

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

***“Análisis de la potencial actividad antiviral de compuestos de origen natural
contra el virus Mayaro”***

POR:

PATRICIA A. VALDÉS T.

C.I.P. 9-754-1127

ASESOR:

JOSÉ GONZÁLEZ SANTAMARÍA

Trabajo de Graduación presentado para
optar por el Título de Licenciada en Biología
con orientación en Microbiología y
Parasitología

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2022



TRIBUNAL EXAMINADOR

Título:

**“ANÁLISIS DE LA POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE
COMPUESTOS DE ORIGEN NATURAL CONTRA EL VIRUS
MAYARO”.**

Por:

PATRICIA A. VALDÉS T.
9-754-1127

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

DR. JOSÉ GONZÁLEZ SANTAMARÍA
Tutor

DR. ÁLEX MARTÍNEZ TORRES
Jurado

MGTR. HUMBERTO CORNEJO
Jurado

DEDICATORIA

A mis padres, Diana y Feliciano, y a todos los que de alguna u otra forma contribuyeron en hacer posible este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, hermanos y amigos, por ser los pilares de mi vida, quienes me brindaron su apoyo incondicional en momentos de angustia y fueron un soporte para no decaer cuando todo parecía complicado e imposible, a Betzy y Erika por escucharme en momentos de tristeza.

A mi director de tesis el Doctor José González Santamaría por abrirme las puertas de su laboratorio, por sus consejos, su paciencia, sus conocimientos, por guiarme en mi formación profesional y creer en mí.

A mis compañeras de laboratorio Madelaine, Dalkiria y Paola por compartir sus conocimientos y permitir un buen ambiente laboral.

A mis tías Elizabeth y María, a Hendrick, Aylin y demás familiares que me apoyaron cuando estuve lejos de casa.

A la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca brindada para el financiamiento de mi carrera (Contrato No. 270-2018-789), al Instituto Conmemorativo Gorgas por permitirme el acceso a sus instalaciones.

Al Ministerio de Economía y Finanzas, a través del proyecto: “Estudio de la patogénesis molecular de *Alfavirus* y *Phlebovirus* en Panamá (Proyecto No. 19911.012) y al Sistema Nacional de Investigación (SNI) de SENACYT (Contrato 23-2021), quienes financian este trabajo de tesis.

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

A mi profesora del colegio, Verónica, por impulsarme a estudiar esta linda carrera y a los compañeros y profesores de la universidad que formaron parte de este proceso.

A los miembros del jurado Dr. Alex Martínez y Mgtr. Humberto Cornejo, por las sugerencias para el anteproyecto y la tesis.

Finalmente, a todos los que de alguna u otra forma contribuyeron en la culminación de esta etapa, mil veces gracias.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE GENERAL	VII
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Justificación	5
Descripción de la problemática	6
1. Virus Mayaro	9
1.1. Generalidades y clasificación	9
1.2. Manifestaciones clínicas	10
1.3. Epidemiología y transmisión	10
1.4. Patogénesis	12
1.5. Ciclo de replicación	12
2. Compuestos Naturales	13
2.1. Honokiol	14
2.2. Fisetin	14
2.3. α -Mangostin	15
2.4. Tanshinone IIA	15
2.5. Sanguinarine	15
2.6. Shikonin	16
Objetivos	17
General	17
Específicos	17

Hipótesis	17
Cultivo celular y compuestos naturales.....	20
Ensayos de viabilidad celular.....	20
Ensayos de infección viral y efecto citopático (ECP).....	21
Ensayo de titulación de virus	21
Análisis de proteínas	21
Ensayo de inmunofluorescencia	22
Análisis estadístico	22
1. Análisis de la citotoxicidad celular de los compuestos naturales en células Vero-E6	24
2. Honokiol y α -Mangostin protegen las células Vero-E6 del efecto citopático (ECP) inducido por MAYV	25
3. Honokiol y α -Mangostin promueven una reducción en la replicación de MAYV de manera dependiente de la dosis probada	27
4. El efecto de Honokiol y α -Mangostin es independiente de la cepa de MAYV utilizada	30
5. El efecto antiviral de Honokiol y α -Mangostin es independiente de la línea celular humana probada.....	31
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN.....	34
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES y recomendaciones	39
Conclusiones	40
Recomendaciones	41
Referencias Bibliográficas	42
Anexos.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura de MAYV.	9
Figura 2: Ciclo de replicación de MAYV.....	13
Figura 3: Citotoxicidad de los compuestos utilizados en células Vero-E6. 25	
Figura 4: Honokiol y α -Mangostin reducen el ECP inducido por MAYV en células Vero-E6 de manera dependiente de la concentración.	26
Figura 5: Honokiol y α -Mangostin inhiben la replicación de MAYV en células Vero-E6.	29
Figura 6: Honokiol y α -Mangostin reducen significativamente el número de células positivas para la proteína E1 del MAYV de manera dependiente de la concentración	29
Figura 7: El efecto antiviral de Honokiol y α -Mangostin en células Vero-E6 es independiente de la cepa de MAYV probada.	30
Figura 8: Honokiol y α -Mangostin inhiben la replicación de MAYV en las células humanas HeLa y HDFs.	32
Figura 9: Honokiol y α -Mangostin reducen la expresión de las proteínas virales E1 y nsP1 en las células Vero-E6 y HeLa.....	33

RESUMEN

El virus Mayaro (MAYV) es un arbovirus perteneciente al género *Alfavirus* dentro de la familia *Togaviridae* y es el agente causal de la fiebre de Mayaro. Estudios recientes sugieren que MAYV está aumentando su circulación en poblaciones humanas y en animales hospederos en Centro y Suramérica. Sin embargo, pese a que el MAYV representa un potencial problema de salud pública, es un patógeno desatendido y actualmente, no existen vacunas licenciadas o antivirales específicos para uso humano. En este sentido, la exploración de moléculas de origen natural podría ser una estrategia eficaz para el desarrollo de nuevos fármacos antivirales, gracias a su diversidad química y estructural, baja toxicidad y costo. En este trabajo evaluamos el potencial antiviral de 6 compuestos naturales contra el MAYV: Sanguinarine, Shikonin, Tanshinone IIA, Fisetin, Honokiol y α -Mangostin. Para analizar el efecto antiviral de estos compuestos, llevamos a cabo ensayos de citotoxicidad, cuantificación de la producción de partículas virales y análisis de proteínas usando inmunofluorescencia e inmunoblot. Nuestros resultados indican que los compuestos naturales Honokiol y α -Mangostin reducen la replicación de las cepas de MAYV AVR0565, TRVL 4875 y Guyane. Así, nosotros proponemos que estos compuestos podrían ser candidatos para el desarrollo de tratamientos antivirales contra MAYV.

Palabras Clave: MAYV, actividad antiviral, compuestos naturales, Honokiol, α -Mangostin.

ABSTRACT

Mayaro virus (MAYV) is an emerging arbovirus belonging to the *Alphavirus* genus within the *Togaviridae* family, and it is the causal agent of Mayaro fever. Recent studies have suggested an increasing circulation of MAYV in both human populations and animal hosts in Central and South America. Despite the fact that MAYV represents a potential public health risk, it is a neglected virus and currently, there are no licensed vaccines or specific antivirals available for human use. Due to their chemical and structural diversity as well as low toxicity and cost, exploring natural molecules could be an effective strategy for developing new antiviral drugs. In the present study we evaluated the antiviral potential of six natural compounds against MAYV: Sanguinarine, Shikonin, Tanshinone IIA, Fisetin, Honokiol and α -Mangostin. To analyze the antiviral effect of these compounds, we performed cytotoxicity assays, quantified viral progeny production using plaque assays and analyzed viral proteins using immunofluorescence and immunoblot. Our results indicate that the natural compounds Honokiol and α -Mangostin were able to reduce replication of the AVR0565, TRVL4875 y Guyane MAYV strains. Thus, we propose that these compounds could be candidates for the development of antiviral treatments against MAYV.

