antiviral therapeutic strategy [23,24]. Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) control signal transduction pathways that regulate essential cell activities, including proliferation, growth, differentiation, cytokine production, motility, stress response, survival, and apoptosis [25]. Classic MAPKs include p38, c-Jun N-terminal kinase (JNK), and extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) [25]. These enzymes are serine/threonine kinases that are activated by a variety of extracellular stimuli; after activation, the signal is then propagated through the phosphorylation of diverse substrates. Among these substrates are transcription factors, which modulate specific gene expression programs, allowing cells to adapt to different physiological conditions [25]. Previous studies have demonstrated that viruses from various families are able to exploit MAPK activity to favor their replication [26–29]. However, whether MAYV is capable of manipulating these pathways to competently replicate has not yet been investigated. The aim of this study was to assess the effect of MAPK inhibition on MAYV replication using *in vitro* cell models of infection and an array of small inhibitory molecules.

2. Materials and Methods

2.1. Cell lines and Reagents

Normal human dermal fibroblasts (HDFs) from adults (PCS-201-012), Vero-E6 (CRL-1586) (both obtained from the American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) and HeLa cells (kindly provided by Dr. Carmen Rivas, CIMUS, Coruña, Spain) were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (for HDFs) or Minimal Essential Medium (MEM) (for Vero-E6 and HeLa cells). Both media were supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM of L-Glutamine, and 1% penicillin-streptomycin antibiotic solution (all culture reagents were obtained from Gibco, Waltham, MA, USA). All cell lines were incubated at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere. The MAPK inhibitory compounds SB203580 (p38), SP600125 (JNK) and U0126 (MEK1/2) were obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). NR-7h, a p38 α and p38 β isoform degrader, was acquired from Tocris (Minneapolis, MN, USA), and Losmapimod (p38 inhibitor under clinical evaluation) was obtained from Selleckchem (Houston, TX, USA). All compounds were dissolved in Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA) at 10 mM concentration and stored at –20 °C until use. Working solutions of each compound were prepared in DMEM or MEM at the indicated concentrations.

2.2. Virus Strain and Propagation

A Mayaro strain (MAYV, AVR0565, San Martin, Peru) [30] was acquired from the World Reference Center for Emerging Viruses and Arboviruses (WRCEVA) at the University of Texas Medical Branch (UTMB, Galveston, TX, USA) and kindly provided by Dr. Scott Weaver. The MAYV strain was propagated, titrated, aliquoted, and stored as previously reported [22].

2.3. Cell Toxicity Analysis of Small Inhibitory Molecules

The cytotoxicity of inhibitors was evaluated using the MTT method as previously described [22]. Approximately 2.5×10^4 HDFs or HeLa cells were seeded in 96-well plates in DMEM or MEM without phenol red. The next day, cell lines were treated with increasing concentrations of SB203580 (0.5, 2, and 10 μ M), SP600125 (0.5, 1, and 5 μ M), U0126 (1, 5,

and 10 μ M), NR-7h (0.05, 0.2, and 1 μ M), Losmapimod (1, 5, and 10 μ M), or DMSO (0.1%), which served as control, and incubated for 24 h. Then, 5 mg/mL of 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA) solution in PBS was added to the cells and incubated for an additional 4 h. Formazan crystals were dissolved in a solution of 4 mM HCL and 10% Triton X-100 in isopropanol, and absorbance was measured at 570 nm using a microplate reader spectrophotometer (BioTek, Winooski, VT, USA). Results are shown as the percentage of viable cells relative to untreated control cells.

2.4. Viral Infection Assay

HDFs or HeLa cells grown in 12- or 24-well plates were infected with MAYV at a multiplicity of infection (MOI) of 1 and 10, respectively. In all assays, the cells were pre-treated with DMSO (as a control) or with each inhibitor tested at the indicated concentrations and times. Cell supernatants were collected, and viral titers for each experimental condition were quantified using plaque assay. To analyze the E1 viral protein, cell lysates were obtained from mock- or MAYV-infected HDFs or HeLa cells treated or untreated with the inhibitors. Finally, for the virucidal experiments, 10^6 PFU of MAYV were incubated in serum-free MEM with DMSO or MAPK inhibitors SB203580 (10 μ M), SP600125 (1 μ M), or U0126 (10 μ M) for 1 h at 37 °C. After this, the viral particles were measured using plaque assay.

2.5. Virus Titration Assay

Virus titers in cell supernatants were quantified using plaque assay following the procedure described in a previous work [22]. Confluent Vero-E6 cells grown in 6-well plates were infected with 10-fold serial dilutions from cell supernatants for 1 h at 37 °C. After virus absorption, the inoculum was removed and the cells were overlaid with a solution of agar (1%) in MEM supplemented with 2% FBS, and incubated for 3 days at 37 °C. After this, the agar was eliminated and the cells were fixed with 4% formaldehyde solution in PBS and stained with 2% crystal violet prepared in 30% methanol. Lastly, the number of plaques was counted, and the viral titers were recorded as plaque-forming units per milliliter (PFU/mL).

2.6. Analysis of mRNA Expression by Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from MAYV-infected HDFs using an RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) following the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 1 μ g of RNA using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit, and quantitative RT-PCR was performed using Power SYBR Green PCR Master Mix in a QuantStudio™ 5 thermocycler (all from Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) to detect the following immune response genes: *MDA5*, *ISG15*, *MxA*, *RIG-I*, *OAS2*, *AIM2*, *IL1- β* , *TNF- α* , *IL-6*, *RANTES*, *IL-8*, *TLR3*, *TLR7*, *IRF3*, *IRF7*, *IFN- α* , and *IFN- β* . Specific primers for the mRNA expression analysis are listed in Table S1 (Supplementary Material). Relative mRNA expression was determined using the *β -actin* gene for normalization according to the $\Delta\Delta$ CT method [31].

2.7. Protein Analysis

Viral and cellular protein levels were assessed using immunoblot as previously performed [22]. Protein extracts were obtained from mock- or MAYV-infected HDFs or HeLa cells that were treated with different inhibitors or a control in Laemmli buffer with 10% Dithiothreitol (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Proteins were fractionated in SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blocked in a 5% non-fat solution in T-TBS buffer for 30 min. Then, membranes were incubated with the following primary antibodies: rabbit polyclonal anti-E1 (validated in our laboratory [22]), rabbit monoclonal anti-GAPDH (D16H11, Cat. # 5174), rabbit monoclonal anti- β -actin (D6A8, Cat. # 8457), and rabbit monoclonal anti-p38 MAPK (D13E1, Cat. # 8690) (all from Cell Signaling Technology,

Danvers, MA, USA). After this, the membranes were washed 3 times in T-TBS buffer and incubated with HRP-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Cat. # 926-80011, LI-COR, Lincoln, NE, USA) at room temperature for 1 h. Finally, the membranes were incubated with SignalFireTM ECL Reagent (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) for 5 min and the quimioluminescent signal was detected with a C-Digit scanner (LI-COR, Lincoln, NE, USA).

2.8. Knockdown of p38 α and p38 β Isoforms Using Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs)

HDFs grown in 12-well plates were treated with increasing concentrations of the PROTACs compound NR-7h or DMSO, and at the indicated times, p38 α / β protein levels in the cell lysates were evaluated using immunoblot.

2.9. Immunofluorescence Analysis

Immunofluorescence experiments were performed as previously reported [22]. Briefly, HDFs grown on glass coverslips were infected with MAYV at an MOI of 1 and treated with the inhibitors or a control. After 24 h of infection, cells were fixed, permeabilized, blocked, and stained overnight at 4 °C with an anti-MAYV mouse ascitic fluid (kindly provided by Dr. Scott Weaver, WRCEVA-UTMB, Galveston, TX, USA). Next, cells were incubated with a goat anti-mouse secondary antibody (Alexa Flour 488 or Alexa Flour 568, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 1 h in the dark. Lastly, coverslips were mounted on slides with Prolong Diamond Antifade Mountant with Dapi (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and images were acquired with an FV1000 Flowview confocal microscope (Olympus, Lombard, IL, USA). The images were analyzed with ImageJ software.

2.10. Data Analysis

Experimental data were analyzed using the Mann–Whitney test and the One- or Two-way ANOVA test, followed by Dunnett's or Sidak's post-test. GraphPad Prism software version 9.1.0 for Mac was used to perform all statistical tests and create the graphics. A *p* value < 0.05 was considered statistically significant. All experiments were performed at least 3 times with 3 replicates. For each experiment, the mean and standard deviation are shown.

3. Results

3.1. MAYV Infects Primary Human Dermal Fibroblasts in a Time-Dependent Manner

In order to assess whether primary HDFs are susceptible to MAYV infection, we performed an infection kinetics experiment in HDFs with MAYV at an MOI of 1 and evaluated the cytopathic effect after viral infection. In this experiment, we noted a slight cytopathic effect at 24 h post-infection (hpi), which significantly increased at 48 and 72 hpi (Figure S1). To determine whether the cytopathic effect observed was associated with an increase in the number of MAYV-infected cells, we decided to study the presence of MAYV antigens in infected HDFs at different times using an immunofluorescence confocal microscope. As expected, this analysis revealed a time-dependent increase in the number of MAYV-positive cells (Figure 1A). To quantify the viral particles present in the cell supernatants, we completed a similar experiment in which HDFs were infected with MAYV at an MOI of 1 or 10; at different times post-infection, we measured the viral progeny yields using plaque assay. As shown in Figure 1B, we detected viral particles in the supernatants of MAYV-infected HDFs as early as 4 hpi, and there was a clear time-dependent rise in viral titers for both MOIs tested (Figure 1B). To confirm these results, we evaluated the expression of structural E1 viral protein in cell lysates obtained from MAYV-infected HDFs using immunoblot. In this assay, we detected E1 at 16 hpi, and this protein increased over time (Figure 1C). Finally, we investigated if infecting HDFs with MAYV elicits the expression of immune response genes. To accomplish this, we extracted total RNA from mock- or MAYV-infected cells and then used quantitative RT-PCR to measure the expression levels of specific interferon-stimulated genes, inflammatory

cytokines, chemokines, and transcription factor genes implicated in the immune response. As shown in Figure 1D, we observed a strong expression of the *MDA5*, *MxA*, *RIG-I*, *OAS2*, *TLR3*, and *IRF7* genes, while the *ISG15*, *TNF- α* , *RANTES*, *IRF3*, and *IFN- β* genes were expressed to a lesser extent (Figure 1D). Taken together, the described results indicate that MAYV efficiently infects HDFs and stimulates the expression of specific immune response genes.

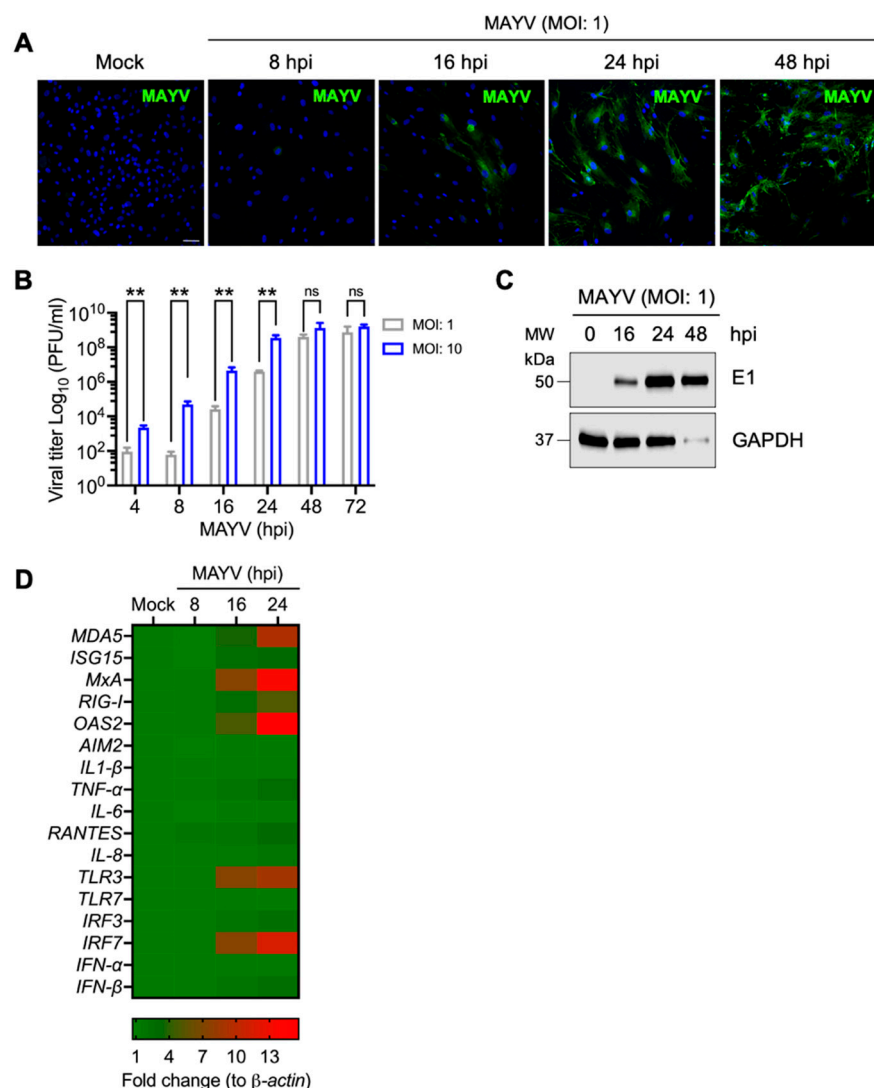


Figure 1. Primary human dermal fibroblasts are susceptible to MAYV infection. **(A)** HDFs grown on glass coverslips were infected with MAYV at an MOI of 1; at different time points, the cells were stained with an anti-MAYV mouse primary antibody, followed by an Alexa-Fluor 488 mouse secondary antibody. Cell nuclei were stained with Dapi. Images were captured with a confocal microscope and analyzed with ImageJ software. Scale bar, 50 μ m. **(B)** HDFs were infected with MAYV at the indicated MOI, and viral progeny production in cell supernatants collected at different time intervals was measured using plaque assay. Viral titers are represented as plaque-forming units per milliliter (PFU/mL). Statistically significant differences were evaluated with the Mann–Whitney test: ** $p < 0.01$; ns: non-significant. **(C)** The levels of viral E1 protein at different time points were determined in cell lysates from mock- or MAYV-infected HDFs using immunoblot. GAPDH protein was used as a loading control. MW: molecular weight. kDa: kilodaltons. **(D)** Heat map showing the expression profile of specific interferon-stimulated genes, inflammatory cytokines, chemokines, and transcription factor genes implicated in the immune response in mock- or MAYV-infected HDFs using quantitative RT-PCR.

3.2. p38 Inhibitor SB203580 Diminishes MAYV Progeny Production in HDFs and HeLa Cells

To explore the potential role of the MAPKs p38 and JNK as well as the ERK1/2 cellular pathways in MAYV replication, we used a pharmacological approach. Our experiments employed small inhibitory molecules that block the activity of these protein kinases and ultimately affect the downstream cellular signaling events controlled by them. Specifically, we selected SB203580, a class of pyridinyl imidazole which is a well-characterized inhibitor of p38 α and p38 β isoforms [32]; SP600125, an anthrapyrazolone molecule with a potent inhibitory effect on JNK1, -2 and 3- isoforms [33]; U0126, which is a selective noncompetitive inhibitor of MEK1 and MEK2, the kinases responsible for phosphorylation and activation of the ERK1/2 pathway [34]. In order to examine the toxicity of the MAPK inhibitors SB203580, SP600125, and U0126 in primary HDFs and HeLa cells, we treated both cell lines with increasing concentrations of each inhibitor and then determined cell viability using the MTT method. As shown in Figure 2, in the case of the SB203580 and U0126 inhibitors, we observed a cell viability of 80% or higher in both cell lines at the maximum dose tested (10 μ M) (Figure 2, panels A and C–F). Conversely, in both cell lines treated with the highest dose of the SP600125 inhibitor (5 μ M), cell viability was less than 80% (Figure 2, panels B,E). These results indicate that the p38 and MEK kinase inhibitor concentrations used were well-tolerated in the cell lines tested, whereas the JNK inhibitor showed cell toxicity. Therefore, we used SP600125 at a concentration of 1 μ M in the subsequent experiments. To evaluate the impact of the MAPK inhibitors on MAYV, we used two human cell lines as infection models: HDFs, which are normal primary cells, and HeLa cells, which are cancer cells derived from a cervix tumor and have previously been shown to be susceptible to MAYV infection [22]. We pre-treated the HDFs or HeLa cells with the inhibitors or DMSO at the indicated concentrations for 1 h. Then, we removed the compounds and infected the HDFs and HeLa cells with MAYV at an MOI of 1 and 10, respectively. After 1 h of virus absorption, we added the MAPK inhibitors or DMSO in fresh medium. After a 24-h incubation period, we collected the cell supernatants to quantify viral production using a plaque assay. In this experiment, when compared to DMSO-treated cells, HDFs treated with the p38 inhibitor SB203580 showed a significant reduction in viral titers, while a less pronounced reduction was observed in treated HeLa cells (Figure 3A,D). In the case of the JNK and MEK inhibitors, SP600125 and U0126, respectively, we noted a minor but significant decrease in viral progeny production in the tumoral HeLa cells only (Figure 3B,C,E,F). To verify whether the observed effect of the MAPK inhibitors was due directly to MAYV infectivity, we carried out a virucidal activity assay. For this, we added 10⁶ PFU of MAYV in MEM medium along with each inhibitor or DMSO (control), incubated the solutions for 1 h at 37 °C, and then directly quantified the remaining virus under each experimental condition as previously indicated. As shown in Figure S2, we did not find a decrease in viral titers in the solutions containing MAYV and the MAPK inhibitors, indicating that these compounds do not have direct virucidal activity. Taken together, these findings suggest that the p38 inhibitor SB203580 significantly decreases MAYV particles' production for both of the cell types tested, whereas the observed effects of the JNK and MEK inhibitors on MAYV production are cell type-dependent.