Keywords: MAYV, antiviral activity, natural compounds, Honokiol, α -Mangostin.

INTRODUCCIÓN

Los arbovirus son virus transmitidos por artrópodos que se agrupan en distintas familias taxonómicas, entre estas, se encuentra la familia *Togaviridae*, que incluye al género *Alfavirus*, un grupo de virus envueltos de ARN monocatenario de polaridad positiva y genomas que varían entre 10 a 12 kilo bases (kb) de longitud (Fros and Pijlman, 2016). Los alfavirus, de acuerdo con su distribución geográfica, se dividen en alfavirus del viejo y del nuevo mundo, donde los del nuevo mundo típicamente causan enfermedades neurológicas, mientras que los del viejo mundo causan principalmente enfermedades reumáticas (Levi and Vignuzzi, 2019).

Durante los últimos años, los arbovirus se han expandido rápidamente a nivel global, varios de estos han emergido y reemergido convirtiéndose en causantes de importantes brotes epidémicos impulsados por distintos factores ambientales, cambios antropogénicos y alteraciones genéticas (Lorenz *et al.*, 2017). Por otro lado, los virus de ARN evolucionan con mayor rapidez gracias a su alta capacidad de mutación, favoreciendo así su adaptación a un amplio número de vectores, lo que los convierte en una importante amenaza para la salud pública e incrementa su relevancia en regiones tropicales, principalmente en países en vías de desarrollo con escasa vigilancia epidemiológica (Lopes Marques *et al.*, 2020; Caicedo *et al.*, 2021).

Los virus Mayaro (MAYV), Chikungunya (CHIKV), Una (UNAV), Bebaru (BEBV), Getah (GETV), O'nyong-nyong (ONNV), Ross River (RRV) y Semliki Forest (SFV), se clasifican dentro de un grupo serológico llamado complejo Semliki Forest. Estos virus comparten sitios antigénicos comunes y producen síntomas parecidos, lo que dificulta su diagnóstico (Abdelnabi and Delang, 2020). El MAYV es el agente causante de la fiebre de Mayaro, cuyos síntomas más comunes son fiebres abruptas, erupciones cutáneas y artralgias que pueden ser de larga duración, estudios realizados en Perú mostraron persistencia en más del 50% de los casos presentados (Santiago *et al.*, 2015). Además, el virus Mayaro es capaz de causar miocarditis, poliartritis crónica incapacitante que puede persistir por meses o años, se ha demostrado que tiene la capacidad de infectar células cerebrales lo que puede provocar complicaciones neurológicas graves, e incluso ha sido causante de muertes (Acosta-Ampudia *et al.*, 2018; Bengue *et al.*, 2021).

El MAYV fue aislado por primera vez en Trinidad y Tobago en 1954 por Anderson et al. a partir de muestras de sangre de trabajadores forestales y caracterizado por Casals y Whitman en 1957, desde entonces, ha sido responsable de pequeños brotes en Centro y Suramérica (Anderson *et al.*, 1957; Casals and Whitman, 1957; Acosta-Ampudia *et al.*, 2018). El ciclo de transmisión del MAYV es enzoótico a través de la transmisión por mosquitos selváticos, siendo su principal vector los mosquitos *Haemagogus janthinomys*, y sus principales reservorios involucran primates no humanos y mamíferos pequeños (Azar *et al.*, 2020). Se han realizado ensayos en laboratorio que demuestran que otros mosquitos como *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, son capaces de transmitir este virus con eficacia, lo que aumenta la posibilidad de que este patógeno pase de un ciclo enzoótico a uno urbano, dado la naturaleza de estos vectores, lo que podría favorecer su distribución en el mundo y su capacidad de emerger en nuevas áreas, tal y como ha ocurrido en los últimos años con otros arbovirus como Zika (ZIKV) y CHIKV (Hotez and Murray, 2017; Levi and Vignuzzi, 2019; Pereira *et al.*, 2020).

Recientemente, se han llevado a cabo estudios que sugieren que MAYV está aumentado su circulación tanto en poblaciones humanas como en hospederos selváticos en Centro y Suramérica. Además, modelos matemáticos predicen que los vectores para arbovirus se expandirán, así como también hay evidencias de que infecciones por alfavirus han estado ocurriendo frecuentemente, pero han pasado desapercibidas por los sistemas de vigilancia de la región latinoamericana (O Mota, Avilla and Nogueira, 2019; Carrera *et al.*, 2020; Ganjian and Riviere-Cinnamond, 2020).

Justificación

A pesar de que el MAYV representa un potencial problema de salud pública, es un virus desatendido y actualmente no existen vacunas licenciadas o antivirales específicos disponibles para uso humano, lo que se ha convertido en un tema de preocupación creciente debido a los recientes brotes de infecciones por este virus en distintas regiones de Latinoamérica (Alves Esposito and Lopes da Fonseca, 2017; O Mota, Avilla and Nogueira, 2019; Ganjian and Riviere-Cinnamond, 2020).

En este sentido, existe la necesidad de identificar nuevos tratamientos antivirales capaces de combatir estas infecciones y los productos naturales tienen gran potencial de uso para este fin. Se conoce que las plantas son capaces de producir variados metabolitos secundarios con potencial de inhibir la adhesión, penetración, replicación y vías de activación de señales intracelulares, debido a su diversidad de componentes activos y diversas rutas metabólicas. También, se conoce que los compuestos naturales presentan menor toxicidad que los compuestos sintéticos, y por lo tanto, los productos naturales podrían ser esenciales en el desarrollo de agentes antivirales capaces de acelerar el desarrollo de tratamientos terapéuticos y profilácticos, por lo que deben ser estudiados (Shaneyfelt *et al.*, 2006; dos Santos *et al.*, 2014; Hotez and Murray, 2017; Levi and Vignuzzi, 2019; Diagne *et al.*, 2020; Goh, Mok and Chu, 2020; Lopes Marques *et al.*, 2020; Santhi *et al.*, 2021).

Sin embargo, a pesar de que se han descrito variados principios activos de productos naturales y muchos de estos poseen actividad antiviral, tal es el caso de flavonoides, terpenos, taninos, alcaloides, fenoles, esteroides, cumarinas, xantonas, proantocianidinas, proantocianinas, lignanos, glucósidos, ácidos orgánicos y demás, el conocimiento que se tiene acerca de estos, continúa siendo escaso (Santhi *et al.*, 2021)

Descripción de la problemática

A pesar de que los arbovirus causan un gran número de infecciones y pueden ser causantes de enfermedades debilitantes o potencialmente mortales, la mayoría de los casos son asintomáticos o se presentan como enfermedades similares a la gripe, lo que contribuye a que la gran mayoría de estos sean considerados como desatendidos. Sin embargo, en la actualidad ha aumentado el número de investigaciones para el descubrimiento de nuevos fármacos, pero, a pesar del avance de la investigación en el desarrollo de estos, no existen antivirales específicos disponibles para el tratamiento de los arbovirus, pese a su rápida propagación (Goh, Mok and Chu, 2020; Lopes Marques *et al.*, 2020).

No obstante, se han descrito unas pocas moléculas con actividad antiviral contra MAYV. Así, se reportó que los flavonoides Quercetin y algunos de sus derivados aislados de la planta *Bauhinia longifolia*, poseen actividad anti-MAYV. Por otro lado, se encontró que Silymarin, un extracto complejo de la planta *Silybum marianum*, presentó una potente actividad contra el MAYV y previene el estrés oxidativo inducido por la infección en células de hígado HepG2. En nuestro laboratorio, se identificó que el compuesto ácido ginkgólico proveniente de la planta *Ginkgo biloba*, posee una fuerte actividad virucida contra MAYV, CHIKV, ZIKV y el UNAV, lo que sugiere que este compuesto podría tener una actividad antiviral de amplio espectro. Sin embargo, ninguno de estos compuestos, ha progresado a estudios *in vivo*, por lo que existe la necesidad de identificar nuevos compuestos que amplíen las opciones contra este arbovirus y se puedan llevar a estudios más detallados sobre su potencial utilidad como fármacos antivirales (Dos Santos et al., 2014; Spindola et al., 2014; Caetano Camini et al., 2018; Coelho Ferraz et al., 2019; Campos et al., 2020; Langendries et al., 2021).

CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Virus Mayaro

1.1. Generalidades y clasificación

MAYV es un virus envuelto de ARN monocatenario de sentido positivo perteneciente al género *Alfavirus* dentro de la familia *Togaviridae* (Figura 1), cuyo genoma consta de ≈ 12 kb y codifica para 4 proteínas no estructurales (nsP1-4) y cinco proteínas estructurales (C, E1-3, 6k) (Alves Esposito and Lopes da Fonseca, 2017). MAYV se agrupa en tres genotipos similares D, L y N, siendo el genotipo D el de mayor distribución geográfica reportado en Brasil, Guyana Francesa, Bolivia, Perú, Surinam, Trinidad, Tobago, Argentina, Colombia y Venezuela; seguido de el genotipo L, reportado en Brasil y Haití, mientras que el genotipo N solo ha sido reportado en la región Madre de Dios en Perú en el 2010 (Auguste *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2021).

MAYV pertenece al complejo serológico Semliki Forest en conjunto con los virus CHIKV, UNAV, BEBV, GETV, ONNV, RRV y SFV. Al pertenecer al mismo complejo serológico estos virus comparten sitios antigénicos comunes, lo que genera reactividad cruzada y dificulta el diagnóstico (Acosta-Ampudia *et al.*, 2018).

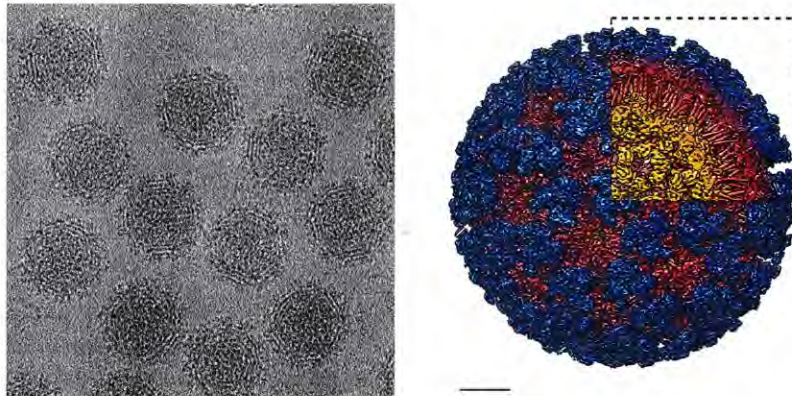


Figura 1. Estructura de MAYV. Micrografía en la que se observan viriones de MAYV y vista exterior 3D de una partícula de Mayaro. Imagen tomada de Hotez and Murray (2017) doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005462.g001>

1.2. Manifestaciones clínicas

MAYV es el agente causal de la fiebre de Mayaro, su periodo de incubación varía de 1 a 12 días, la fase aguda dura de 3 a 5 días con la enfermedad, caracterizada por presentar fiebre, dolor de cabeza, dolor retro ocular, escalofríos, mialgias, mareos, manifestaciones gastrointestinales, edemas articulares, erupciones cutáneas, dolor abdominal y/o artralgias que pueden durar de meses a años (Organización Panamericana de la Salud and Organización Mundial de la Salud, 2019). Aunque Mayaro generalmente causa una enfermedad no fatal e inespecífica, también se han reportado casos con manifestaciones graves como complicaciones neuronales, miocarditis y hemorragias e incluso la muerte (Acosta-Ampudia et al., 2018; Diagne et al., 2020).

1.3. Epidemiología y transmisión

MAYV se aisló por primera vez en Trinidad y Tobago en 1954, a partir de muestras de sangre de trabajadores forestales, desde entonces se ha aislado de regiones tropicales, mayoritariamente de casos reportados en personas que han estado en zonas selváticas de América Latina y el Caribe, sin embargo, en estudios retrospectivos se ha identificado al MAYV en suero colectado durante la construcción del canal de Panamá entre 1904 y 1914. En los últimos años se han presentado casos en regiones no endémicas y se ha detectado el virus en una mayor cantidad de países en casos aislados o pequeños brotes (Srihongse, Stacy and Gauld, 1973; Alves Esposito and Lopes da Fonseca, 2017; Ganjian and Riviere-Cinnamond, 2020; Caicedo *et al.*, 2021; Pereira *et al.*, 2021).

Según datos de la Organización Panamericana de Salud (OPS) hasta el 2020 se habían reportado 901 casos de MAYV en humanos, provenientes de 11 países de Latinoamérica y el Caribe, de estos, 844 fueron casos autóctonos confirmados o presuntivos y 15 fueron casos importados (Ganjian and Riviere-Cinnamond, 2020). Sin embargo, la mayoría de los datos reportados se basan en pruebas serológicas, por lo cual existe una elevada reactividad cruzada con otros alfavirus (Acosta-Ampudia *et al.*, 2018).

De acuerdo con la literatura han ocurrido brotes del MAYV en Brasil, Bolivia y Venezuela; registrándose el primer brote en 1955 en la comunidad de Belém en el estado de Pará-Brasil; también en 1955 ocurrió un brote en Bolivia, al cual denominaron “Uruma”, en este brote MAYV se identificó como el virus causante de entre el 10-15% de 192 casos. Posteriormente, ocurrió otro brote entre 1977 y 1978 en una comunidad rural del estado de Pará en Brasil, en donde se infectó alrededor del 20% de la población; en el 2008 se registró un brote de Dengue en otra comunidad de Pará en el cual nuevamente se registró evidencia de infección por MAYV en un 34% de los pacientes infectados; en el 2010 se reportó 25% de casos positivos para MAYV de 77 casos analizados en el estado de Portuguesa en Venezuela. Además, de los reportes de los brotes, existen estudios de seroprevalencia y reportes de casos confirmados y/o presuntivos de MAYV en Surinam (1964), Ecuador (1997), Guyana Francesa (1998), Venezuela (2000), Bolivia y Perú (2000-2007), México (2001), Perú (2010-2013), Haití (2015) (Acosta-Ampudia et al., 2018; Azar et al., 2020).

También se han reportado casos importados en Norteamérica provenientes de Bolivia y Perú, en Holanda provenientes de Surinam (2008) y Brasil (2013), en Francia provenientes de Brasil (2009) y Guyana Francesa (2016), en Suiza proveniente de Perú (2011) y en Alemania provenientes de Bolivia (2012) y Guyana Francesa (2013). Además, se ha reportado evidencia de la transmisión de MAYV en distintos animales, principalmente en primates; además, se ha aislado el virus de distintas especies de mosquitos en Trinidad, Panamá, Brasil y Colombia (Acosta-Ampudia et al., 2018; Caicedo et al., 2021).

Mayaro posee un ciclo de transmisión principalmente enzoótico a través de la picadura de mosquitos selváticos, su vector primario son los mosquitos *Haemagogus janthinomys*, pero también ha sido aislado de otros géneros de mosquitos incluyendo *Culex*, *Mansonia*, *Psorophora*, *Coquillettidia*, *Aedes* y *Sabethes*, mientras que sus reservorios involucran primates no humanos, marsupiales, roedores, cocodrilos y aves (Azar et al., 2020). Adicionalmente, ensayos en laboratorio han demostrado la competencia de mosquitos de hábitos urbanos como, *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, como vectores eficaces de

MAYV, aumentando la relevancia de este virus como patógeno humano e incrementando su potencial para emerger en áreas urbanas, tal como ha ocurrido en los últimos años con otros arbovirus como ZIKV y CHIKV (Hotez and Murray, 2017; Levi and Vignuzzi, 2019; O Mota, Avilla and Nogueira, 2019; Pereira *et al.*, 2020, 2021).