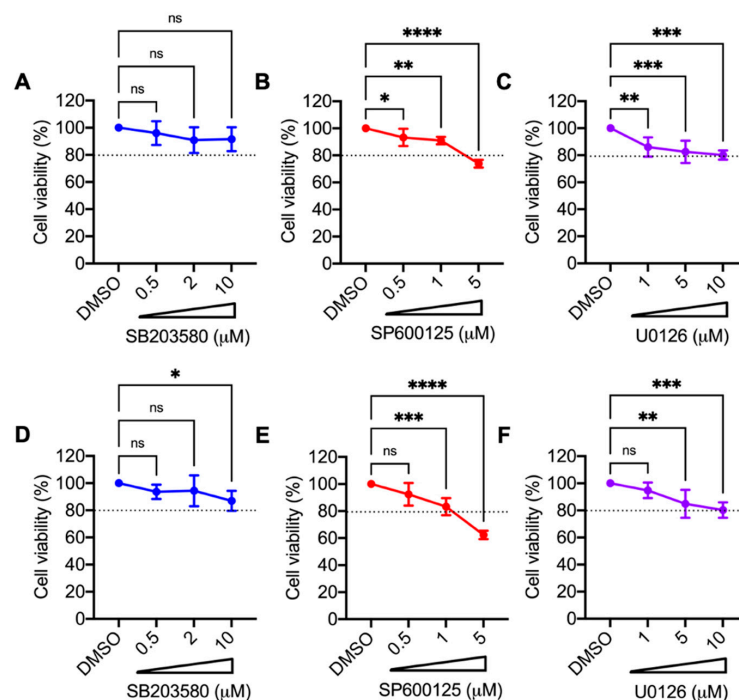


Figure 2. Toxicity of MAPK inhibitors SB203580, SP600125, and U0126 in HDFs or HeLa cells. HDFs (A–C) or HeLa (D–F) cells were treated with the indicated concentrations of each MAPK inhibitor, or DMSO (0.1%) as a control, and after 24 h of incubation, cell viability was assessed using the MTT method. Statistically significant differences were assessed with the One-way ANOVA test followed by Dunnett’s post-test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns: non-significant. The dotted line on the graphs indicates a cell viability of 80%.

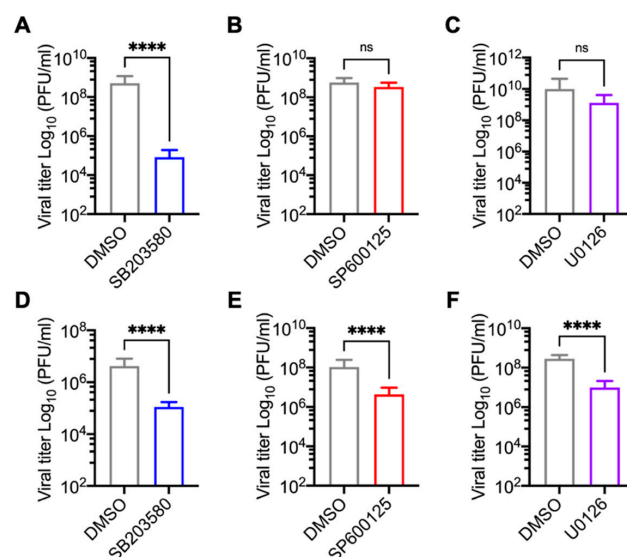


Figure 3. Inhibition of p38 with SB203580 decreases MAYV progeny production in HDFs and HeLa cells. HDFs (A–C) or HeLa (D–F) were pre-treated with SB203580, SP600125, or U0126 at concentrations of 10, 1, and 10 μM, respectively, for 1 h. Then, the compounds were removed and the cells were infected with MAYV at an MOI of 1 (HDFs) or 10 (HeLa cells). After virus adsorption, the MAPK inhibitors dissolved in fresh medium were added to the cells and incubated for 24 h. Viral progeny production in cell supernatants from each experimental condition was quantified using plaque assay. Statistically significant differences were analyzed with the Mann–Whitney test: **** $p < 0.0001$ and ns: non-significant.

3.3. Decrease in MAYV Replication in HDFs and HeLa Cells Treated with p38 Inhibitor SB203580 Is Dose-Dependent

To investigate whether the effect of the MAPK inhibitors on MAYV replication was affected by the drug concentration, we performed a dose-response experiment. HDFs or HeLa cells were pre-treated with the MAPK inhibitors and then infected with MAYV as previously indicated. Then, we quantified the viral titer production in the cell supernatants after 24 h of incubation with the inhibitors or DMSO as previously described. This analysis revealed that treatment with the p38 inhibitor SB203580 led to a significant dose-dependent decrease in viral titers in both cell lines tested (Figure 4A,D). On the other hand, following treatment with the JNK and MEK inhibitors, SP600125 and U0126, respectively, a dose-dependent decrease in viral replication was only observed in the HeLa cells (Figure 4B,C,E,F). These results confirm that the p38 inhibitor SB203580 demonstrates dose-dependent inhibition of MAYV replication regardless of the cell type tested.

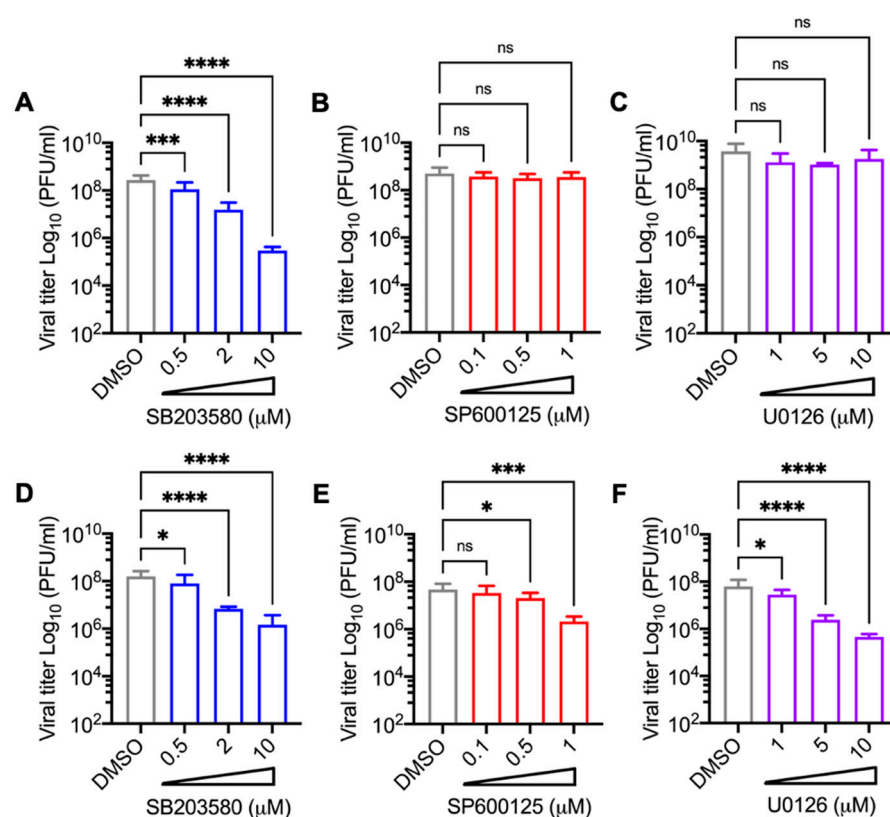


Figure 4. MAPK p38 inhibitor SB203580 reduces MAYV titers in HDFs and HeLa cells in a dose-dependent manner. HDFs (A–C) or HeLa (D–F) cells were pre-treated with increasing concentrations of SB203580, SP600125, or U0126 and then infected with MAYV as previously performed. After 24 h of infection, MAYV titers were measured in cell supernatants using plaque assay. Statistically significant differences were evaluated with the One-way ANOVA test followed by Dunnett’s post-test: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ and ns: non-significant.

3.4. SB203580 Affects the Expression of MAYV Structural E1 Protein in Both HDFs and HeLa Cells

Previous studies have revealed that inhibiting MAPK pathways can affect the expression of several viral proteins [28,35,36]. Thus, to explore a possible mechanism by which MAPK inhibitors affect MAYV replication, we used immunoblot to evaluate the structural E1 protein levels in cell lysates from MAYV-infected HDFs or HeLa cells treated with DMSO or the inhibitors SB203580, SP600125, or U0126 at different times post-infection. As shown in Figure 5, inhibiting p38 with SB203580 promoted a significant reduction in viral E1 protein levels after 24 h of infection when compared to DMSO-treated cells in both of

the cell lines assessed (Figure 5A,B). In the case of SP600125, we observed a slight decrease in E1 in both HDFs and HeLa cells after only 16 h of infection (Figure 5C,D). In contrast, we did not observe any differences in E1 levels in the cells treated with U0126 (Figure 5E,F). These results suggest that inhibiting p38 effectively disrupts the expression of MAYV's E1 protein independent of the cell type examined.

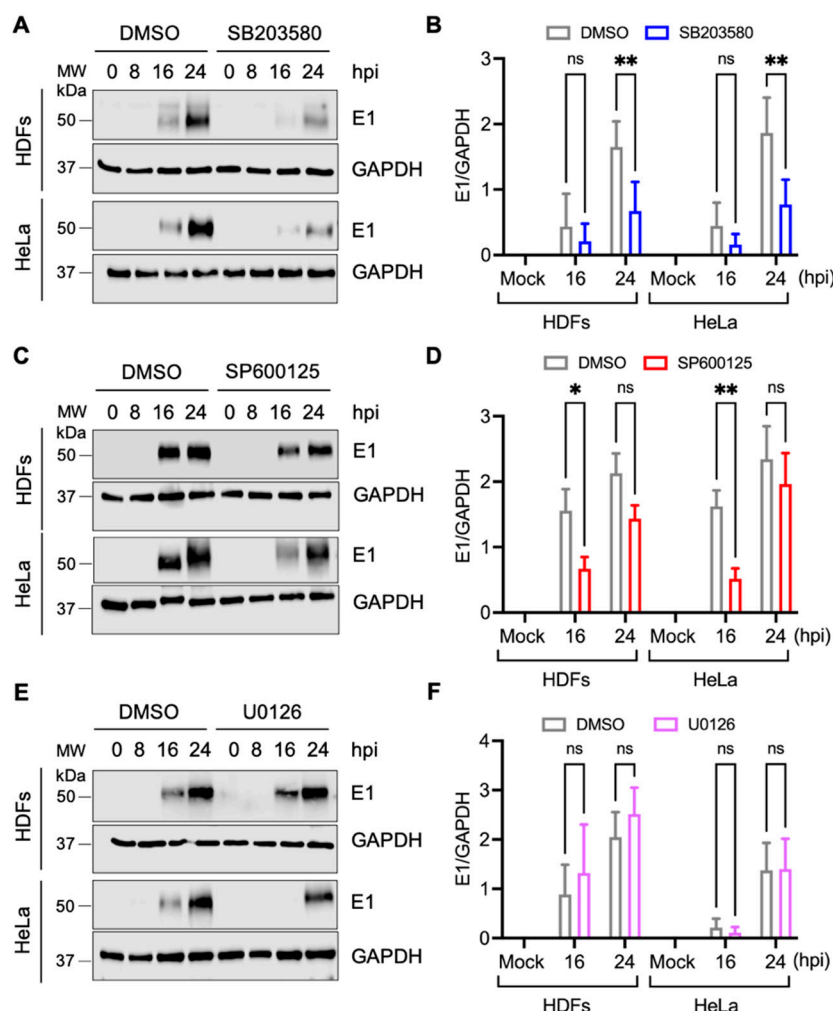


Figure 5. SB203580 disturbs MAYV structural E1 protein expression in both HDFs and HeLa cells. HDFs or HeLa cells were pre-treated with SB203580 (A), SP600125 (C), or U0126 (E) and then infected with MAYV as previously indicated. At different times post-infection, structural E1 viral protein levels were evaluated using immunoblot. GAPDH protein was used as a loading control. MW: molecular weight. kDa: kilodaltons. (B,D,F) Densitometric analysis of E1 protein was performed using ImageJ software and normalized with GAPDH protein. Data were analyzed with the Two-way ANOVA test followed by Sidak's post-test. Statistically significant differences are shown: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and ns: non-significant.

3.5. Knockdown of p38 α and p38 β Isoforms in HDFs with the PROTACs Molecule NR-7h Reduces MAYV Replication

Our previous results with SB203580 indicated that p38 kinase may play a key role in MAYV replication. In order to verify this hypothesis, we used a new experimental pharmacological approach known as Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs) for the following experiments [37]. PROTACs have emerged as a promising therapeutic tool that allow proteins to be targeted for degradation using a ubiquitin proteasome system-dependent mechanism [37]. These small hetero-bifunctional molecules contain three vital structural elements: a protein of interest ligand, an E3 ubiquitin ligase ligand, and a linker

that joins these two components [38]. PROTACs function by recognizing a specific protein substrate and recruiting an E3 ubiquitin ligase that promotes the polyubiquitination of the protein of interest and its subsequent degradation in the proteasome [37,38]. The p38 MAPK family includes four isoforms: p38 α , p38 β , p38 γ , and p38 δ [39,40]. While p38 α and p38 β are ubiquitously expressed in most tissues, p38 γ and p38 δ have restricted expression [40]. Recently, it has been reported that nanomolar concentrations of the PROTACs compound NR-7h are able to induce the specific degradation of p38 α and p38 β isoforms, thereby blocking stress- and cytokine-induced downstream signaling by p38 [41]. With this in mind, we tested the effect of NR-7h in our cell infection model. For this purpose, we chose primary HDFs and treated them with increasing concentrations of NR-7h for 24 h; then, we evaluated the p38 α and p38 β levels using an antibody that recognizes both isoforms. In this analysis, we found high levels of p38 α /p38 β in HDFs treated with DMSO (Figure S3A). However, we did not detect p38 in the cells treated with NR-7h from concentrations as low as 50 nM (Figure S3A,C). In order to determine the time at which p38 α /p38 β degradation occurs, we performed a kinetic experiment in which HDFs were treated with NR-7h at a 1 μ M concentration at different intervals, and the p38 protein levels were assessed. As shown in Figure S3 (panels B and D), after 2 h of NR-7h treatment, we observed that more than 95% of p38 α /p38 β had been degraded. These results indicate that NR-7h quickly and effectively induces p38 α /p38 β degradation in HDFs. To gain insights about the effects of NR-7h-induced p38 α /p38 β degradation on MAYV replication, we pre-treated HDFs with NR-7h or DMSO for 3 h and then infected the cells with MAYV in the presence of NR-7h or DMSO. After 1 h of virus absorption, we removed the inoculum, added NR-7h or DMSO in fresh medium, and then incubated the samples for 24 h. After this, we analyzed the presence of MAYV antigens using immunofluorescence. In DMSO-treated cells, we observed a high number of MAYV antigen-positive cells (Figure 6A). In contrast, we found a clear reduction in MAYV antigen-positive cells in NR-7h-treated cells (Figure 6A). To confirm the preceding results, we pre-treated HDFs with different concentrations of NR-7h and then infected the cells with MAYV as previously indicated. After 24 h of incubation, we collected the cell supernatants and quantified the viral particles' production using plaque assay. In this experiment, we observed a dose-dependent decrease in MAYV viral titers in the cells treated with NR-7h (Figure 6B). This NR-7h-induced decrease in MAYV viral titers did not appear to be associated with cell toxicity, as revealed by our cell viability analysis (Figure 6C). Given that inhibiting p38 with SB203580 disrupted the expression of the MAYV structural E1 protein, we wanted to explore the effect of p38 α /p38 β degradation on viral E1 protein expression. Accordingly, we performed an infection kinetics experiment in which HDFs were infected with MAYV and treated with DMSO (control) or NR-7h as previously indicated; viral E1 protein levels were assessed using immunoblot at different time points. This assay revealed that p38 α /p38 β knockdown promoted a decrease in viral E1 protein levels at 24 hpi (Figure 6D,E). Together, these findings confirm that p38 could play an important role in MAYV replication.

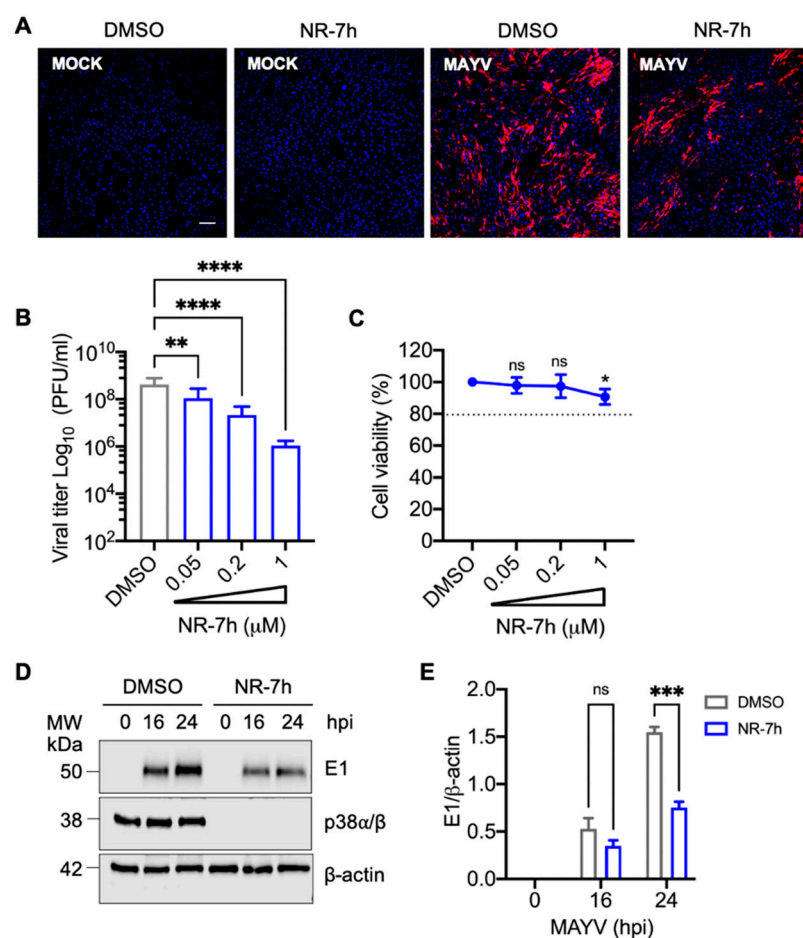


Figure 6. Chemically-induced degradation of p38 α and p38 β isoforms using the PROTACs compound NR-7h affects MAYV replication. **(A)** HDFs were pre-treated with DMSO or NR-7h at 1 μ M for 3 h and then the cells were infected with MAYV as previously indicated. After 24 h of infection, MAYV antigen-positive cells were analyzed using an immunofluorescence assay as previously stated. Cell nuclei were stained with Dapi. Images were obtained with a confocal microscope and analyzed with ImageJ software. Scale bar, 100 μ m. **(B)** HDFs were pre-treated with increasing concentrations of NR-7h and then infected with MAYV as previously performed. After 24 h of infection, viral progeny production in cell supernatants was assessed using plaque assay. Viral titers were expressed as plaque-forming units per milliliter (PFU/mL). **(C)** HDFs were treated with the indicated concentrations of NR-7h for 24 h and then cell viability was estimated as previously performed. The dotted line on the graph indicates a cell viability of 80%. **(D)** HDFs were pre-treated with NR-7h and then infected as stated above. At several time points, viral E1 or p38 α /p38 β protein levels were analyzed using immunoblot. B-actin protein was used as a loading control. MW: molecular weight. kDa: kilodaltons. **(E)** Intensity bands of viral E1 protein were analyzed with ImageJ software and normalized with B-actin protein. Data were analyzed with the One- or Two-way ANOVA test followed by Dunnett's or Sidak's post-test. Statistically significant differences are denoted: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ and ns: non-significant.

3.6. Losmapimod, a p38 Inhibitor under Clinical Evaluation, Decreases MAYV Replication in HDFs

Since p38 has been implicated in different pathologies, including inflammatory diseases, neurological disorders, and cancer, pharmaceutical companies have developed diverse small inhibitory molecules targeting this kinase [39,40,42,43]. Among them, Losmapimod is a highly selective and potent inhibitor against p38 α and p38 β isoforms that has been evaluated in different clinical trials and shown to be well-tolerated and safe [44–46]. Therefore, we wanted to investigate the potential antiviral activity of Losmapimod with

MAYV. For this, we pre-treated HDFs with Losmapimod or DMSO, infected the cells as previously performed, and assessed the number of MAYV antigen-positive cells using an immunofluorescence assay. As shown in Figure 7, we observed a reduction in MAYV antigen-positive cells with Losmapimod treatment compared to DMSO-treated cells (Figure 7A). To determine the impact of this drug on viral progeny production, we pre-treated HDFs with increasing concentrations of Losmapimod, infected the cells as previously indicated, and incubated them with Losmapimod or DMSO for 24 h. After this, we collected the cell supernatants and quantified the viral progeny production as previously performed. In this experiment, we found that Losmapimod-treated cells showed a concentration-dependent decrease in MAYV titers (Figure 7B), and this effect was not due to the cell toxicity of the inhibitor (Figure 7C). Finally, we analyzed E1 protein levels in HDFs treated with DMSO or Losmapimod at different time points after infection. This analysis revealed that Losmapimod induces a reduction in viral E1 protein expression. These results confirm that p38 plays a relevant role in MAYV replication and also suggest that this kinase could represent a pharmacological target to control MAYV infection.

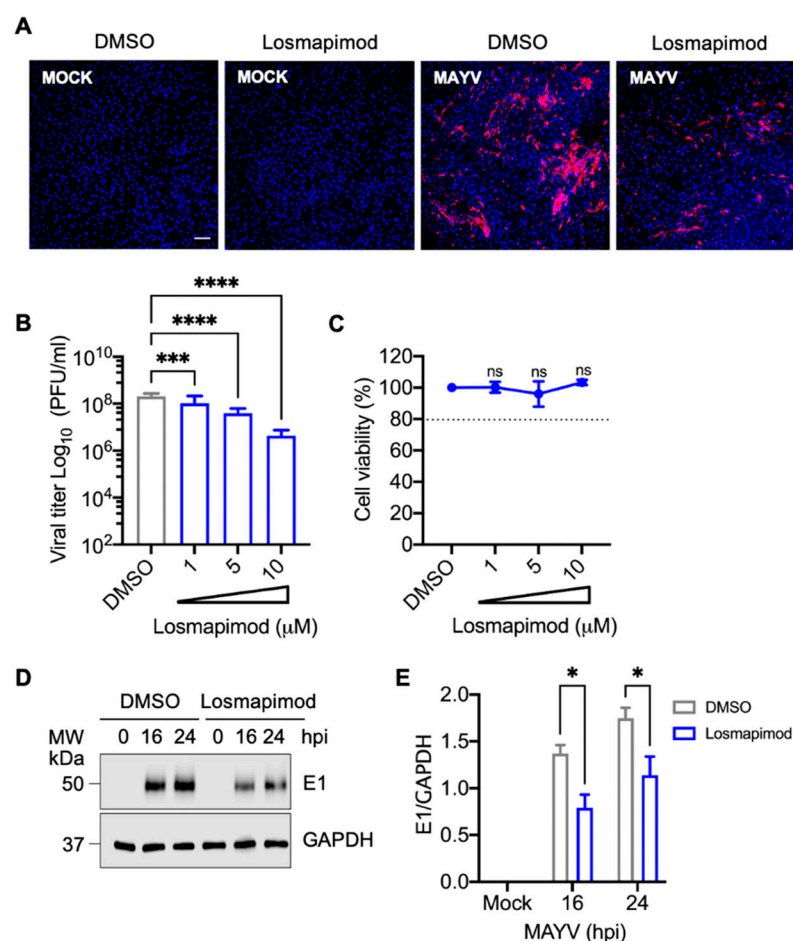


Figure 7. Losmapimod treatment of HDFs reduces MAYV replication in a dose-dependent manner. (A) HDFs grown on glass coverslips were pre-treated with Losmapimod at a concentration of 10 μ M or DMSO for 1 h. After this, cells were infected with MAYV and incubated with DMSO or Losmapimod in fresh medium for 24 h. Then, MAYV antigen-positive cells were evaluated as previously stated. Cell nuclei were stained with Dapi. Images were captured with a confocal microscope and examined with ImageJ software. Scale bar, 100 μ m. (B) HDFs were pre-treated with Losmapimod at the indicated concentrations and then infected as previously stated. Viral progeny production in cell supernatants collected at 24 hpi was analyzed using plaque assay. Viral titers were expressed as plaque-forming units per milliliter (PFU/mL). (C) HDFs were treated with the indicated concentrations of Losmapimod and after 24 h of incubation, cell viability was assessed as previously

indicated. The dotted line on the graph indicates a cell viability of 80%. (D) Viral E1 protein levels were analyzed in Losmapimod-treated and untreated HDFs using immunoblot. GAPDH protein was used as a loading control. (E) Densitometric analysis of E1 viral protein was performed with ImageJ software and normalized with GAPDH protein. Data were analyzed with the One- or Two-way ANOVA test followed by Dunnett's or Sidak's post-test. The statistically significant differences are shown: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ and ns: non-significant.

4. Discussion

MAYV is an emerging but poorly characterized arbovirus with increasing recorded activity in the Latin American region [9]. Despite its potential to cause an epidemic, there are no approved vaccines or antiviral compounds to combat this pathogen [1]. As a result, it is imperative to find molecules with anti-MAYV activity. MAYV, like other viruses, must manipulate an array of the host's cellular process in order to successfully replicate [20–22]. Therefore, a reasonable strategy for discovering possible treatments consists of identifying key cellular factors or pathways required for MAYV replication. The MAPKs p38, JNK, and ERK1/2 are enzymes that regulate essential cell functions and have emerged as crucial cellular factors implicated in different stages of the viral cycle. Moreover, various authors have proposed that inhibiting these enzymes could represent a therapeutic antiviral approach [23,28,35,47].

In this study, we analyzed the impact of inhibiting the p38, JNK, and ERK1/2 MAPK pathways on MAYV replication using two cell models of infection: primary HDFs or HeLa cells. Previously, we have shown the utility of HeLa cells as a MAYV infection model to identify potential antiviral drugs [22,48]. However, we did not know if HDFs were susceptible to this virus. For this reason, we first performed an infection kinetics experiment with these cells; at different time points we evaluated various parameters, among them: cytopathic effects, the presence of MAYV proteins in infected cells, and viral progeny production in cell supernatants. Our results demonstrate that HDFs are highly susceptible to MAYV infection. Moreover, MAYV is able to elicit the expression of specific interferon-stimulated genes, pro-inflammatory cytokines, chemokines, and transcription factors genes implicated in the immune response. These findings are in agreement with a recent study by Bengue and colleagues, which demonstrates that MAYV is also capable of infecting human brain cells and eliciting a strong antiviral response [49]. Additional research groups have demonstrated that other arboviruses, including chikungunya virus, West Nile virus and Zika virus, also efficiently infect HDFs and similarly induce an antiviral state in these cells [50,51].

Having demonstrated that HDFs are a feasible model for MAYV infection, we decided to study the effect of the MAPK inhibitors SB203580, SP600125, and U0126 on MAYV replication. Our results indicate that the p38 inhibitor SB203580 promotes a significant dose-dependent reduction in MAYV titers in both HDFs and HeLa cells. On the other hand, the inhibition of the JNK or ERK1/2 pathways with SP600125 or U0126, respectively, only appears to slightly affect MAYV replication in HeLa cells. Importantly, the observed effects of MAPK inhibitors on MAYV replication did not appear to result from virucidal activity by these compounds. Previous reports have shown that p38 inhibition affects the replication of viruses from different families, among them: enterovirus 71, hepatitis C virus, influenza virus, chikungunya virus, and SARS-CoV-2 [27,35,52–54].

In an attempt to explore a possible mechanism by which MAPK inhibitors disrupt MAYV replication, we analyzed the expression of structural E1 protein in HDFs or HeLa cells treated with these compounds. Our data reveal that the p38 inhibitor SB203580 results in a robust attenuation of viral E1 protein expression in both the cell lines tested. Conversely, we only observed a slight reduction in viral E1 protein expression following inhibition of the JNK or ERK1/2 pathways, suggesting again that p38 may have an important function in MAYV replication. These findings are in agreement with prior studies which show that blocking p38 activity can reduce the expression of several viral proteins [27,53,55].

In order to further prove p38's importance in the MAYV replication process, we performed a p38 α and p38 β isoform knockdown experiment in HDFs infected with MAYV using a new class of molecules known as PROTACs. PROTACs technology allows any protein to be targeted for degradation through an ubiquitin-proteasome system-dependent mechanism [38]. Recently, Donoghue and collaborators demonstrated that the PROTACs compound NR-7h is able to induce p38 α and p38 β isoform degradation, thus blocking downstream p38 signaling [41]. Similarly, our data reveal that knockdown of the p38 α and p38 β isoforms in NR-7h-treated HDFs promotes a dose-dependent decline in MAYV antigen-positive cells and viral titers. Moreover, we observed a decrease in viral E1 protein expression, confirming that p38 could play an important role in MAYV replication. Previous work has shown that PROTAC compounds, which directly target several viral proteins, may be an antiviral therapeutic strategy [56,57].

Given the prominent role of p38 kinase in controlling a plethora of cellular processes, its dysregulation has been associated with numerous pathologies [40]. Thus, the pharmaceutical industry has developed diverse inhibitory molecules targeting this kinase [39]. Among them, Losmapimod is a potent p38 α and p38 β isoform inhibitor that has been evaluated in different clinical trials and shown to be well-tolerated and safe [44,45]. In order to validate our previous findings, we treated HDFs with Losmapimod and then evaluated the impact on MAYV replication. Our results indicate again that p38 inhibition with this drug affects MAYV replication in a dose-dependent manner. In addition, we observed a reduction in viral E1 protein expression, suggesting that p38 might serve as a therapeutic target to control MAYV infection. Zhang and collaborators showed that Losmapimod is able to inhibit Lassa virus entry, although through a mechanism not involving p38 inhibition [58]. In another study, Losmapimod was shown to disrupt SARS-CoV-2 replication in a model of primary alveolar epithelial cells, suggesting that p38 is a potential target for COVID-19 treatment [59]. In fact, Losmapimod is currently being tested in a clinical trial with COVID-19-infected patients [40].

Though our in vitro analyses point to p38 kinase as a probable cellular target to treat MAYV infection, these findings should be corroborated in exhaustive animal studies to determine the feasibility of using p38 inhibitors as antiviral drugs. Nevertheless, based on our results, we propose that p38 kinase plays a key role in MAYV replication and highlight this MAPK as a therapeutic target candidate to combat MAYV infection.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v13061156/s1>, Table S1: List of primers used in this study. Figure S1: MAYV induces a strong time-dependent cytopathic effect in primary HDFs. Figure S2: MAPK inhibitors SB203580, SP600125 and U0126 show no virucidal activity against MAYV. Figure S3: Knockdown of p38 α and p38 β isoforms using the PROTAC compound NR-7h in HDFs.

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

Funding: This research was funded by Ministerio de Economía y Finanzas de Panamá (MEF), grant number 19911.012 (J.G.-S.). M.S.-S. was supported by a Master of Science fellowship from Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de Panamá (SENACYT) and Universidad de Panamá, grant number 68-2017. J.G.-S. was partially supported by Sistema Nacional de Investigación (SNI from SENACYT), grant number 23-2021.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank Scott Weaver (WRCEVA, UTMB, USA) for providing antibodies and the Mayaro strain; Carmen Rivas for providing the HeLa cells; Rodolfo Contreras and Nicanor Obaldía for their support with laboratory facilities; and Jorge Ceballos for his help and access to the confocal microscope at the Smithsonian Tropical Research Institute in Panama.