1.4. Patogénesis

Luego de la picadura del mosquito infectado, el virus replica en la piel, pasa a través de los vasos sanguíneos del huésped y replica en los glóbulos blancos, para así diseminarse en los huesos, músculos y articulaciones a través del bazo y el hígado (Diagne *et al.*, 2020).

1.5. Ciclo de replicación

La envoltura viral se fusiona con la membrana plasmática de las células huésped a través de los receptores de superficie como receptor Mxra8, el cual se une a la superficie a través de los dominios A y B de la proteína E2, luego el virus entra a la célula por endocitosis formando un endosoma (Figura 2). En el citoplasma el pH del endosoma disminuye y el virus libera ARN genómico al desarmar su estructura, este ARN se traduce a proteínas no estructurales que forman la replicasa viral, esta cataliza la síntesis de ARN de la hebra de ARN de sentido negativo que a su vez sirve como plantilla para la síntesis del genoma de sentido positivo y el ARN subgenómico 26S. El ARN subgenómico funciona como ARN mensajero, se procesa en el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático para producir proteínas estructurales que forman la nucleocápside y glicoproteínas, luego ocurre el ensamblaje de componentes virales y se produce la liberación de viriones a través de la membrana plasmática, estas partículas virales infectan otras células y se repite el ciclo (Zhang *et al.*, 2018; Abdelnabi and Delang, 2020; Diagne *et al.*, 2020).

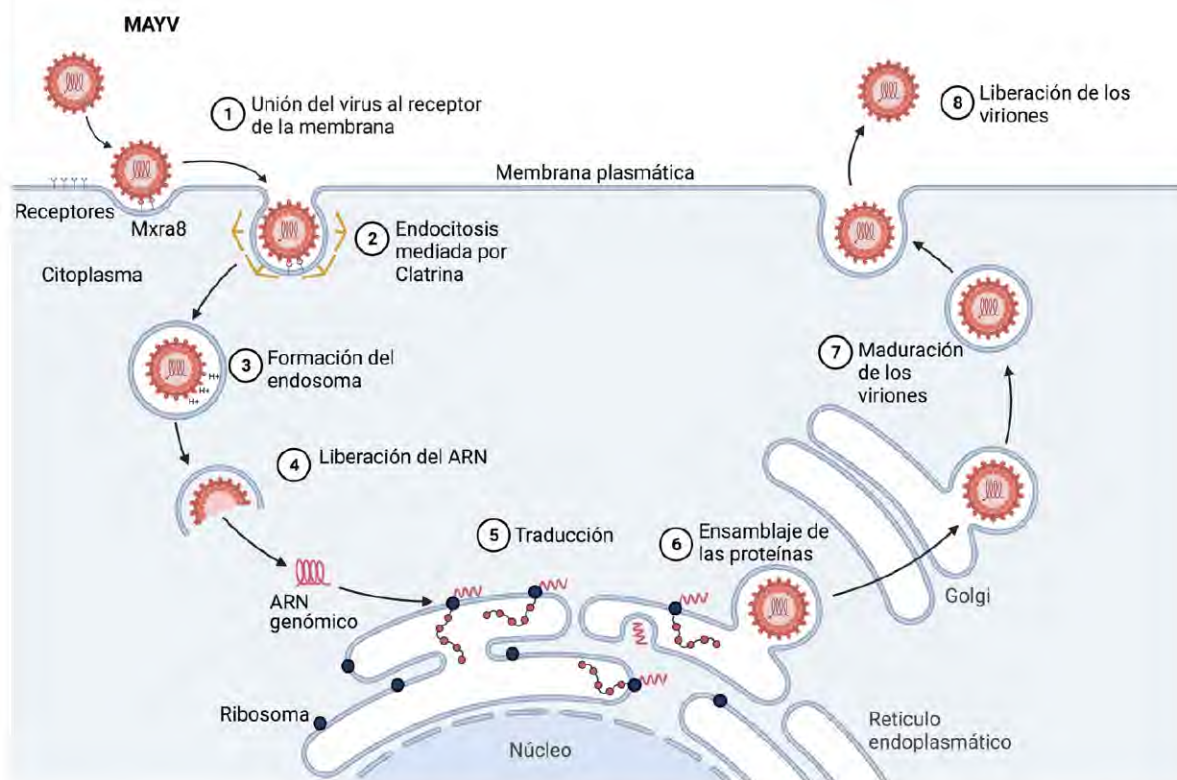


Figura 2. Ciclo de replicación de MAYV. Adaptado de Diagne et al. (2020). doi:10.3390/pathogens9090738

2. Compuestos Naturales

Los productos naturales han sido utilizados durante miles de años en la medicina tradicional y estos han sido de gran interés para la industria farmacéutica. De hecho, muchas moléculas de origen natural, provenientes de plantas, animales, hongos, algas y bacterias, han demostrado potencial terapéutico y muchas de estas se utilizan como terapias anticancerígenas, así como antibacterianos, antifúngicos, antivirales e incluso, como pesticidas controladores de vectores, debido a su baja toxicidad en mamíferos, rápida degradación en el ambiente y complejidad química, que podría limitar la resistencia e incrementar su aplicación (George *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2019; Ben-shabat *et al.*, 2020; Sagaya Jansi *et al.*, 2021). Además, los altos costos y efectos adversos de las drogas sintéticas junto a la emergencia de la resistencia a drogas antivirales (ADR), demanda de nuevas

fármacos antivirales seguros y los compuestos naturales ofrecen una alternativa más económica y accesible, puesto que se encuentran en la naturaleza, contrario a las moléculas sintéticas que requieren un mayor esfuerzo en su diseño y validación (Arakawa *et al.*, 2009; Goh, Mok and Chu, 2020; Adhikari *et al.*, 2021).

El incremento exponencial de investigaciones de extractos de fuentes naturales con actividad antiviral refleja el interés de la comunidad científica en los beneficios de estos recursos como potenciales antivirales. La actividad de estos extractos a menudo se debe a varios componentes activos, puesto que en estos se pueden encontrar diversas clases de compuestos bioactivos, provenientes generalmente de alcaloides, glucósidos, polifenoles y terpenos, de hecho, se ha descrito que estos pueden presentar actividad antiviral contra diversos virus, entre ellos, el virus de inmunodeficiencia humana, herpes simplex, rabia, coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo, síndrome respiratorio de Medio Oriente, poxvirus, dengue, influenza, rinovirus, enterovirus, coxsackievirus, hepatitis B y C, ZIKV, CHIKV, encefalitis japonesa, rotavirus humano, Sindbis virus, virus respiratorio sincitial (Bekhit and Bekhit, 2014; Lin, Hsu and Lin, 2014; Tarasuk *et al.*, 2017; Jasso-Miranda *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019; Mukherjee, 2019; Goh, Mok and Chu, 2020; Adhikari *et al.*, 2021; Islam *et al.*, 2021; Thomas *et al.*, 2021).

2.1. Honokiol

El Honokiol es un lignano bifenol derivado de raíces y corteza de las plantas *Magnolia spp*, usado en la medicina tradicional china en forma de té. Posee propiedades antidepresivas, antiinflamatorias, antiangiogénicas, antioxidantes, neuroprotectoras, antitumorales, antifúngico, antibacteriano, también se ha demostrado su capacidad antiviral contra distintos virus como el virus del Herpes Simplex-1, Hepatitis C y Dengue tipo 2 (Lan *et al.*, 2012; Fang *et al.*, 2015; Rauf *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2020).

2.2. Fisetin

Fisetin es un pigmento flavonoide presente en diversas frutas, verduras, nueces, vinos y arboles de la familia Fabaceae y Anacardiaceae. Este pigmento ha mostrado propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antiangiogénicas,

antidiabéticas, neuroprotectoras, cardioprotectoras, anticancerígenas y algunas actividades antivirales inhibiendo al Dengue tipo 2 y 3, Enterovirus y CHIKV (Lin et al., 2012; Pal, Pearlman and Afaq, 2016; Jasso-Miranda et al., 2019; Kashyap et al., 2019; Goh, Mok and Chu, 2020).

2.3. α -Mangostin

Este compuesto pertenece a un grupo de xantonas isopreniladas provenientes del fruto del árbol *Garcinia mangostana*. Estas xantonas poseen distintas actividades farmacológicas, entre estas, actividades anticancerígenas, antimalariales, anticarcinogénicas, antibacterianas, antifúngicas, neuroprotectoras, antiinflamatorias, antioxidantes y anti nefritis lúpica, pero existe poca literatura acerca de sus actividades antivirales, hasta el momento ha demostrado inhibir la replicación del virus del Dengue y la proteasa del VIH (Gutierrez-Orozco and Failla, 2013; Ibrahim et al., 2014; Tarasuk et al., 2017; Wang et al., 2017; Ye et al., 2020; Zhou et al., 2020).

2.4. Tanshinone IIA

Tanshinone IIA es un diterpeno quinona aislado de los rizomas de la hierba *Salvia miltiorrhiza*, es el mayor constituyente lípido soluble de esta hierba y se utiliza en la medicina tradicional china para tratar diferentes enfermedades. Se ha informado que tiene distintas actividades biológicas, como la inhibición de la migración del musculo liso aórtico humano, propiedades antitumorales en distintas líneas celulares, antialérgico, antioxidante, antiinflamatorio, anticonvulsivo, antiarteriosclerótico, además posee actividad antiangiogénica y antiviral (Jin et al., 2008; Fang et al., 2015).

2.5. Sanguinarine

El cloruro de Sanguinarine es un alcaloide de benzofenantridina derivado principalmente de rizomas de plantas de la especie *Sanguinaria canadensis*. Sanguinarine posee distintas propiedades anticancerígenas, así como antimicrobianas, antifúngicas, antihipertensivas y antiinflamatorias, además ha mostrado interactuar con distintas dianas celulares incluyendo proteínas cinasas y

el factor nuclear NF- κ B (Mackraj et al., 2008; Basu y Kumar, 2016; Achkar et al., 2017a; Wu et al., 2020).

2.6. Shikonin

Shikonin es una naftoquinona roja derivada de las raíces de *Lithospermum erythrorhizon*. Este pigmento ha demostrado distintas propiedades farmacológicas, entre las cuales están, propiedades cicatrizantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antibacterianas y antivirales; así como también se ha demostrado que modula, activa y regula distintas vías entre las que están PI3K, AKT, PKM2, FAK, C-MYC y otras (Guo et al., 2019; Wang et al., 2019)

Objetivos

General

- Evaluar la posible actividad antiviral de compuestos de origen natural contra el virus Mayaro.

Específicos

- Analizar la toxicidad celular de los compuestos naturales Honokiol, Fisetin, α -Mangostin, Tanshinone IIA, Sanguinarine y Shikonin en células Vero-E6, HeLa y fibroblastos de piel humana (HDFs).
- Estudiar el impacto de los compuestos naturales sobre el efecto citopático inducido por el MAYV en células Vero-E6.
- Evaluar la producción de partículas virales en distintas cepas de MAYV en células Vero-E6 tratadas y no tratadas con los compuestos naturales.
- Estudiar la presencia de antígenos del MAYV mediante inmunofluorescencia en células Vero-E6 tratadas con los compuestos naturales que presentaron actividad en el tamizaje inicial.
- Analizar la producción de partículas virales en diferentes líneas celulares humanas infectadas con el MAYV y tratadas con aquellos compuestos que presentaron actividad antiviral en células Vero-E6.
- Estudiar el efecto de los compuestos naturales con actividad antiviral sobre la expresión de las proteínas virales nsP1 y E1 en diferentes líneas celulares infectadas con MAYV.

Hipótesis

H₁: Los compuestos de origen natural presentarán actividad antiviral contra el virus Mayaro.

Ho: Los compuestos de origen natural no presentarán actividad antiviral contra el virus Mayaro.

CAPÍTULO II: METODOLOGÍA

Se utilizó la metodología previamente descrita por Llamas-González *et al.* (2019).

Cultivo celular y compuestos naturales

Las células Vero-E6 y HeLa fueron cultivadas en Medio Esencial Mínimo (MEM) y las células primarias, fibroblastos de piel humana (HDFs), en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM). Todos los medios de cultivo celular se complementaron con 1% de solución de penicilina-estreptomicina, 2 mM de L-glutamina y suero bovino fetal (SBF) al 10%. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂.

Los compuestos Shikonin, Sanguinarine, Tanshinone, Fisetin, Honokiol y α -Mangostin se obtuvieron de Tocris o Selleckchem (Estados Unidos de América-EE UU) y se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración de 10 mM. Todos los compuestos fueron alicutados y almacenados a -20 o -80 °C, hasta su uso.

Ensayos de viabilidad celular

La toxicidad de los compuestos se evaluó utilizando el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células fueron cultivadas en platos de 96 pocillos en MEM o DMEM sin rojo fenol y se trataron con los compuestos a concentraciones de 5 y 10 μ M o DMSO al 0.1%, como control. Después de un período de 24 o 48 h de incubación, se añadió una solución de MTT a una concentración de 5 mg/mL preparado en PBS estéril y se incubó en la oscuridad a 37 °C durante 4 h. Posteriormente, los cristales de formazán se disolvieron en solución de HCl 4 mM, Triton X-100 al 10% en isopropanol y luego fueron incubados toda la noche a temperatura ambiente (TA). Al día siguiente, se midió la absorbancia a 570 nm usando un espectrofotómetro lector de microplacas (BioTeK, EEUU). La viabilidad celular se representó como el porcentaje de células viables normalizadas con respecto al control (células tratadas con DMSO).

Ensayos de infección viral y efecto citopático (ECP)

Para los experimentos de ECP inducido por el MAYV o la cuantificación de partículas virales, células Vero-E6, HeLa o HDFs fueron cultivadas en platos de 12 pocillos y se infectaron durante 1 h en medio sin SBF a una multiplicidad de infección (MOI) de 1 o 10. Pasada 1 h de absorción del virus, se retiró el inóculo y se agregó DMSO o los compuestos a distintas concentraciones en medio con SBF al 2%. Después de 24 o 48 h de incubación, se observó el efecto citopático con un microscopio invertido o se colectaron los sobrenadantes celulares para ensayos de titulación viral.

Ensayo de titulación de virus

Se evaluó la producción de partículas virales en los sobrenadantes de células infectadas y tratadas con los compuestos mediante el ensayo de formación de placas y tinción con violeta cristal. Para ello, se infectaron monocapas de células Vero-E6 confluentes crecidas en platos de 6 pocillos, con diluciones seriadas 1:10 de los sobrenadantes e incubadas durante 1 h a 37 °C. Después de la incubación, se retiró el inóculo, se agregó a los platos una solución de agar al 1% en MEM suplementado con SBF al 2% y se incubó durante 3 días a 37 °C. Pasado el periodo de incubación, se inactivaron y fijaron las células con una solución de formaldehído al 4% durante 20 min, se retiró el agar y se tiñó con violeta cristal al 2% preparado en metanol al 30%. Finalmente, se lavaron los platos con agua del grifo a presión baja, se dejaron secar y se contó el número de placas, los títulos virales se expresaron como unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL).

Análisis de proteínas

Las proteínas virales o celulares se analizaron mediante inmunoblot. Para ello, las células se lisaron con tampón de carga de Laemmli con Ditiotretitol al 10%. Las proteínas se separaron en geles de SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron en una solución de leche desnatada al 5% en tampón T-TBS durante 20 min en agitación. Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios policlonales de conejo contra las proteínas estructural E1 y no estructural 1 (nsP1) del MAYV. Como control de carga

se utilizó un anticuerpo contra la proteína celular GAPDH. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 min a las membranas con tampón T-TBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con la enzima Peroxidasa de Rábano (HRP) durante 1 h a TA. Después, se procedió a lavar nuevamente las membranas con tampón T-TBS, se secaron y finalmente, se incubaron con el reactivo sustrato químico luminiscente mejorado (ECL), durante 5 min para luego detectar la señal mediante un escáner de quimioluminiscencia C-Digit (LI-COR, EEUU).