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

References

1. Acosta-Ampudia, Y.; Monsalve, D.M.; Rodriguez, Y.; Pacheco, Y.; Anaya, J.M.; Ramirez-Santana, C. Mayaro: An emerging viral threat? *Emerg. Microbes Infect.* **2018**, *7*, 163. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Figueiredo, M.L.; Figueiredo, L.T. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2014**, *47*, 677–683. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Anderson, C.R.; Downs, W.G.; Wattley, G.H.; Ahin, N.W.; Reese, A.A. Mayaro virus: A new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, B.W.I. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1957**, *6*, 1012–1016. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Saatkamp, C.J.; Rodrigues, L.R.R.; Pereira, A.M.N.; Coelho, J.A.; Marques, R.G.B.; Souza, V.C.; Nascimento, V.A.D.; Saatkamp, J.; Naveca, F.G.; Figueiredo, R.M.P. Mayaro virus detection in the western region of Para state, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2021**, *54*, e0055. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Lima, W.G.; Pereira, R.S.; da Cruz Nizer, W.S.; Brito, J.C.M.; Godoi, I.P.; Cardoso, V.N.; Fernandes, S.O.A.; Ferreira, J.M.S. Rate of exposure to Mayaro virus (MAYV) in Brazil between 1955 and 2018: A systematic review and meta-analysis. *Arch. Virol.* **2021**, *166*, 347–361. [\[CrossRef\]](#)
6. Perez, J.G.; Carrera, J.P.; Serrano, E.; Pitti, Y.; Maguina, J.L.; Mentaberre, G.; Lescano, A.G.; Valderrama, A.; Mayor, P. Serologic Evidence of Zoonotic Alphaviruses in Humans from an Indigenous Community in the Peruvian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2019**, *101*, 1212–1218. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Aguilar-Luis, M.A.; Del Valle-Mendoza, J.; Sandoval, I.; Silva-Caso, W.; Mazulis, F.; Carrillo-Ng, H.; Tarazona-Castro, Y.; Martins-Luna, J.; Aquino-Ortega, R.; Pena-Tuesta, I.; et al. A silent public health threat: Emergence of Mayaro virus and co-infection with Dengue in Peru. *BMC Res. Notes* **2021**, *14*, 29. [\[CrossRef\]](#)
8. Hoze, N.; Salje, H.; Rousset, D.; Fritzell, C.; Vanhomwegen, J.; Bailly, S.; Najm, M.; Enfissi, A.; Manuguerra, J.C.; Flamand, C.; et al. Reconstructing Mayaro virus circulation in French Guiana shows frequent spillovers. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 2842. [\[CrossRef\]](#)
9. Ganjian, N.; Riviere-Cinamond, A. Mayaro virus in Latin America and the Caribbean. *Rev. Panam. Salud Publica* **2020**, *44*, e14. [\[CrossRef\]](#)
10. Blohm, G.M.; Marquez-Colmenarez, M.C.; Lednicky, J.A.; Bonny, T.S.; Mavian, C.; Salemi, M.; Delgado-Noguera, L.; Morris, J.G.; Paniz-Mondolfi, A.E. Isolation of Mayaro Virus from a Venezuelan Patient with Febrile Illness, Arthralgias, and Rash: Further Evidence of Regional Strain Circulation and Possible Long-Term Endemicity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2019**, *101*, 1219–1225. [\[CrossRef\]](#)
11. Lednicky, J.; De Rochars, V.M.; Elbadry, M.; Loeb, J.; Telisma, T.; Chavannes, S.; Anilis, G.; Cella, E.; Ciccozzi, M.; Okech, B.; et al. Mayaro Virus in Child with Acute Febrile Illness, Haiti, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 2000–2002. [\[CrossRef\]](#)
12. Blohm, G.; Elbadry, M.A.; Mavian, C.; Stephenson, C.; Loeb, J.; White, S.; Telisma, T.; Chavannes, S.; Beau De Rochar, V.M.; Salemi, M.; et al. Mayaro as a Caribbean traveler: Evidence for multiple introductions and transmission of the virus into Haiti. *Int. J. Infect. Dis.* **2019**, *87*, 151–153. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Carrera, J.P.; Cucunuba, Z.M.; Neira, K.; Lambert, B.; Pitti, Y.; Liscano, J.; Garzon, J.L.; Beltran, D.; Collado-Mariscal, L.; Saenz, L.; et al. Endemic and Epidemic Human Alphavirus Infections in Eastern Panama: An Analysis of Population-Based Cross-Sectional Surveys. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2020**, *103*, 2429–2437. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Gonzalez-Escobar, G.; Churaman, C.; Rampersad, C.; Singh, R.; Nathaniel, S. Mayaro virus detection in patients from rural and urban areas in Trinidad and Tobago during the Chikungunya and Zika virus outbreaks. *Pathog. Glob. Health* **2021**, 1–9. [\[CrossRef\]](#)
15. Azar, S.R.; Campos, R.K.; Bergren, N.A.; Camargos, V.N.; Rossi, S.L. Epidemic Alphaviruses: Ecology, Emergence and Outbreaks. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1167. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Long, K.C.; Ziegler, S.A.; Thangamani, S.; Hausser, N.L.; Kochel, T.J.; Higgs, S.; Tesh, R.B. Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2011**, *85*, 750–757. [\[CrossRef\]](#)
17. Pereira, T.N.; Carvalho, F.D.; De Mendonca, S.F.; Rocha, M.N.; Moreira, L.A. Vector competence of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes for Mayaro virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2020**, *14*, e0007518. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Esposito, D.L.A.; Fonseca, B. Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? *Braz. J. Infect. Dis.* **2017**, *21*, 540–544. [\[CrossRef\]](#)
19. Rodriguez-Morales, A.J.; Paniz-Mondolfi, A.E.; Villamil-Gomez, W.E.; Navarro, J.C. Mayaro, Oropouche and Venezuelan Equine Encephalitis viruses: Following in the footsteps of Zika? *Travel Med. Infect. Dis.* **2017**, *15*, 72–73. [\[CrossRef\]](#)
20. Barroso, M.M.; Lima, C.S.; Silva-Neto, M.A.; Da Poian, A.T. Mayaro virus infection cycle relies on casein kinase 2 activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *296*, 1334–1339. [\[CrossRef\]](#)
21. El-Bacha, T.; Menezes, M.M.; Azevedo e Silva, M.C.; Sola-Penna, M.; Da Poian, A.T. Mayaro virus infection alters glucose metabolism in cultured cells through activation of the enzyme 6-phosphofructo 1-kinase. *Mol. Cell Biochem.* **2004**, *266*, 191–198. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

22. Llamas-Gonzalez, Y.Y.; Campos, D.; Pascale, J.M.; Arbiza, J.; Gonzalez-Santamaria, J. A Functional Ubiquitin-Proteasome System is Required for Efficient Replication of New World Mayaro and Una Alphaviruses. *Viruses* **2019**, *11*, 370. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Keating, J.A.; Striker, R. Phosphorylation events during viral infections provide potential therapeutic targets. *Rev. Med. Virol.* **2012**, *22*, 166–181. [\[CrossRef\]](#)
24. Keck, F.; Ataey, P.; Amaya, M.; Bailey, C.; Narayanan, A. Phosphorylation of Single Stranded RNA Virus Proteins and Potential for Novel Therapeutic Strategies. *Viruses* **2015**, *7*, 5257–5273. [\[CrossRef\]](#)
25. Plotnikov, A.; Zehorai, E.; Procaccia, S.; Seger, R. The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1813*, 1619–1633. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Rahaus, M.; Desloges, N.; Wolff, M.H. Replication of varicella-zoster virus is influenced by the levels of JNK/SAPK and p38/MAPK activation. *J. Gen. Virol.* **2004**, *85*, 3529–3540. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Cheng, Y.; Sun, F.; Wang, L.; Gao, M.; Xie, Y.; Sun, Y.; Liu, H.; Yuan, Y.; Yi, W.; Huang, Z.; et al. Virus-induced p38 MAPK activation facilitates viral infection. *Theranostics* **2020**, *10*, 12223–12240. [\[CrossRef\]](#)
28. Voss, K.; Amaya, M.; Mueller, C.; Roberts, B.; Kehn-Hall, K.; Bailey, C.; Petricoin, E., 3rd; Narayanan, A. Inhibition of host extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation decreases new world alphavirus multiplication in infected cells. *Virology* **2014**, *468–470*, 490–503. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Brunetti, J.E.; Foscaldi, S.; Quintana, V.M.; Scolaro, L.A.; Lopez, N.; Castilla, V. Role of the ERK1/2 Signaling Pathway in the Replication of Junin and Tacaribe Viruses. *Viruses* **2018**, *10*, 199. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Powers, A.M.; Aguilar, P.V.; Chandler, L.J.; Brault, A.C.; Meakins, T.A.; Watts, D.; Russell, K.L.; Olson, J.; Vasconcelos, P.F.; Da Rosa, A.T.; et al. Genetic relationships among Mayaro and Una viruses suggest distinct patterns of transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *75*, 461–469. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Cuenda, A.; Rouse, J.; Doza, Y.N.; Meier, R.; Cohen, P.; Gallagher, T.F.; Young, P.R.; Lee, J.C. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett.* **1995**, *364*, 229–233. [\[CrossRef\]](#)
33. Bennett, B.L.; Sasaki, D.T.; Murray, B.W.; O’Leary, E.C.; Sakata, S.T.; Xu, W.; Leisten, J.C.; Motiwala, A.; Pierce, S.; Satoh, Y.; et al. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 13681–13686. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Favata, M.F.; Horiuchi, K.Y.; Manos, E.J.; Daulerio, A.J.; Stradley, D.A.; Feeser, W.S.; Van Dyk, D.E.; Pitts, W.J.; Earl, R.A.; Hobbs, F.; et al. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 18623–18632. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Zhang, Z.; Wang, B.; Wu, S.; Wen, Y.; Wang, X.; Song, X.; Zhang, J.; Hou, L.; Chen, W. PD169316, a specific p38 inhibitor, shows antiviral activity against Enterovirus71. *Virology* **2017**, *508*, 150–158. [\[CrossRef\]](#)
36. Jeon, J.H.; Lee, Y.J.; Lee, C. Porcine deltacoronavirus activates the Raf/MEK/ERK pathway to promote its replication. *Virus Res.* **2020**, *283*, 197961. [\[CrossRef\]](#)
37. Cromm, P.M.; Crews, C.M. Targeted Protein Degradation: From Chemical Biology to Drug Discovery. *Cell Chem. Biol.* **2017**, *24*, 1181–1190. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Sun, X.; Gao, H.; Yang, Y.; He, M.; Wu, Y.; Song, Y.; Tong, Y.; Rao, Y. PROTACs: Great opportunities for academia and industry. *Signal. Transduct. Target. Ther.* **2019**, *4*, 64. [\[CrossRef\]](#)
39. Coulthard, L.R.; White, D.E.; Jones, D.L.; McDermott, M.F.; Burchill, S.A. p38(MAPK): Stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends Mol. Med.* **2009**, *15*, 369–379. [\[CrossRef\]](#)
40. Canovas, B.; Nebreda, A.R. Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
41. Donoghue, C.; Cubillos-Rojas, M.; Gutierrez-Prat, N.; Sanchez-Zarzalejo, C.; Verdaguer, X.; Riera, A.; Nebreda, A.R. Optimal linker length for small molecule PROTACs that selectively target p38alpha and p38beta for degradation. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *201*, 112451. [\[CrossRef\]](#)
42. Kumar, S.; Boehm, J.; Lee, J.C. p38 MAP kinases: Key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 717–726. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Lee, J.K.; Kim, N.J. Recent Advances in the Inhibition of p38 MAPK as a Potential Strategy for the Treatment of Alzheimer’s Disease. *Molecules* **2017**, *22*, 1287. [\[CrossRef\]](#)
44. Ino, H.; Takahashi, N.; Terao, T.; Igarashi, H.; Sarai, N. Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of losmapimod in healthy Japanese volunteers. *Clin. Pharmacol. Drug Dev.* **2015**, *4*, 262–269. [\[CrossRef\]](#)
45. O’Donoghue, M.L.; Glaser, R.; Cavender, M.A.; Aylward, P.E.; Bonaca, M.P.; Budaj, A.; Davies, R.Y.; Dellborg, M.; Fox, K.A.; Gutierrez, J.A.; et al. Effect of Losmapimod on Cardiovascular Outcomes in Patients Hospitalized With Acute Myocardial Infarction: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **2016**, *315*, 1591–1599. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Fisk, M.; Cheriyan, J.; Mohan, D.; Forman, J.; Maki-Petaja, K.M.; McEniery, C.M.; Fuld, J.; Rudd, J.H.F.; Hopkinson, N.S.; Lomas, D.A.; et al. The p38 mitogen activated protein kinase inhibitor losmapimod in chronic obstructive pulmonary disease patients with systemic inflammation, stratified by fibrinogen: A randomised double-blind placebo-controlled trial. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0194197. [\[CrossRef\]](#)

47. Grimes, J.M.; Grimes, K.V. p38 MAPK inhibition: A promising therapeutic approach for COVID-19. *J. Mol. Cell Cardiol.* **2020**, *144*, 63–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Campos, D.; Navarro, S.; Llamas-Gonzalez, Y.Y.; Sugasti, M.; Gonzalez-Santamaria, J. Broad Antiviral Activity of Ginkgolic Acid against Chikungunya, Mayaro, Una, and Zika Viruses. *Viruses* **2020**, *12*, 449. [[CrossRef](#)]
49. Bengue, M.; Ferraris, P.; Barthelemy, J.; Diagne, C.T.; Hamel, R.; Liegeois, F.; Nougairede, A.; de Lamballerie, X.; Simonin, Y.; Pompon, J.; et al. Mayaro Virus Infects Human Brain Cells and Induces a Potent Antiviral Response in Human Astrocytes. *Viruses* **2021**, *13*, 465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Ekchariyawat, P.; Hamel, R.; Bernard, E.; Wichit, S.; Surasombatpattana, P.; Talignani, L.; Thomas, F.; Choumet, V.; Yssel, H.; Despres, P.; et al. Inflammasome signaling pathways exert antiviral effect against Chikungunya virus in human dermal fibroblasts. *Infect. Genet. Evol.* **2015**, *32*, 401–408. [[CrossRef](#)]
51. Hamel, R.; Dejarnac, O.; Wichit, S.; Ekchariyawat, P.; Neyret, A.; Luplertlop, N.; Perera-Lecoin, M.; Surasombatpattana, P.; Talignani, L.; Thomas, F.; et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J. Virol.* **2015**, *89*, 8880–8896. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Nayak, T.K.; Mamidi, P.; Sahoo, S.S.; Kumar, P.S.; Mahish, C.; Chatterjee, S.; Subudhi, B.B.; Chattopadhyay, S.; Chattopadhyay, S. P38 and JNK Mitogen-Activated Protein Kinases Interact With Chikungunya Virus Non-structural Protein-2 and Regulate TNF Induction During Viral Infection in Macrophages. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 786. [[CrossRef](#)]
53. Bouhaddou, M.; Memon, D.; Meyer, B.; White, K.M.; Rezelj, V.V.; Correa Marrero, M.; Polacco, B.J.; Melnyk, J.E.; Ulferts, S.; Kaake, R.M.; et al. The Global Phosphorylation Landscape of SARS-CoV-2 Infection. *Cell* **2020**, *182*, 685–712. [[CrossRef](#)]
54. Borgeling, Y.; Schmolke, M.; Viemann, D.; Nordhoff, C.; Roth, J.; Ludwig, S. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase impairs influenza virus-induced primary and secondary host gene responses and protects mice from lethal H5N1 infection. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 13–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Peng, H.; Shi, M.; Zhang, L.; Li, Y.; Sun, J.; Zhang, L.; Wang, X.; Xu, X.; Zhang, X.; Mao, Y.; et al. Activation of JNK1/2 and p38 MAPK signaling pathways promotes enterovirus 71 infection in immature dendritic cells. *BMC Microbiol.* **2014**, *14*, 147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Montrose, K.; Krissansen, G.W. Design of a PROTAC that antagonizes and destroys the cancer-forming X-protein of the hepatitis B virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *453*, 735–740. [[CrossRef](#)]
57. de Wispelaere, M.; Du, G.; Donovan, K.A.; Zhang, T.; Eleuteri, N.A.; Yuan, J.C.; Kalabathula, J.; Nowak, R.P.; Fischer, E.S.; Gray, N.S.; et al. Small molecule degraders of the hepatitis C virus protease reduce susceptibility to resistance mutations. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3468. [[CrossRef](#)]
58. Zhang, X.; Yan, F.; Tang, K.; Chen, Q.; Guo, J.; Zhu, W.; He, S.; Banadyga, L.; Qiu, X.; Guo, Y. Identification of a clinical compound losmapimod that blocks Lassa virus entry. *Antiviral Res.* **2019**, *167*, 68–77. [[CrossRef](#)]
59. Hekman, R.M.; Hume, A.J.; Goel, R.K.; Abo, K.M.; Huang, J.; Blum, B.C.; Werder, R.B.; Suder, E.L.; Paul, I.; Phanse, S.; et al. Actionable Cytopathogenic Host Responses of Human Alveolar Type 2 Cells to SARS-CoV-2. *Mol. Cell* **2020**, *80*, 1104–1122. [[CrossRef](#)]

Supplementary material

Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Impairs Mayaro Virus Replication in Primary Human Dermal Fibroblasts and HeLa Cells

Madelaine Sugasti ^{1,2}, Yessica Y. Llamas-González ^{1,3}, Dalkiria Campos ¹ and José González-Santamaría ^{1,*}

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

² Programa de Maestría en Microbiología Ambiental, Universidad de Panamá, Panamá, 3366, Panamá;

³ Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad de la República, Montevideo 11200, Uruguay

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

Table S1. List of primers used in this study.