Ensayo de inmunofluorescencia

Se cultivaron células Vero-E6 en cubreobjetos de 10 mm de diámetro dentro de platos de 24 pocillos. Estos se infectaron con MAYV a una MOI de 1 y se trataron con los distintos compuestos o DMSO (como control) durante 24 h. Seguido, se fijaron las células con paraformaldehído al 2% en tampón PBS durante 20 min y posteriormente, se permeabilizaron con Triton-X100 al 0.25%. Luego, se bloquearon las células con albumina de suero bovina al 2% en PBS durante 20 min y se tiñeron durante 24 h con el anticuerpo primario anti-E1 generado en conejo. Posteriormente, las células se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Alexa Flour-568 durante 1 h y en la oscuridad. Finalmente, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con la solución de montaje Prolong con DAPI para teñir los núcleos celulares y se observaron en un microscopio confocal FV1000 (marca Olympus, EEUU).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron con el programa de análisis estadístico *Graphpad Prism*, mediante la prueba estadística no paramétrica ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Dunnett. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

CAPÍTULO III: RESULTADOS

1. Análisis de la citotoxicidad celular de los compuestos naturales en células Vero-E6

Para evaluar la posible actividad antiviral de los compuestos naturales Sanguinarine, Shikonin, Tanshinone IIA, Fisetin, Honokiol o α -Mangostin, se decidió llevar a cabo un cribado inicial en células Vero-E6. La evaluación de la toxicidad en el proceso de desarrollo de fármacos, permitió seleccionar candidatos que posean un perfil de seguridad aceptable, lo que aumenta las probabilidades de comercialización de estos potenciales tratamientos (Svensson et al., 2017). Así, se evaluó la citotoxicidad de cada compuesto mediante el ensayo colorimétrico de MTT. Para ello, células Vero-E6 fueron tratadas con dosis crecientes de cada uno de los compuestos e incubados durante 24 o 48 h para determinar la viabilidad celular. Los resultados obtenidos en ambos tiempos de incubación revelaron una tendencia similar con todos los compuestos probados. De esta manera, Sanguinarine y Shikonin provocaron una reducción significativa de la viabilidad de las células Vero-E6 (menor o igual al 60%) en la dosis más baja probada (Figura 3A, B). Por otro lado, Tanshinone IIA, Fisetin y Honokiol no parecen afectar significativamente la viabilidad celular (>80%) en ambas dosis probadas (Figura 3C-E). En el caso de α -Mangostin, esta molécula presentó una citotoxicidad muy significativa a la dosis más alta evaluada (10 μ M) (Figura 3F), pero ninguna toxicidad en la dosis menor. Como consecuencia, se descartó Sanguinarine y Shikonin del estudio, y se decidió utilizar en los experimentos posteriores, dosis de 5 y 10 μ M con Tanshinone IIA, Fisetin y Honokiol, mientras que con α -Mangostin, dosis de 1 y 5 μ M.

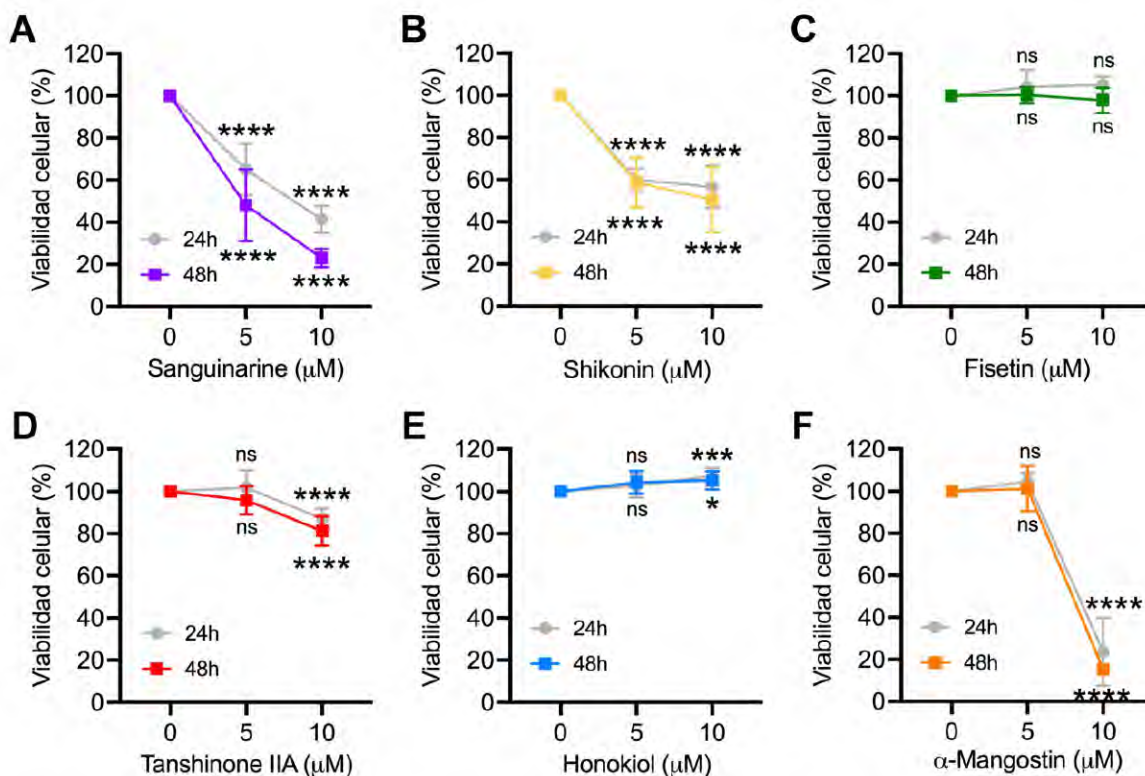


Figura 3. Citotoxicidad de los compuestos utilizados en células Vero-E6. Células Vero-E6 fueron tratadas con las dosis indicadas de Sanguinarine (A), Shikonin (B), Tanshinone IIA (C), Fisetin (D), Honokiol (E) y α -Mangostin (F). Tras 24 o 48 h de incubación, la viabilidad celular se evaluó mediante el método de MTT. Los resultados se expresan en porcentaje de células viables, asumiendo que las células no tratadas tienen un 100 % de viabilidad. Los datos se analizaron con la prueba estadística de ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Dunnett. Los datos presentados representan el promedio \pm la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes con 5 réplicas. Las diferencias estadísticas se muestran como: ns: no significativo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$; **** $p < 0.0001$.

2. Honokiol y α -Mangostin protegen las células Vero-E6 del efecto citopático (ECP) inducido por MAYV

Se ha reportado que el MAYV induce un fuerte ECP en células Vero, el cual se puede observar a través de cambios morfológicos y la inducción de la muerte celular a partir de las 24 a 48 h después de la infección (Barroso et al., 2002). Por esta razón, decidimos probar si los compuestos seleccionados en el ensayo de citotoxicidad eran capaces de proteger las células Vero-E6 del daño inducido por el virus. Para ello, infectamos estas células con MAYV y después de 1 h de absorción del virus, tratamos las células con DMSO o dosis crecientes de Fisetin, Honokiol,

Tanshinone IIA o α -Mangostin; y después de 48 h de infección, observamos la morfología de las células con la ayuda de un microscopio invertido. En las células infectadas con MAYV y tratadas con DMSO observamos un fuerte ECP (Figura 4). Los compuestos Fisetin y Tanshinone IIA no parecen proteger las células, mientras que con Honokiol y α -Mangostin, observamos una protección de manera dependiente de la dosis del compuesto probado (Figura 4). Estos resultados sugieren que los compuestos Honokiol y α -Mangostin inhiben parcialmente el ECP inducido por MAYV y sugiere que estos compuestos podrían tener un efecto antiviral.

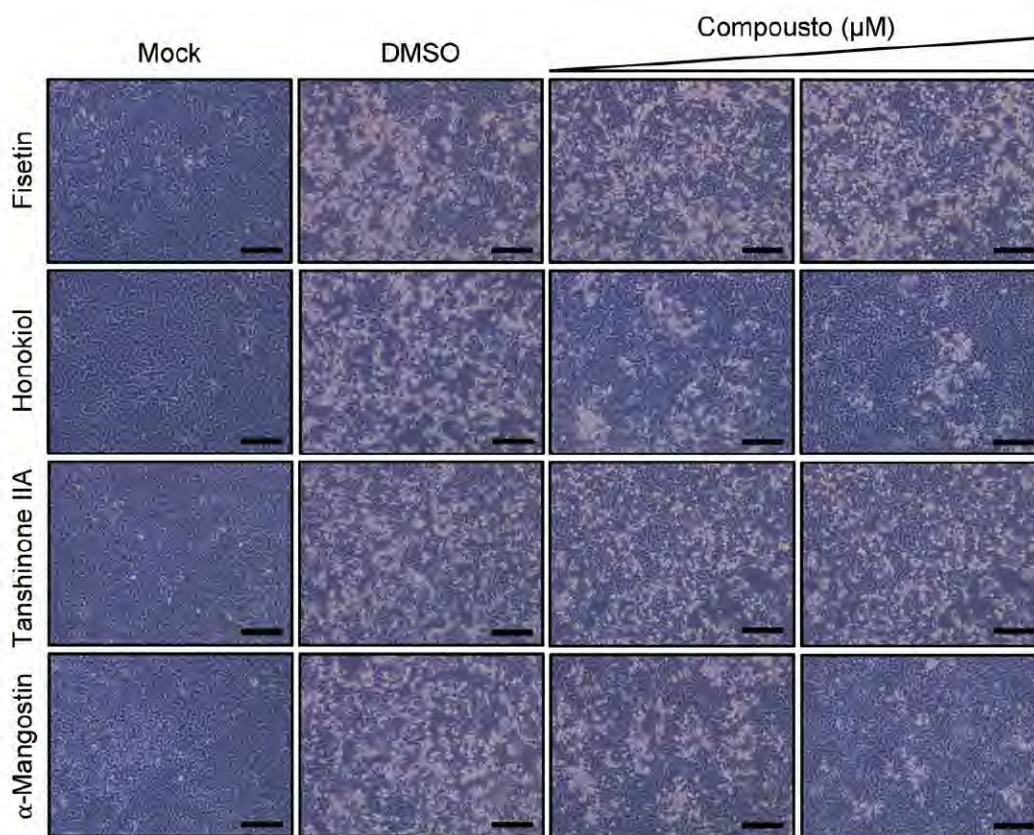


Figura 4. Honokiol y α -Mangostin reducen el ECP inducido por MAYV en células Vero-E6 de manera dependiente de la concentración. Células Vero-E6 fueron infectadas con MAYV (cepa AVR0565, Perú) a una MOI de 1 y posterior a la absorción del virus, tratadas con Fisetin, Tanshinone IIA, Honokiol (a concentraciones de 5 y 10 μ M) o α -Mangostin (1 y 5 μ M). Después de 48 h infección, la morfología celular fue evaluada mediante microscopía. Se muestra una imagen representativa de al menos 10 campos observados en el microscopio. El mock representa las células no infectadas, ni tratadas con los compuestos. La barra en las microfotografías corresponde a una escala de 100 μ m.

3. Honokiol y α -Mangostin promueven una reducción en la replicación de MAYV de manera dependiente de la dosis probada

Debido a que se observó que Honokiol y α -Mangostin protegían a las células del ECP inducido por MAYV, se decidió cuantificar la producción de partículas virales en células infectadas y tratadas o no con cada uno de los cuatro compuestos seleccionados del tamizaje inicial. Para ello, se infectaron células Vero-E6 con MAYV y se trataron con los compuestos a las dosis anteriormente mencionadas, teniendo como control a las células tratadas con DMSO. Al cabo de 24 h de incubación, se recolectaron los sobrenadantes para cuantificar la producción de partículas virales mediante ensayos de titulación de placas y tinción con violeta cristal. Los resultados de este experimento revelaron una clara reducción de los títulos virales de manera dependiente de la dosis de Honokiol y α -Mangostin (Figura 5B, D). Esta disminución oscilaba entre 3 y 4 logaritmos en las células tratadas con la mayor dosis de Honokiol y α -Mangostin. Por otro lado, se observó un efecto modesto, aunque significativo, de alrededor de 1 logaritmo, con Tanshinone IIA, mientras que no hubo efecto con Fisetin (Figura 5A, C). Estos hallazgos, indican que Honokiol y α -Mangostin reducen la producción de partículas de MAYV de manera dependiente de la concentración. Por esta razón, se decidió caracterizar mejor el efecto de estos dos compuestos sobre MAYV y descartar a Fisetin y Tanshinone IIA en los siguientes experimentos.

Debido a que se observó que Honokiol y α -Mangostin protegían a las células del ECP inducido por MAYV, se decidió cuantificar la producción de partículas virales en células infectadas y tratadas o no con cada uno de los cuatro compuestos seleccionados del tamizaje inicial. Para ello, se infectaron células Vero-E6 con MAYV y se trataron con los compuestos a las dosis anteriormente mencionadas, teniendo como control a las células tratadas con DMSO. Al cabo de 24 h de incubación, se recolectaron los sobrenadantes para cuantificar la producción de partículas virales mediante ensayos de titulación de placas y tinción con violeta cristal. Los resultados de este experimento revelaron una clara reducción de los títulos virales de manera dependiente de la dosis de Honokiol y α -Mangostin (Figura 5B, D). Esta disminución oscilaba entre 3 y 4 logaritmos en las células tratadas con

la mayor dosis de Honokiol y α -Mangostin. Por otro lado, se observó un efecto modesto, aunque significativo, de alrededor de 1 logaritmo, con Tanshinone IIA, mientras que no hubo efecto con Fisetin (Figura 5A, C). Estos hallazgos, indican que Honokiol y α -Mangostin reducen la producción de partículas de MAYV de manera dependiente de la concentración. Por esta razón, se decidió caracterizar mejor el efecto de estos dos compuestos sobre MAYV y descartar a Fisetin y Tanshinone IIA en los siguientes experimentos.

Para confirmar los resultados obtenidos previamente con Honokiol y α -Mangostin, realizamos un experimento de inmunofluorescencia en el que infectamos células Vero-E6 y las tratamos con dosis crecientes de estos compuestos o DMSO. Tras 24 h de infección, se tiñó con un anticuerpo que reconoce la proteína E1 del MAYV y se analizaron las células mediante microscopía confocal. En este ensayo, con ambos compuestos se observó una disminución significativa en el número de células positivas para la proteína E1 de MAYV de manera dependiente de la dosis, en comparación a las células tratadas con DMSO (Figura 6A, B). En su conjunto, todos estos resultados indican que Honokiol y α -Mangostin reducen la replicación de MAYV en células Vero-E6.