Gene	Primer sequences (5'-3')	References
<i>MDA5</i>	Forward: GCCATTGCAGATGCAACCAG Reverse: TTGCGATTTCTTCTTTTGCAG	[1]
<i>ISG15</i>	Forward: GAGAGGCAGCGAACTCATCT Reverse: CTCAGCTCTGACACCGACA	[2]
<i>MxA</i>	Forward: GGTGGTGGTCCCCAGTAATG Reverse: ACCACGTCCACAACCTTGTCT	[3]
<i>RIG-I</i>	Forward: TGTTCCTCAGATCCCTTGGATG Reverse: CACTGCTCACCAGATTGCAT	[4]
<i>OAS2</i>	Forward: AAACCAGGCCTGTGATCTTG Reverse: GGGCTATTTCCAGACAACGC	[1]
<i>AIM2</i>	Forward: ATCAGGAGGCTGATCCCAAAG Reverse: TCTTCATCACTGCAGACACCG	[1]
<i>IL1-β</i>	Forward: AACCTCTTCGAGGCACAAGG Reverse: GTCCTGGAAGGAGCACTTCAT	[1]
<i>TNF-α</i>	Forward: CAGAGGGAAGAGTTCCCCAGGGACC Reverse: CCTTGGTCTGGTAGGAGACGG	[5]
<i>IL-6</i>	Forward: TGTGAAAGCAGCAAAGAGGCACTG Reverse: ACAGCTCTGGCTTGTTCTCACTA	[4]
<i>RANTES</i>	Forward: GAGGCTTCCCCTCACTATCC Reverse: CTCAAGTGATCCACCCACCT	[4]
<i>IL-8</i>	Forward: CAGCCAAAACCTCCACAGTCA Reverse: TTGGAGAGCACATAAAAAACATCT	[4]
<i>TLR3</i>	Forward: TGGGACCAAGGCAAAGGAGT Reverse: TTCTCTTGGTTGGGCCACCT	[1]
<i>TLR7</i>	Forward: AATGTCACAGCCGTCCCTAC Reverse: TTATTTTACACGGCGCACA	[1]
<i>IRF3</i>	Forward: GATGCACAGCAGGAGGATTT Reverse: GATTTTATGTGGGTCGTGAGG	[1]
<i>IRF7</i>	Forward: CAGAGTCTTCTTCCAAGAGCTG Reverse: TGCTATCCAGGGAAGACACA	[1]
<i>IFN-α</i>	Forward: GCCTCGCCCTTTGCTTTACT Reverse: CTGTGGGTCTCAGGGAGATCA	[5]
<i>IFN-β</i>	Forward: ATGACCAACAAGTGTCTCCTCC Reverse: GCTCATGGAAAGAGCTGTAGTG	[5]
β -actin	Forward: AGAGCTACGAGCTGCCTGAC Reverse: AGCACTGTGTGGCGTACAG	[6]

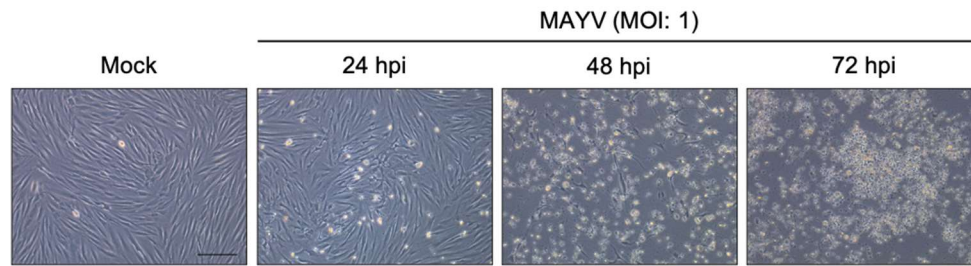


Figure S1. Mayaro virus induces a strong, time-dependent cytopathic effect in primary HDFs. HDFs were infected with MAYV at an MOI of 1. At indicated times after infection, images were captured using an inverted microscope and a MCI70-HD camera (Leica). Scale bar: 100 μ m.

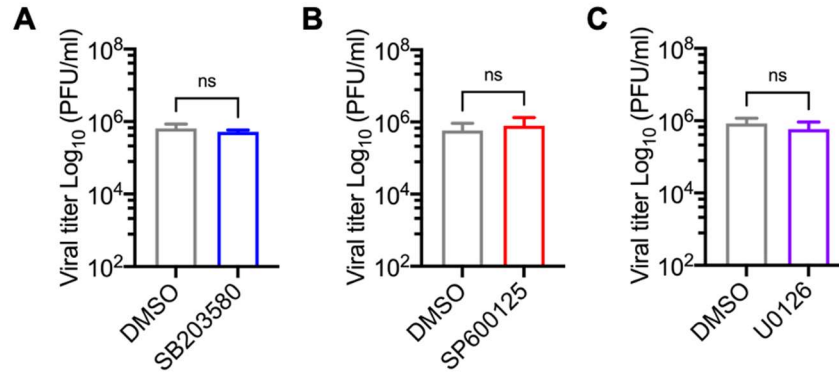


Figure S2. MAPK inhibitors SB203580, SP600125 and U0126 show no virucidal activity against MAYV. 1×10^6 PFU of MAYV in serum-free MEM were incubated with SB203580 (A), SP600125 (B) or U0126 (C) at 37 °C for 1 h. Then, the remaining virus for each experimental condition was directly quantified using plaque assay. Statistical differences were analyzed using the Mann-Whitney test: ns: non-significant.

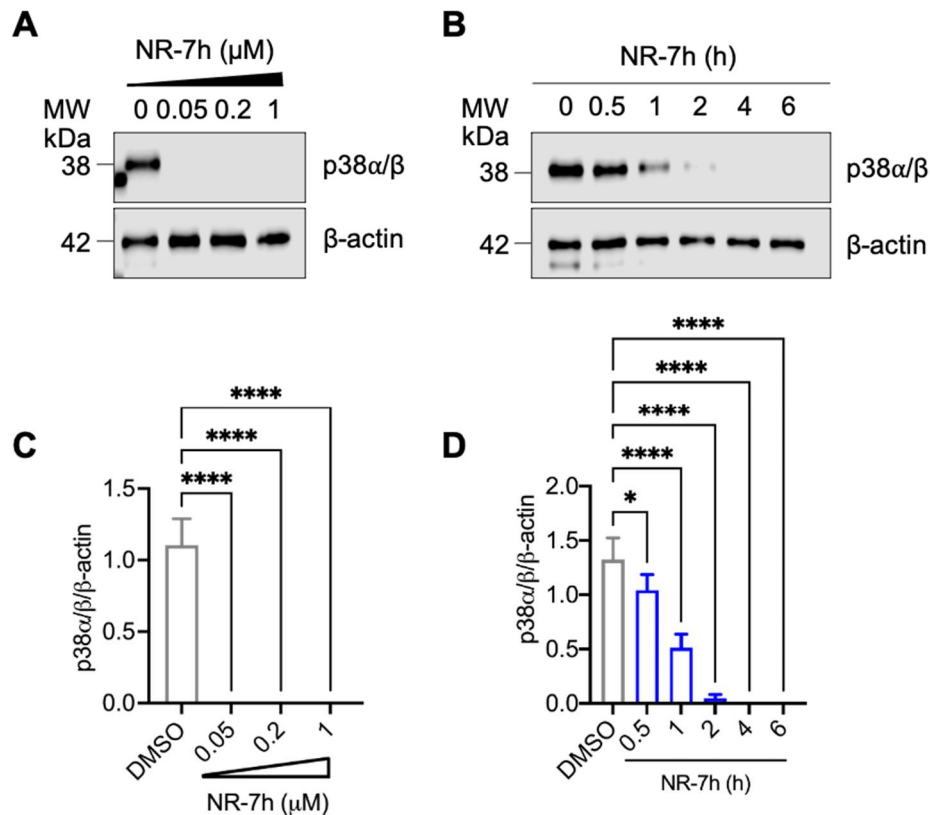


Figure S3. Knockdown of p38 α and p38 β isoforms using the PROTAC compound NR-7h in HDFs. (A) HDFs were treated with increasing concentrations of NR-7h; after 24 h of incubation, p38 α /p38 β protein levels were analyzed using immunoblot. β -actin protein was used as a loading control. MW: molecular weight. kDa: kilodaltons. (B) HDFs were treated with NR-7h at a concentration of 1 μM ; at different time points, p38 α /p38 β protein levels were evaluated as described above. (C, D) Densitometric analysis of p38 α /p38 β proteins was performed using ImageJ software and normalized with β -actin protein. Statistical differences were analyzed using the One-way ANOVA test followed by Dunnett's post-test: * $p < 0.05$ and **** $p < 0.0001$.

References

1. Hamel, R., et al., *Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells*. J Virol, 2015. **89**(17): p. 8880-96.
2. Bektas, N., et al., *The ubiquitin-like molecule interferon-stimulated gene 15 (ISG15) is a potential prognostic marker in human breast cancer*. Breast Cancer Res, 2008. **10**(4): p. R58.
3. Stevenson, N.J., et al., *Ribavirin enhances IFN-alpha signalling and MxA expression: a novel immune modulation mechanism during treatment of HCV*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27866.
4. da Conceicao, T.M., et al., *Essential role of RIG-I in the activation of endothelial cells by dengue virus*. Virology, 2013. **435**(2): p. 281-92.
5. Devhare, P.B., et al., *Analysis of antiviral response in human epithelial cells infected with hepatitis E virus*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63793.
6. Chen, F., et al., *High-efficiency generation of induced pluripotent mesenchymal stem cells from human dermal fibroblasts using recombinant proteins*. Stem Cell Res Ther, 2016. **7**(1): p. 99.

Article

Targeting Host PIM Protein Kinases Reduces Mayaro Virus Replication

Madelaine Sugasti-Salazar ^{1,2} , Dalkiria Campos ¹, Patricia Valdés-Torres ¹ , Paola Elaine Galán-Jurado ¹ and José González-Santamaría ^{1,*} 

¹ Grupo de Biología Celular y Molecular de Arbovirus, Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Panama City 0816-02593, Panama; msugasti@gorgas.gob.pa (M.S.-S.); dcampos@gorgas.gob.pa (D.C.); pavt2099@gmail.com (P.V.-T.); paola.elaine.jurado@gmail.com (P.E.G.-J.)

² Programa de Maestría en Microbiología Ambiental, Universidad de Panama, Panama City 3366, Panama

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

Abstract: Mayaro virus (MAYV) manipulates cell machinery to successfully replicate. Thus, identifying host proteins implicated in MAYV replication represents an opportunity to discover potential antiviral targets. PIM kinases are enzymes that regulate essential cell functions and also appear to be critical factors in the replication of certain viruses. In this study we explored the consequences of PIM kinase inhibition in the replication of MAYV and other arboviruses. Cytopathic effects or viral titers in samples from MAYV-, Chikungunya-, Una- or Zika-infected cells treated with PIM kinase inhibitors were evaluated using an inverted microscope or plaque-forming assays. The expression of viral proteins E1 and nsP1 in MAYV-infected cells was assessed using an immunofluorescence confocal microscope or Western blot. Our results revealed that PIM kinase inhibition partially prevented MAYV-induced cell damage and also promoted a decrease in viral titers for MAYV, UNAV and ZIKV. The inhibitory effect of PIM kinase blocking was observed for each of the MAYV strains tested and also occurred as late as 8 h post infection (hpi). Finally, PIM kinase inhibition suppressed the expression of MAYV E1 and nsP1 proteins. Taken together, these findings suggest that PIM kinases could represent an antiviral target for MAYV and other arboviruses.

Keywords: Mayaro; Una; Zika; host factors; PIM kinases; inhibition; antiviral effect



Citation: Sugasti-Salazar, M.; Campos, D.; Valdés-Torres, P.; Galán-Jurado, P.E.; González-Santamaría, J. Targeting Host PIM Protein Kinases Reduces Mayaro Virus Replication. *Viruses* **2022**, *14*, 422. <https://doi.org/10.3390/v14020422>

Academic Editor: Richard J. Kuhn

Received: 9 January 2022

Accepted: 14 February 2022

Published: 18 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Mayaro virus (MAYV) is an emerging arbovirus within the Alphavirus genus that belongs to the Togaviridae family [1]. MAYV, along with other alphaviruses, such as Chikungunya (CHIKV) and Una (UNAV), has been grouped within the Semliki Forest complex, based on its antigenic characteristics [2]. These pathogens mainly cause arthritogenic disease with symptoms including fever, myalgia, retro-orbital pain, joint pain, rash, diarrhea, leucopenia and in some cases, severe polyarthralgia that can last from months to years [3,4].

Several reports indicate that MAYV is actively circulating in different countries of Central and South America, including Panama, Colombia, Peru, Venezuela, Haiti, French Guiana, Argentina, Ecuador, Bolivia and Brazil [5,6]. Although, the transmission of this virus occurs largely through the bites of the sylvatic mosquitoes *Haemagogus janthinomys*, growing evidence suggests that other species of urban vectors, such as *Aedes aegypti* or *Aedes albopictus*, have the potential to spread MAYV, increasing the risk for future epidemics [7–9]. Despite this, no protective vaccines or antiviral compounds have been approved to combat MAYV infection. As a result, the search for possible treatments, including antiviral molecules with broad-spectrum activity, remains crucial.

MAYV needs to manipulate a variety of cellular processes to effectively replicate. Therefore, searching for the key host factors implicated in viral replication is an effective strategy for identifying probable antiviral targets [10,11]. Cellular kinases are vital enzymes

that regulate an array of important cell activities and also play a crucial role in the replication of diverse families of viruses [12–14]. Moreover, it has been suggested that these proteins represent a potential pharmacological target to combat viral infection [14,15]. In line with this, our group recently showed that the inhibition or knockdown of p38 mitogen-activated protein kinase inhibits MAYV replication at least in part through downmodulation of the structural E1 viral protein [16].

The Proviral Integration sites for Moloney murine leukemia virus (PIM) protein family consists of serine/threonine kinases with constitutive activity and includes three members: PIM1, PIM2 and PIM3 [17]. PIM kinases regulate proliferation, survival, metabolism and migration in different cell lines through the phosphorylation of multiple substrates; their upregulation has been observed mainly in hematological malignancies as well as solid tumors, including prostate, pancreatic and colon tumors [17–20]. Furthermore, aberrant overexpression of PIM kinase members has been associated with poor prognosis in cancer patients [21]. Thus, these enzymes have become an attractive target for oncological drug development programs in the pharmaceutical industry, and some of these compounds have been evaluated in Phase I clinical trials [22–25]. Various lines of evidence suggest that PIM kinases could be a pro-viral factor for viruses of distinct families and may act through several mechanisms. For instance, in primary B-cells infected with Epstein-Barr virus (EBV), an increase in the *Pim-1* and *Pim-2* gene levels was observed and these oncogenic kinases enhanced the transcriptional activity of EBV EDNA2 protein, probably contributing to B-cell immortalization [26]. In another study, Park and colleagues revealed that PIM1 kinase interacted with non-structural 5A protein from hepatitis C virus (HCV), and this interaction promoted PIM1 protein stability [27]. Moreover, inhibition of all PIM kinase isoforms or knockdown of these enzymes reduced HCV replication in a dose-dependent manner [27]. In addition, inhibition of PIM1 in primary bronchial epithelial cells decreased human rhinovirus 16 (HRV-16) replication, which suggests that PIM1 kinase is relevant to the replication of this pathogen [28]. More recently, using zebrafish as an *in vivo* infection model, Pereiro and collaborators found that treating with pan-PIM kinase inhibitors SGI-1776, INCB053914 and AZD1208 blocked the replication of spring viraemia of carp virus (SVCV) [29]. Together, these previous observations indicate that PIM kinases may be important factors implicated in viral replication and could serve as potential antiviral targets. However, whether PIM kinases play a key role in MAYV replication has not yet been investigated. In this study, we analyzed the impact of PIM kinase inhibition on the replication of MAYV and other emerging arboviruses.

2. Materials and Methods

2.1. Cells Lines, Virus Strains and Reagents

Primary human dermal fibroblasts (HDFs) from adults (PCS-201-012), Vero-E6 (CRL-1586), Vero (CCL-81) (all obtained from ATCC, Manassas, VA, USA) and HeLa cells (kindly provided by Dr. Carmen Rivas, CIMUS, Santiago de Compostela, Spain) were grown in Minimal Essential Medium (MEM) or Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM of L-Glutamine and 1% penicillin-streptomycin antibiotic solution (all reagents were obtained from Gibco, Waltham, MA, USA). All cell lines were incubated at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere. The virus strains used in this study were as follows: Mayaro (MAYV AVR0565, Peru; MAYV TRVL 4675, Trinidad and Tobago; MAYV Guyane, French Guiana) [30]; Una (UNAV, BT-1495-3, Bocas del Toro, Panama) [31] (all previous strains were acquired from the World Reference Center for Emerging Viruses and Arboviruses (WRCEVA) at the University of Texas Medical Branch (UTMB), Galveston, TX, USA); Chikungunya (CHIKV, Panama_256137) [32]; and Zika (ZIKV, 259249). These strains were isolated from patient sera during CHIKV and ZIKV outbreaks in Panama in 2014 and 2015, respectively. All virus strains were propagated, titrated and stored as previously described [11]. The PIM kinase small inhibitory molecules tested were PIM1 inhibitor 2 (PIM1 Inh 2), which blocks the activity of the PIM1 isoform [33], and pan-PIM kinase inhibitor AZD1208, which inhibits all isoforms of the PIM kinase

family (PIM1-3) [34]. Both compounds were obtained from Tocris (Minneapolis, MN, USA), dissolved in Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) at 10 mM concentration and stored at -20°C until use. Working solutions of each compound were prepared in MEM or DMEM at the indicated concentrations.

2.2. Cell Viability Analysis

Confluent HeLa cells, HDFs or Vero cells grown in 96-well plates were treated with PIM1 Inh 2 or AZD1208 at concentrations of 1, 5 and 10 μM or DMSO (0.1%), which was used as a control. Cells were incubated for 24 or 48 h, and then, 5 mg/mL of 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) solution in PBS was added to the cells and incubated for an additional 4 h. Formazan crystals were dissolved in a solution of 4 mM HCl and 10% Triton X-100 in isopropanol, and absorbance was measured at 570 nm using a microplate spectrophotometer (Bio Tek, Winooski, VT, USA). Results are shown as the percentage of viable cells relative to the DMSO-treated control cells [16].

2.3. Evaluation of PIM Kinase Inhibitors' Antiviral Effects

HeLa cells, HDFs or Vero cells grown in 12-well plates were pre-treated with PIM1 Inh 2 (5 or 10 μM), AZD1208 (5 or 10 μM) or DMSO (0.1%) for 2 h. After this, the compounds were removed and the cells were infected with MAYV, CHIKV, UNAV or ZIKV at an MOI of 1 or 10. After 1 h of virus adsorption, PIM inhibitors or DMSO in fresh medium were added to the cells and incubated for an additional 24 or 48 h. Then, cell supernatants were collected to quantify viral particle production using a plaque assay or the cytopathic effects were evaluated using an inverted microscope and an MCI70-HD camera (Leica, Buffalo Grove, IL, USA). For the virucidal assay, 10^7 plaque-forming units (PFU) of MAYV were incubated with 10 μM of PIM kinase inhibitors at 37°C for 2 h. Next, any remaining virus were directly enumerated using plaque-forming assay.

2.4. Viral Plaque-Forming Assay

Viral titers in cell supernatants were assessed using a plaque-forming assay as performed previously [11]. Briefly, 10-fold serial dilutions of infected samples were used to infect Vero-E6 (MAYV and UNAV) or Vero (CHIKV and ZIKV) cells grown in 6-well plates and incubated for 1 h at 37°C . Then, the infected samples were removed and the cells were overlaid with a solution of 1% agar in MEM supplemented with 2% FBS and incubated for 3 days at 37°C . After that, the agar was removed and the cells were fixed with 4% formaldehyde solution in PBS and stained with 2% crystal violet dissolved in 30% methanol solution. Lastly, the number of plaques was counted, and the viral titers were reported as plaque-forming units per milliliter (PFU/mL).

2.5. Time of Addition Experiment

HeLa cells were infected with MAYV at an MOI of 10; after 1 h of virus adsorption (time 0 h post infection (hpi)), we added PIM kinase inhibitors or DMSO at 0, 2, 4 or 8 hpi. Then, we collected cell supernatants at 24 hpi and quantified the viral progeny production using a plaque-forming assay.

2.6. Immunofluorescence Assay

HDFs and HeLa cells grown on glass coverslips in 24-well plates were pre-treated with PIM kinase inhibitors or DMSO as previously indicated. Next, the cells were infected with MAYV at an MOI of 1 (HDFs) or 10 (HeLa cells) for 1 h. After that, we removed the inoculum and added PIM kinase inhibitors or DMSO in fresh medium and the cells were incubated at 37°C for an additional 24 h. Then, the cells were fixed, permeabilized and blocked as previously reported [16]. Next, the cells were stained overnight at 4°C with E1 or nsP1 primary rabbit antibodies (both antibodies previously validated in our laboratory) [11] followed by Alexa Fluor 568 goat antirabbit secondary antibody (Invitrogen,

Carlsbad, CA, USA). Finally, coverslips were mounted on slides with Prolong Diamond Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and images were captured with an FV1000 Fluoview confocal microscope (Olympus, Lombard, IL, USA). The images were analyzed with ImageJ software.

2.7. Protein Analysis

Protein expression was assessed using Western blot as previously reported [16]. Briefly, protein extracts were obtained from mock- or MAYV-infected HeLa cells or HDFs that were treated or untreated with PIM kinase inhibitors in Laemmli buffer with 10% Dithiothreitol (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Proteins were separated in SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blocked with a solution of 5% non-fat milk in T-TBS buffer for 30 min. Next, membranes were incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: rabbit polyclonal anti-E1; rabbit polyclonal anti-nsP1 (both validated in our laboratory) [11]; and mouse monoclonal anti-GAPDH (Cat. # VMA00046, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Then, the membranes were washed three times in T-TBS buffer and incubated with HRP-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Cat. # 926-80011, LI-COR, Lincoln, NE, USA) at room temperature for 1 h. Lastly, the membranes were incubated with SignalFire™ ECL Reagent (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) for 5 min and the chemiluminescent signal was detected with a C-Digit scanner (LI-COR, Lincoln, NE, USA).

2.8. Data Analysis

All data were analyzed with the Mann–Whitney test or one-way ANOVA followed by Dunnett’s post hoc test. Data analysis and graphics were completed with GraphPad Prism software version 9.3.0 for Mac. All experiments were performed at least three times with three replicates. For each experiment, the mean and standard deviation are shown.

3. Results

3.1. PIM1 Inhibitor 2 and AZD1208 Partially Prevent MAYV-Induced Cytopathic Effects and Reduce Viral Progeny Production in HeLa Cells and Human Dermal Fibroblasts (HDFs)

To assess the effect of PIM kinase inhibitors on MAYV replication, we first analyzed the viability of HeLa cells or HDFs treated with increasing concentrations of the PIM1 inhibitor 2 (PIM1 Inh 2) or AZD1208 using the MTT method. PIM1 Inh 2 blocks the activity of the PIM1 isoform, whereas AZD1208 inhibits all isoforms of the PIM kinase family (PIM1-3). We found that, for both compounds, cell viability was higher than 85% after 24 or 48 h of treatment, indicating that the tested doses of the inhibitors and the incubation time were well-tolerated in these cell lines (Figure 1A–D). Previous reports have demonstrated that MAYV, similar to other alphaviruses, induces strong cytopathic effects in different cells lines, including Vero cells and HDFs [10,16]. Thus, we decided to examine whether PIM kinase inhibitors were able to protect HeLa cells or HDFs from MAYV-induced damage. To test this hypothesis, we pretreated both cell lines for 2 h with DMSO or PIM kinase inhibitors and then we removed the compounds and infected the cells with MAYV. As shown in Figure S1, we observed strong cytopathic effects at 48 hpi in MAYV-infected HDFs. In contrast, we noted a partial but substantial protection from these effects (Figure S1, lower panels) in infected-HDFs treated with the PIM kinase inhibitors PIM1 Inh 2 or AZD1208. In the case of HeLa cells, the cytopathic effects at 48 hpi were less pronounced. However, we observed some protection in these cells when treated with the PIM kinase inhibitors (Figure S1, upper panels).

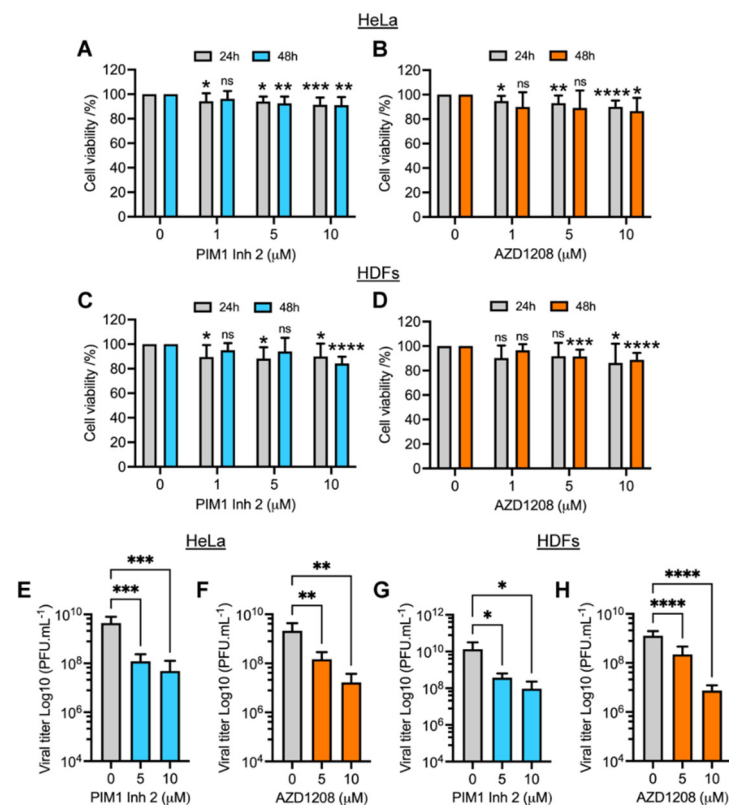


Figure 1. PIM kinase inhibitors PIM1 Inh 2 and AZD1208 reduce MAYV replication in a dose-dependent manner. HeLa cells (A,B) or HDFs (C,D) were treated with the indicated concentration of PIM kinase inhibitors and incubated for 24 or 48 h at 37 °C. Next, cell viability was assessed using the MTT method. HeLa cells or HDFs were pretreated with PIM1 Inh 2 (E,G) or AZD1208 (F,H) at 5 or 10 μM concentration for 2 h. DMSO was used as a control. Then, the compounds were removed and the cells were infected with MAYV strain AVR0565 at an MOI of 1 (HDFs) or 10 (HeLa cells). After 1 h of virus adsorption, the virus was removed and the cells were treated with PIM kinase inhibitors or DMSO in fresh medium and incubated for an additional 24 h. Finally, viral progeny production in cell supernatants was evaluated using a plaque-forming assay. Viral titers are presented as plaque-forming units per milliliter (PFU/mL). All data were analyzed with the one-way ANOVA test followed by Dunnett's post hoc test. In the case of cell viability data, this analysis was performed for each drug incubation time. Statistically significant differences are denoted as follows: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns: non-significant.

In order to evaluate the impact of PIM kinase inhibitors on MAYV progeny production, we performed a similar experiment in which HeLa cells or HDFs were pretreated with increasing doses of PIM1 Inh 2 or AZD1208 or DMSO for 2 h. We then removed the compounds and infected both cell lines with MAYV. After 1 h of virus adsorption, we added fresh medium with the PIM kinase inhibitors or DMSO; following 24 h of incubation, viral particle yields in cell supernatants were quantified using a plaque assay. This experiment showed that the PIM kinase inhibitors promoted a significant dose-dependent reduction in MAYV titers in both cell lines tested (Figure 1E–H). A nearly 2 log decrease in viral titers was observed at the maximum tested dose of the compounds (10 μM) (Figure 1E–H). Interestingly, PIM1 Inh 2 stimulated a decrease in MAYV titers similar to that observed with AZD1208, suggesting that PIM1 isoform inhibition was sufficient to block MAYV replication (Figure 1E,G). To verify whether the observed effects of PIM kinase inhibitors were due to direct action on MAYV particles, we carried out a virucidal assay in which 10⁷ PFU of MAYV were incubated with PIM kinase inhibitors or DMSO for 2 h at 37 °C. Then, we quantified the virus directly using a plaque assay. Our results indicated that the PIM kinase inhibitors did not have a direct virucidal effect on MAYV (Figure S2). The

results of this series of experiments suggest that PIM1 Inh 2 and AZD1208 decrease MAYV replication in a dose-dependent manner.

3.2. PIM Kinase Inhibitors Reduce Viral Replication in Multiple MAYV Strains

The preceding experiments were performed using MAYV strain AVR0565 isolated in San Martin, Peru (1995) [30]. To confirm the inhibitory activity of the PIM kinase inhibitors in other MAYV strains, we investigated the effects of these compounds on the replication of the TRVL 4675 strain (Mayaro county, Trinidad and Tobago, 1954) and the Guyane strain (French Guiana, 1996) [30]. Consequently, HeLa cells or HDFs were pre-treated with PIM kinase inhibitors or DMSO and infected as previously described. After 24 h of incubation, viral titers in cell supernatants were quantified using a plaque-forming assay. These analyses revealed that both PIM1 Inh 2 and AZD1208 significantly reduced MAYV viral titers when compared to DMSO-treated cells for both viral strains and both cell lines tested (Figure 2A–H). These results illustrate that PIM kinase inhibitors reduce MAYV replication regardless of the strain being tested.

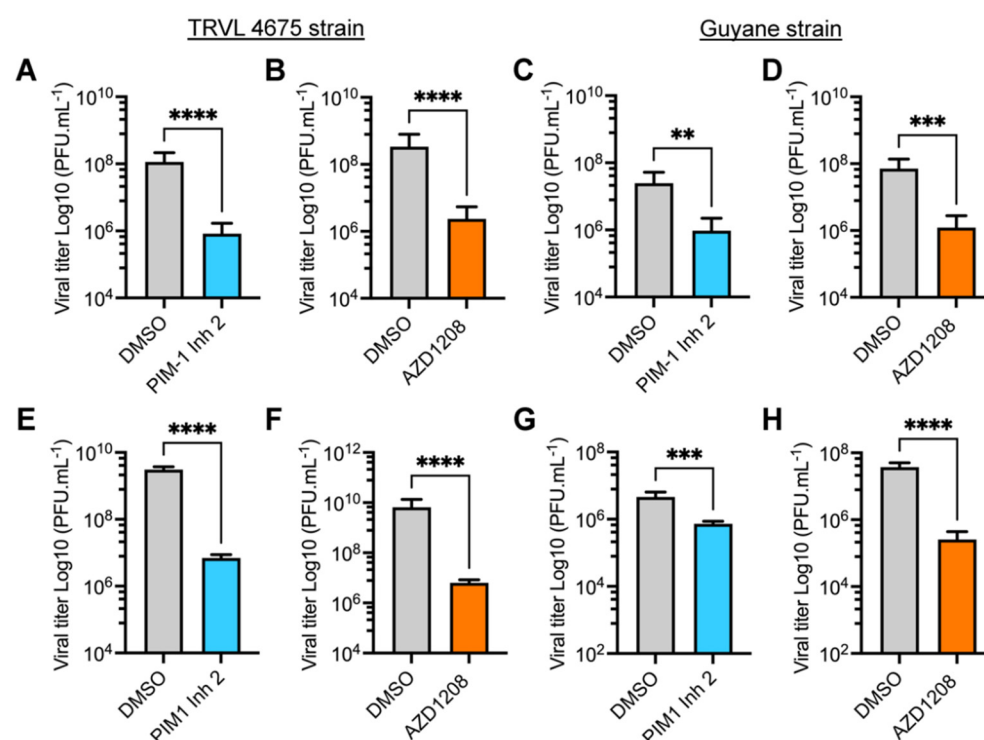


Figure 2. The antiviral effect of PIM kinase inhibitors is independent of the MAYV strain evaluated. (A–D) HeLa cells or HDFs (E–H) were pre-treated with PIM kinase inhibitors or DMSO as previously described. Then, the cells were infected with the TRVL 4675 or Guyane MAYV strains and treated with the compounds for 24 h. Next, viral titers in cells supernatants were assessed using a plaque-forming assay. Viral titers are presented as plaque-forming units per milliliter (PFU/mL). Data were analyzed with the Mann–Whitney test. Statistically significant differences are denoted as follows: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

3.3. PIM Kinase Inhibitors Reduce MAYV Replication at Late Stages after Viral Adsorption

Since all of the abovementioned infection experiments were carried out by pretreating cell lines with the PIM kinase inhibitors, we designed an additional procedure to determine if the antiviral effect of these compounds is maintained after virus adsorption. We performed a time addition experiment in which each inhibitor was added to HeLa cells at the indicated times after viral adsorption. The cells were then incubated for 24 h (Figure 3A), and the viral titers in the cell supernatants were measured as previously indicated. As shown in Figure 3, both PIM1 Inh 2 and AZD1208 decreased viral progeny production

in HeLa cells when added as late as 8 h after virus adsorption, which indicates that PIM kinase inhibition impairs a key post-entry step in the MAYV life cycle (Figure 3A–C).

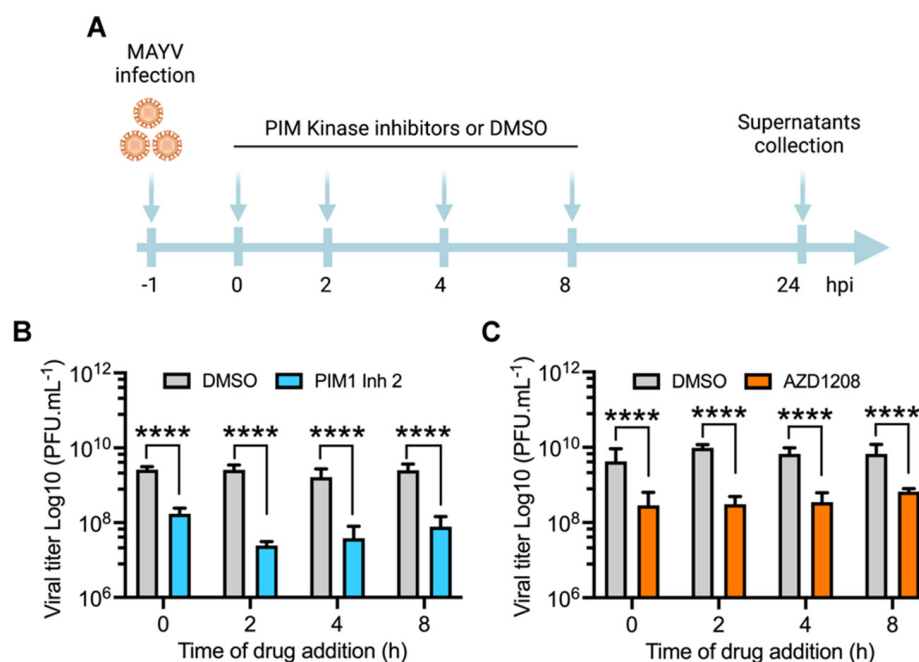


Figure 3. PIM kinase inhibition also affects MAYV replication at a late stage after viral adsorption. (A) Diagram showing the design of the time of addition experiment in HeLa cells treated with PIM1 Inh 2 or AZD1208. This panel was created using Biorender.com (accessed on 8 January 2022). (B,C) HeLa cells were infected with MAYV AVR0565 strain at an MOI of 10. After 1 h of virus adsorption, the cells were treated with PIM kinase inhibitors or DMSO at the indicated times and then incubated at 37 °C for 24 h. Next, viral titers in cells supernatants were quantified using a plaque-forming assay. Viral titers are presented as plaque-forming units per milliliter (PFU/mL). Data were analyzed with the Mann–Whitney test. Statistically significant differences are denoted as follows: **** $p < 0.0001$.

3.4. PIM Kinase Inhibitors Downmodulate the Expression of MAYV Structural Protein E1 and Non-Structural Protein 1 (nsP1)

Our previous results suggested that PIM kinase inhibitors affect a crucial post-entry step in the MAYV replication cycle. Thus, we investigated the effect of these compounds on the expression of the viral proteins E1 and nsP1. First, we used an immunofluorescence confocal microscope to evaluate the presence of these viral proteins in HeLa cells or HDFs that were untreated or treated with the PIM kinase inhibitors or a control and incubated for 24 h upon viral infection. These analyses indicated that the PIM kinase inhibitor treatment resulted in an important decrease in both viral proteins in both HeLa cells and HDFs when compared to DMSO-treated cells. (Figure 4A,B). To further characterize the previous findings, we performed an infection kinetics experiment and evaluated the levels of viral proteins at different time intervals using Western blot. In these experiments, we detected a clear decline in the levels of both viral proteins in both cell lines treated with PIM kinase inhibitors (Figure 4C–F). These results indicate that the PIM kinase inhibitors considerably suppress the expression of E1 and nsP1 viral proteins.

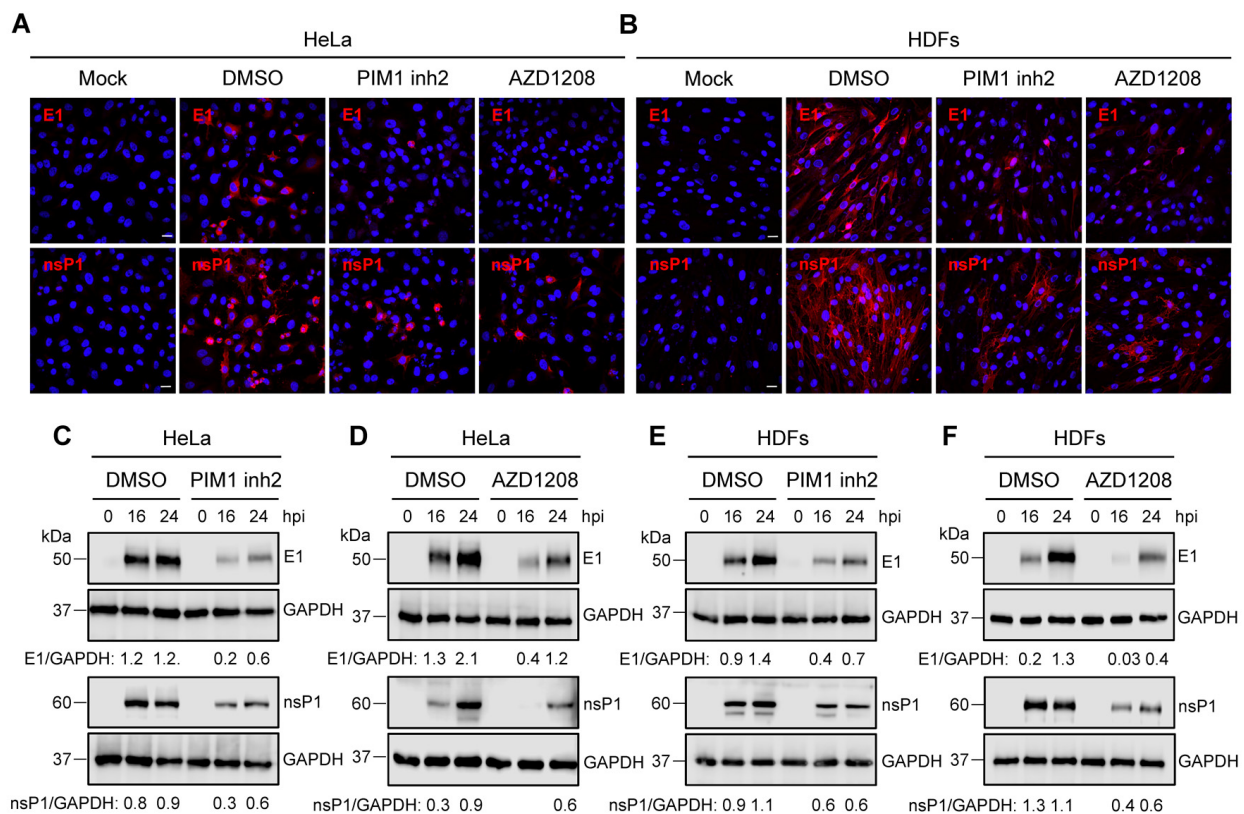


Figure 4. PIM kinase inhibitors reduce the expression of MAYV E1 and nsP1 proteins. HeLa cells (A) or HDFs (B) were pre-treated with PIM kinase inhibitors or DMSO as previously described. Then, the cells were infected with MAYV AVR0565 strain and after 24 h of infection, the cells positive for E1 and nsP1 proteins were analyzed using an immunofluorescence assay. Scale bar: 20 μ m. An infection kinetics experiment was performed with HeLa cells (C,D) and HDFs (E,F) that were treated with PIM kinase inhibitors or DMSO to evaluate the levels of MAYV E1 and nsP1 proteins using Western blot. GAPDH protein was used as a loading control. kDa: kilodaltons. Densitometric analysis for E1 and nsP1 proteins was performed using ImageJ software and normalized with GAPDH protein.

3.5. PIM Kinase Inhibitors Reduce Viral Replication of Una (UNAV) and Zika (ZIKV) Viruses

Studies evaluating PIM kinase inhibition as an antiviral strategy are limited. However, it has been reported that inhibiting the PIM kinase family affects the replication of HRV-16, HCV and SVCV [27–29]. To explore whether the PIM kinase inhibitors are able to affect the replication of other emerging or re-emerging arboviruses, we tested the effect of these compounds on the alphaviruses Chikungunya (CHIKV) and Una (UNAV) and the Flavivirus Zika (ZIKV). We pretreated Vero cells with PIM1 Inh2, AZD1208 or DMSO and then infected the cells with CHIKV, UNAV or ZIKV; after 24 h of incubation, viral titers in cells' supernatants were evaluated using a plaque assay. As shown in Figure 5, both compounds reduced UNAV and ZIKV replication, whereas with CHIKV, the PIM kinase inhibitors did not display any effect (Figure 5A–F). The observed antiviral effect of the PIM kinase inhibitors on UNAV or ZIKV did not appear to be associated with cell toxicity (Figure 5G). These findings reveal that PIM kinase inhibitors also exhibit blocking activity against UNAV and ZIKV, suggesting that these kinases could represent a potentially broad host antiviral target.

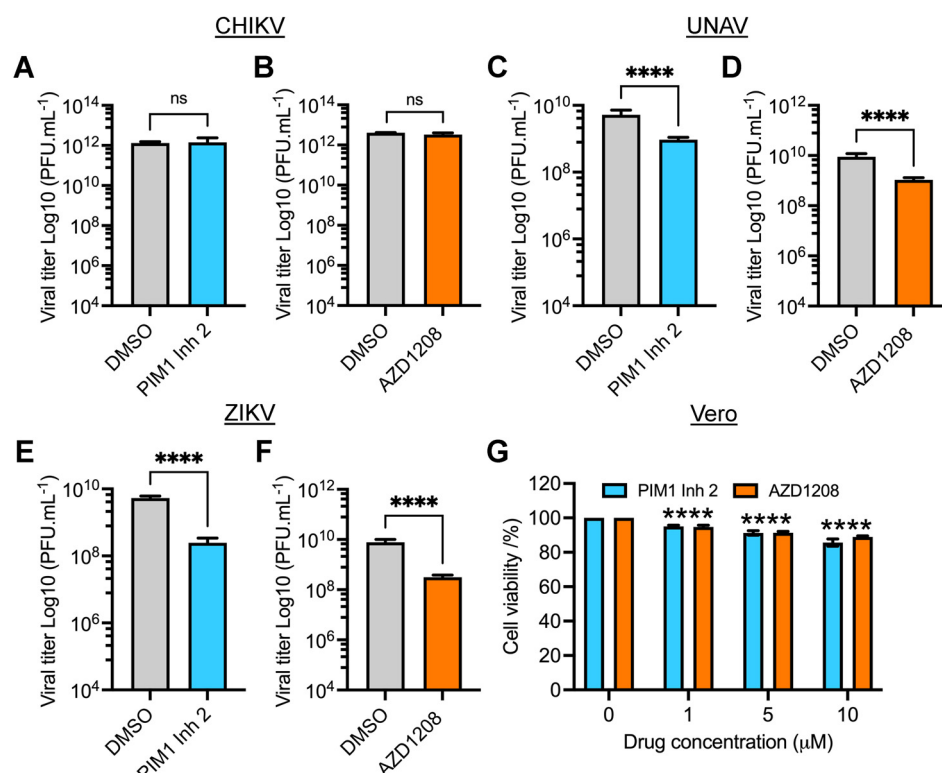


Figure 5. PIM kinase inhibitors block the replication of emerging arboviruses UNAV and ZIKV. Vero cells were pretreated with PIM kinase inhibitors or DMSO for 2 h. Then, the compounds were removed and the cells were infected with CHIKV (A,B), UNAV (C,D) or ZIKV (E,F) at an MOI of 1. After 1 h of virus adsorption, the virus was removed and the cells were treated with PIM kinase inhibitors or DMSO in fresh medium; the cells were then incubated for an additional 24 h. Next, viral titers were quantified as described previously. Viral titers are presented as plaque-forming units per milliliter (PFU/mL). (G) Vero cells were treated with the indicated concentrations of PIM1 Inh 2 or AZD1208 for 48 h. DMSO was used as a control. Cell viability was determined using the MTT method as previously performed. Data were analyzed with the Mann–Whitney test or one-way ANOVA test followed by Dunnett’s post hoc test. Statistically significant differences are denoted as follows: **** $p < 0.0001$; ns: non-significant.

4. Discussion

MAYV is a neglected arbovirus with increasing circulation in Central and South American countries [5]. Evidence suggests that urban mosquitoes, such as *Aedes aegypti* or *Aedes albopictus*, have the capacity to transmit this virus [8,9]. As a result, regional health authorities have rising concerns regarding MAYV’s potential to provoke a large-scale epidemic as seen before with CHIKV and ZIKV [35]. Despite this potential, there are no FDA-approved antivirals or vaccines to combat this pathogen.

The identification of host proteins or cellular pathways implicated in MAYV replication represents an opportunity to discover potential antiviral targets [10,11,16]. In this regard, kinases are enzymes that regulate vital cell functions and also appear to play a crucial role in virus replication [12,13]. Furthermore, inhibition of these proteins has been suggested as a therapeutic strategy to fight viral infection [14,15]. Recently, our group found that the inhibition or knockdown of mitogen-activated protein kinase p38 decreased MAYV replication in a dose-dependent manner, suggesting that MAYV is able to exploit kinase activity to favor viral replication [16].

PIM kinases control important cell activities including proliferation, survival, metabolism and migration [17]. Moreover, these kinases are implicated in different pathologic conditions, such as hematological malignancies and solid tumors, and their upregulation has been associated with a poor prognosis in patients [21,23]. Due to these characteristics, PIM kinases

have become an attractive target for cancer treatments [22,23]. However, a limited number of studies have analyzed these protein kinases as antiviral targets [27–29,36]. For this reason, we decided to evaluate the impact of PIM kinase inhibition on the replication of MAYV and other arboviruses. Our results indicate that treating HeLa cells or HDFs with PIM1 Inh 2, which blocks the activity of the PIM1 isoform, or AZD1208, a pan-PIM kinase inhibitor that inhibits all isoforms (PIM1–3), promoted partial but significant protection from MAYV-induced cytopathic effects. Furthermore, we observed a significant dose-dependent reduction in MAYV progeny production in both cell lines treated with PIM kinase inhibitors when compared to DMSO-treated cells. Interestingly, inhibition of the PIM1 isoform was enough to promote a decrease in MAYV titers, suggesting that this isoform is relevant for MAYV replication. Moreover, the PIM kinase inhibitors' effects did not seem to be associated with a direct virucidal effect on MAYV particles. To further demonstrate the significance of PIM kinase inhibition on MAYV replication, we analyzed the effect of these compounds on two additional MAYV strains, TRVL 4675 and Guyane. In these experiments, we found a clear dose-dependent decrease in MAYV replication regardless of the virus strain tested. Taken together, these findings suggest that PIM kinases may be relevant factors in MAYV replication. Our results are in agreement with previous reports, which indicate that PIM kinases inhibition can impair virus replication [27,28].

In order to explore whether the anti-MAYV activity of the PIM kinase inhibitors remains after viral adsorption, we performed a time of addition experiment. These analyses revealed that both inhibitors were able to reduce MAYV replication as late as 8 h after viral adsorption in HeLa cells, indicating that PIM kinase inhibition impacts a key post-entry step in the MAYV life cycle. Accordingly, we evaluated the effect of PIM kinase inhibitors on the expression of E1 and nsP1 viral proteins using immunofluorescence and Western blot assays. The results of the confocal microscopy analysis indicate that treatment with the PIM kinase inhibitors provoked an important reduction in the number of cells with MAYV E1 and nsP1 proteins in both cell lines tested. Likewise, an infection kinetics experiment demonstrated that the levels of both viral proteins were reduced in the cells treated with these compounds, suggesting that PIM kinase inhibitors block the expression of MAYV proteins. Similar results were observed in Huh7.5 cells pretreated with the pan-PIM kinase inhibitor SGI-1776, which promoted a dose-dependent reduction of NS5A, NS3 and Core proteins from HCV [27].

Having demonstrated that PIM kinase inhibitors reduce MAYV replication, we decided to assess whether these compounds were able to disturb the replication of other emerging or reemerging arboviruses. Vero cells pretreated with PIM kinase inhibitors or DMSO were infected with CHIKV, UNAV or ZIKV, and after 24 h of incubation, viral titers were determined as previously described. These experiments show that PIM kinase inhibitors also affected UNAV and ZIKV replication, indicating that PIM kinases are potential broad antiviral targets. Recently, Zhou and colleagues demonstrated that ZIKV infection induces a time-dependent increase in PIM1 mRNA and protein and knockdown or inhibition of PIM1 isoform reduces ZIKV replication, providing further evidence that PIM kinases could be relevant factors in viral replication [36]. Moreover, these authors identified PIM1 as a negative regulator of the type I interferon pathway; inhibition of the PIM1 isoform promoted an upregulation of interferon-stimulated genes, including PML, OASL and TRIM5, and blocked ZIKV replication. Although we did not analyze the activation of the interferon pathway after PIM kinase inhibition in our cell infection models, this is a plausible mechanism that could explain the observed inhibitory effect of these compounds on MAYV and UNAV alphaviruses.

While the PIM kinase inhibitors used in the present study have not yet been approved for human use, AZD1208 has shown efficacy in preclinical models of acute myeloid leukemia [37]. Nevertheless, the use of PIM kinase inhibitors for the treatment of viral infections requires additional analyses in animal infection models in order to demonstrate the efficacy and safety of these drugs as antivirals. In conclusion, this study supports, for

the first time, that PIM kinases could represent an antiviral target for MAYV and other arboviruses.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v14020422/s1>, Figure S1: PIM kinase inhibitors partially prevent MAYV-induced cytopathic effects. Figure S2: PIM kinase inhibitors have no virucidal effect on MAYV.

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

Funding: This research was funded by Ministerio de Economía y Finanzas de Panamá (MEF), grant number 19911.012 (J.G.-S.) and Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT), Programa Nuevos Investigadores, grant number 36-2020 (M.S.-S.). M.S.-S. was supported by a Master of Science fellowship from SENACYT and Universidad de Panamá, grant number 68-2017. J.G.-S. was partially supported by Sistema Nacional de Investigación (SNI) from SENACYT, grant number 23-2021.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank Scott Weaver (WRCEVA, UTMB, USA) for providing virus strains of MAYV and UNAV; Carmen Rivas for providing the Hela cells; and Nicanor Obaldía and Rodolfo Contreras for their support with laboratory facilities. Lastly, we thank Jorge Ceballos and the Smithsonian Tropical Research Institute for their help and access to the confocal microscope.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; the collection, analyses, or interpretation of data; the writing of the manuscript, or the decision to publish the results.

References

1. Acosta-Ampudia, Y.; Monsalve, D.M.; Rodriguez, Y.; Pacheco, Y.; Anaya, J.M.; Ramirez-Santana, C. Mayaro: An emerging viral threat? *Emerg. Microbes Infect.* **2018**, *7*, 163. [CrossRef] [PubMed]
2. Figueiredo, M.L.; Figueiredo, L.T. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2014**, *47*, 677–683. [CrossRef] [PubMed]
3. Levi, L.I.; Vignuzzi, M. Arthritogenic Alphaviruses: A Worldwide Emerging Threat? *Microorganisms* **2019**, *7*, 133. [CrossRef] [PubMed]
4. Zaid, A.; Burt, F.J.; Liu, X.; Poo, Y.S.; Zandi, K.; Suhrbier, A.; Weaver, S.C.; Texeira, M.M.; Mahalingam, S. Arthritogenic alphaviruses: Epidemiological and clinical perspective on emerging arboviruses. *Lancet Infect. Dis.* **2021**, *21*, e123–e133. [CrossRef]
5. Ganjian, N.; Riviere-Cinamon, A. Mayaro virus in Latin America and the Caribbean. *Rev. Panam. Salud Publica* **2020**, *44*, e14. [CrossRef] [PubMed]
6. Pezzi, L.; Rodriguez-Morales, A.J.; Reusken, C.B.; Ribeiro, G.S.; LaBeaud, A.D.; Lourenco-de-Oliveira, R.; Brasil, P.; Lecuit, M.; Failloux, A.B.; Gallian, P.; 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. [CrossRef]
7. Diagne, C.T.; Bengue, M.; Choumet, V.; Hamel, R.; Pompon, J.; Misse, D. Mayaro Virus Pathogenesis and Transmission Mechanisms. *Pathogens* **2020**, *9*, 738. [CrossRef] [PubMed]
8. Dieme, C.; Ciota, A.T.; Kramer, L.D. Transmission potential of Mayaro virus by *Aedes albopictus*, and *Anopheles quadrimaculatus* from the USA. *Parasit. Vect.* **2020**, *13*, 613. [CrossRef] [PubMed]
9. Pereira, T.N.; Carvalho, F.D.; De Mendonca, S.F.; Rocha, M.N.; Moreira, L.A. Vector competence of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes for Mayaro virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2020**, *14*, e0007518. [CrossRef] [PubMed]
10. Barroso, M.M.; Lima, C.S.; Silva-Neto, M.A.; Da Poian, A.T. Mayaro virus infection cycle relies on casein kinase 2 activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *296*, 1334–1339. [CrossRef]

11. Llamas-Gonzalez, Y.Y.; Campos, D.; Pascale, J.M.; Arbiza, J.; Gonzalez-Santamaria, J. A Functional Ubiquitin-Proteasome System is Required for Efficient Replication of New World Mayaro and Una Alphaviruses. *Viruses* **2019**, *11*, 370. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Rauch, J.; Volinsky, N.; Romano, D.; Kolch, W. The secret life of kinases: Functions beyond catalysis. *Cell Commun. Sign.* **2011**, *9*, 23. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Beziau, A.; Brand, D.; Piver, E. The Role of Phosphatidylinositol Phosphate Kinases during Viral Infection. *Viruses* **2020**, *12*, 1124. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Keck, F.; Ataey, P.; Amaya, M.; Bailey, C.; Narayanan, A. Phosphorylation of Single Stranded RNA Virus Proteins and Potential for Novel Therapeutic Strategies. *Viruses* **2015**, *7*, 5257–5273. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Keating, J.A.; Striker, R. Phosphorylation events during viral infections provide potential therapeutic targets. *Rev. Med. Virol.* **2012**, *22*, 166–181. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Sugasti-Salazar, M.; Llamas-Gonzalez, Y.Y.; Campos, D.; Gonzalez-Santamaria, J. Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Impairs Mayaro Virus Replication in Human Dermal Fibroblasts and HeLa Cells. *Viruses* **2021**, *13*, 1156. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Santio, N.M.; Koskinen, P.J. PIM kinases: From survival factors to regulators of cell motility. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2017**, *93*, 74–85. [\[CrossRef\]](#)
18. Liu, Z.; Han, M.; Ding, K.; Fu, R. The role of Pim kinase in immunomodulation. *Am. J. Cancer Res.* **2020**, *10*, 4085–4097.
19. Eerola, S.K.; Kohvakka, A.; Tammela, T.L.J.; Koskinen, P.J.; Latonen, L.; Visakorpi, T. Expression and ERG regulation of PIM kinases in prostate cancer. *Cancer Med.* **2021**, *10*, 3427–3436. [\[CrossRef\]](#)
20. Wu, J.; Chu, E.; Kang, Y. PIM Kinases in Multiple Myeloma. *Cancers* **2021**, *13*, 4304. [\[CrossRef\]](#)
21. Stafman, L.L.; Waldrop, M.G.; Williams, A.P.; Aye, J.M.; Stewart, J.E.; Mroczek-Musulman, E.; Yoon, K.J.; Whelan, K.; Beierle, E.A. The presence of PIM3 increases hepatoblastoma tumorigenesis and tumor initiating cell phenotype and is associated with decreased patient survival. *J. Pediatr. Surg.* **2019**, *54*, 1206–1213. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Zhang, X.; Song, M.; Kundu, J.K.; Lee, M.H.; Liu, Z.Z. PIM Kinase as an Executional Target in Cancer. *J. Cancer Prev.* **2018**, *23*, 109–116. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Toth, R.K.; Warfel, N.A. Targeting PIM Kinases to Overcome Therapeutic Resistance in Cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2021**, *20*, 3–10. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Cortes, J.; Tamura, K.; DeAngelo, D.J.; de Bono, J.; Lorente, D.; Minden, M.; Uy, G.L.; Kantarjian, H.; Chen, L.S.; Gandhi, V.; et al. Phase I studies of AZD1208, a proviral integration Moloney virus kinase inhibitor in solid and haematological cancers. *Br. J. Cancer* **2018**, *118*, 1425–1433. [\[CrossRef\]](#)
25. Iida, S.; Sunami, K.; Minami, H.; Hatake, K.; Sekiguchi, R.; Natsume, K.; Ishikawa, N.; Rinne, M.; Taniwaki, M. A phase I, dose-escalation study of oral PIM447 in Japanese patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Int. J. Hematol.* **2021**, *113*, 797–806. [\[CrossRef\]](#)
26. Rainio, E.M.; Ahlfors, H.; Carter, K.L.; Ruuska, M.; Matikainen, S.; Kieff, E.; Koskinen, P.J. Pim kinases are upregulated during Epstein-Barr virus infection and enhance EBNA2 activity. *Virology* **2005**, *333*, 201–206. [\[CrossRef\]](#)
27. Park, C.; Min, S.; Park, E.M.; Lim, Y.S.; Kang, S.; Suzuki, T.; Shin, E.C.; Hwang, S.B. Pim Kinase Interacts with Nonstructural 5A Protein and Regulates Hepatitis C Virus Entry. *J. Virol.* **2015**, *89*, 10073–10086. [\[CrossRef\]](#)
28. de Vries, M.; Smithers, N.P.; Howarth, P.H.; Nawijn, M.C.; Davies, D.E. Inhibition of Pim1 kinase reduces viral replication in primary bronchial epithelial cells. *Eur. Resp. J.* **2015**, *45*, 1745–1748. [\[CrossRef\]](#)
29. Pereiro, P.; Alvarez-Rodriguez, M.; Valenzuela-Munoz, V.; Gallardo-Escarate, C.; Figueras, A.; Novoa, B. RNA-Seq analysis reveals that spring viraemia of carp virus induces a broad spectrum of PIM kinases in zebrafish kidney that promote viral entry. *Fish Shellfish Immunol.* **2020**, *99*, 86–98. [\[CrossRef\]](#)
30. Powers, A.M.; Aguilar, P.V.; Chandler, L.J.; Brault, A.C.; Meakins, T.A.; Watts, D.; Russell, K.L.; Olson, J.; Vasconcelos, P.F.; Da Rosa, A.T.; et al. Genetic relationships among Mayaro and Una viruses suggest distinct patterns of transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *75*, 461–469. [\[CrossRef\]](#)
31. Causey, O.R.; Casals, J.; Shope, R.E.; Udomsakdi, S. Aura and Una, Two New Group a Arthropod-Borne Viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1963**, *12*, 777–781. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Carrera, J.P.; Diaz, Y.; Denis, B.; Barahona de Mosca, I.; Rodriguez, D.; Cedeno, I.; Arauz, D.; Gonzalez, P.; Cerezo, L.; Moreno, L.; et al. Unusual pattern of chikungunya virus epidemic in the Americas, the Panamanian experience. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0005338. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Pierce, A.C.; Jacobs, M.; Stuver-Moody, C. Docking study yields four novel inhibitors of the protooncogene Pim-1 kinase. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1972–1975. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Dakin, L.A.; Block, M.H.; Chen, H.; Code, E.; Dowling, J.E.; Feng, X.; Ferguson, A.D.; Green, I.; Hird, A.W.; Howard, T.; et al. Discovery of novel benzylidene-1,3-thiazolidine-2,4-diones as potent and selective inhibitors of the PIM-1, PIM-2, and PIM-3 protein kinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4599–4604. [\[CrossRef\]](#)
35. Pereira, T.N.; Virginio, F.; Souza, J.I.; Moreira, L.A. Emergent Arboviruses: A Review About Mayaro virus and Oropouche orthobunyavirus. *Front. Trop. Dis.* **2021**, *2*, 737436. [\[CrossRef\]](#)

-
36. Zhou, F.; Wan, Q.; Chen, Y.; Chen, S.; He, M.L. PIM1 kinase facilitates Zika virus replication by suppressing host cells' natural immunity. *Sign. Transduct. Target Ther.* **2021**, *6*, 207. [[CrossRef](#)]
 37. Keeton, E.K.; McEachern, K.; Dillman, K.S.; Palakurthi, S.; Cao, Y.; Grondine, M.R.; Kaur, S.; Wang, S.; Chen, Y.; Wu, A.; et al. AZD1208, a potent and selective pan-Pim kinase inhibitor, demonstrates efficacy in preclinical models of acute myeloid leukemia. *Blood* **2014**, *123*, 905–913. [[CrossRef](#)]

Targeting Host PIM Protein Kinases Reduces Mayaro Virus Replication

Madelaine Sugasti-Salazar ^{1,2}, Dalkiria Campos ¹, Patricia Valdés-Torres ¹, Paola Elaine Galán-Jurado ¹ and José González-Santamaría ^{1,*}

¹ Grupo de Biología Celular y Molecular de Arbovirus, Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Panamá 0816-02593, Panamá,; msugasti@gorgas.gob.pa (M.S.-S.); dcampos@gorgas.gob.pa (D.C.); pavt2099@gmail.com (P.A.V.-T.); paola.elaine.jurado@gmail.com (P.E.G.-J.)

² Programa de Maestría en Microbiología Ambiental, Universidad de Panamá, Panamá 3366, Panamá

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

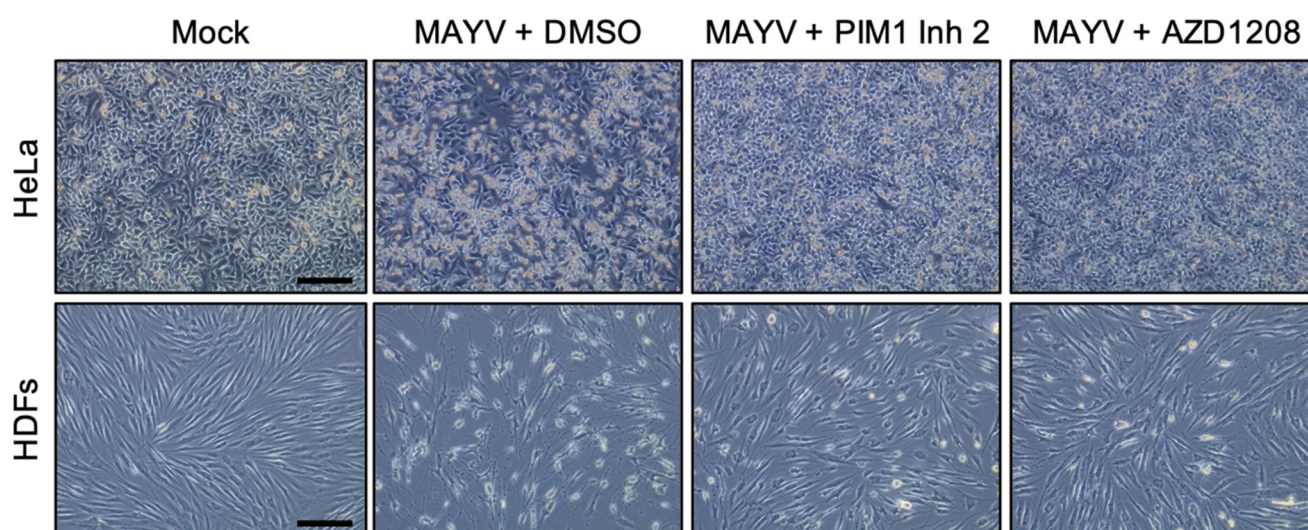


Figure S1. PIM kinase inhibitors partially prevent MAYV-induced cytopathic effects. HeLa cells or HDFs were pre-treated with PIM1 Inh 2, AZD1208 or DMSO (as a control) for 2 h. Then, the compounds were removed and the cells were infected with MAYV at an MOI of 1 (HDFs) or 10 (HeLa cells). After 1 h of virus absorption, virus was removed and PIM kinase inhibitors or DMSO were added to the cells in fresh medium and incubated for an additional 48 h. Next, cytopathic effects were evaluated with an inverted microscope and an MCI70-HD camera (Leica). Scale bar: 100 μ m.

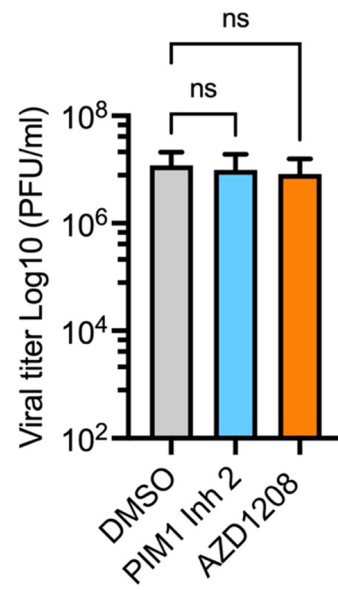


Figure S2. PIM kinase inhibitors have no virucidal effect on MAYV. 1×10^7 PFU of MAYV were incubated with PIM kinase inhibitors in serum-free medium for 2 h at 37 °C. Next, the virus was directly titrated using a plaque-forming assay. Data were analyzed with the Mann & Whitney test. Statistically significant differences are denoted as follows: ns: non-significant.