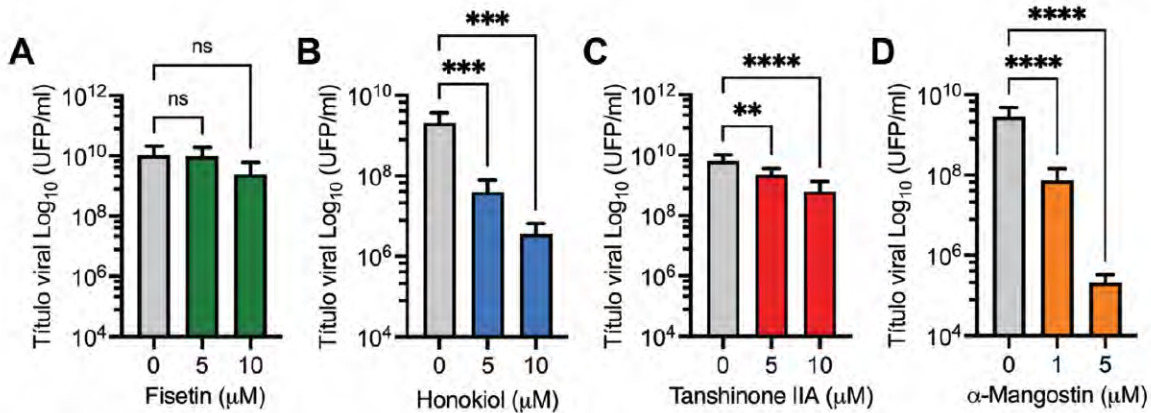


Figura 6. Honokiol y α -Mangostin inhiben la replicación de MAYV en células Vero-E6. Células Vero-E6 fueron infectadas con MAYV (cepa AVR0565, Perú) a una MOI de 1 y después de 1 h de absorción del virus, las células fueron tratadas con Fisetin (A), Tanshinone IIA (B), Honokiol (C) o α -Mangostin (D) durante 24 h. Después, la producción de partículas virales en cada condición experimental se cuantificó mediante la técnica de formación de placas. Los títulos virales se expresaron como unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml). Los datos representan el promedio \pm la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes con tres replicas cada uno. Los datos se analizaron mediante la prueba estadística ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Dunnett. ns: no significativo; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$; **** $p < 0.0001$.

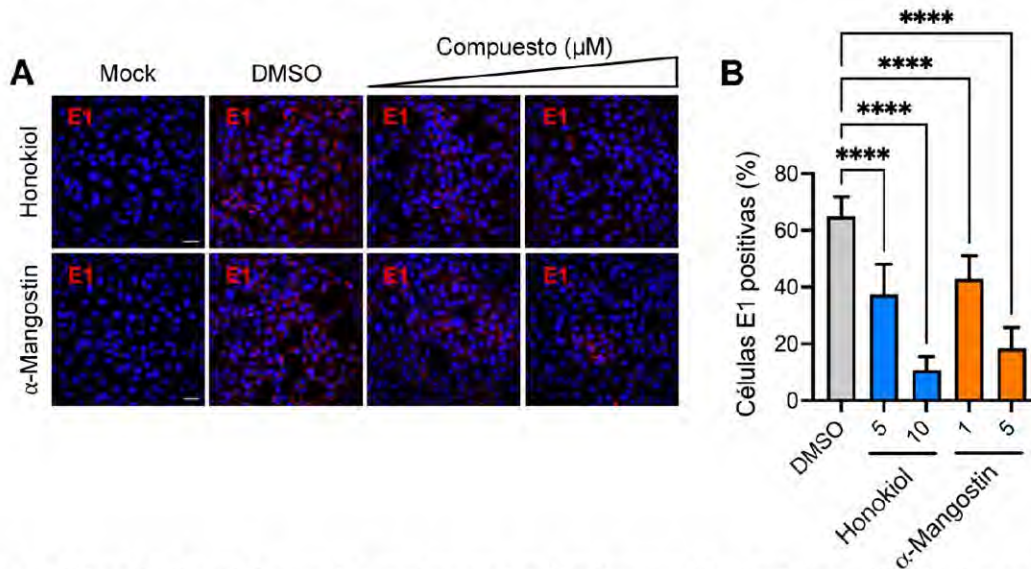


Figura 5. Honokiol y α -Mangostin reducen significativamente el número de células positivas para la proteína E1 del MAYV de manera dependiente de la concentración. (A) Células Vero-E6 crecidas sobre cubreobjetos redondos fueron infectadas con MAYV (cepa AVR0565, Perú) a una MOI de 1 y después tratadas con Honokiol (5 o 10 μ M) o α -Mangostin (1 o 5 μ M). Después de 24 h de infección, las células se tiñeron con un anticuerpo anti-E1, seguido de un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado al fluorocromo Alexa-Fluor-568 (en rojo). Los cristales se colocaron sobre portaobjetos con la ayuda de la solución de montaje Prolong con DAPI, para teñir los núcleos celulares (en azul). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio de fluorescencia confocal. Se muestra una microfotografía representativa de al menos 10 campos distintos. La barra de escala de las microfotografías corresponde a 30 μ m. (B) Cuantificación del número de células positivas para la proteína E1. Los datos se representaron con el % de células positivas y se analizaron con la prueba ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Dunnett. **** $p < 0.0001$.

4. El efecto de Honokiol y α -Mangostin es independiente de la cepa de MAYV utilizada

Al comprobar la reducción que ocasionaba Honokiol y α -Mangostin en la replicación de la cepa de MAYV AVR0565 (Perú), quisimos investigar si este efecto ocurría con otras cepas del virus aisladas en otras regiones geográficas. Para ello, llevamos a cabo la cuantificación de la producción de partículas virales como explicamos previamente, en células Vero-E6 infectadas con las cepas TRVL 4875 (Trinidad y Tobago, 1954) o Guyane (Guyana Francesa, 1996), y posteriormente, tratadas con dosis crecientes de Honokiol o α -Mangostin. En estos experimentos observamos una reducción de los títulos virales estadísticamente significativa con ambas cepas, tanto con Honokiol como con α -Mangostin de manera dependiente de la concentración del compuesto (Figura 7A-D). Esta disminución era de alrededor de 2 a 4 logaritmos dependiendo de la cepa o compuesto probado (Figura 7). Estos resultados indican que Honokiol y α -Mangostin inhiben la replicación de MAYV en células Vero-E6 independientemente de la cepa de virus probada.

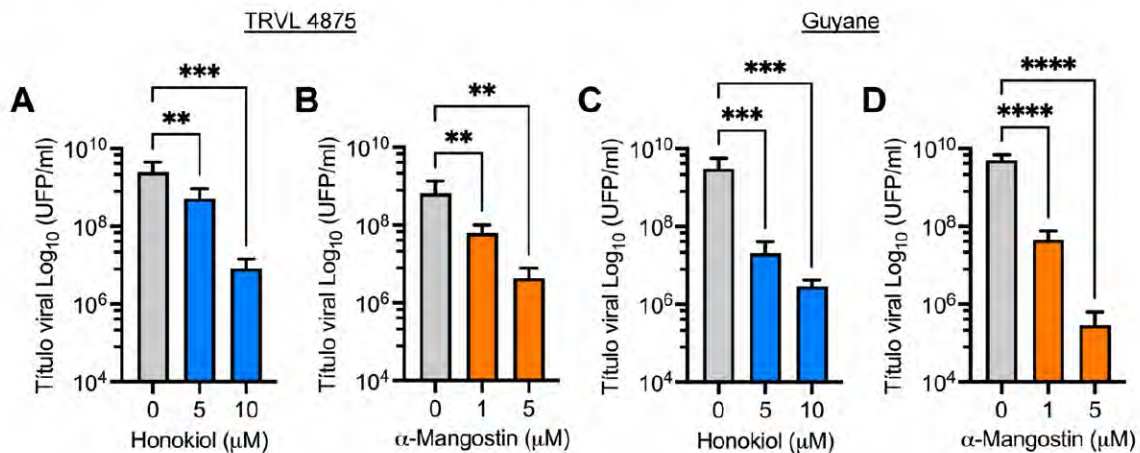


Figura 7. El efecto antiviral de Honokiol y α -Mangostin en células Vero-E6 es independiente de la cepa de MAYV probada. Células Vero-E6 fueron infectadas con las cepas de MAYV TRVL4875 (A, B) o Guyane (C, D), y tratadas con Honokiol o α -Mangostin a las concentraciones indicadas durante 24 h. Después, los títulos virales fueron cuantificados mediante la técnica de formación de placas. Los títulos virales se expresaron como unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml). Los datos representan el promedio \pm la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes con tres réplicas cada uno. Los datos se analizaron con la prueba estadística de ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Dunnett. La significancia estadística se muestra como: ** p < 0.01; *** p < 0.005; **** p < 0.0001.

5. El efecto antiviral de Honokiol y α -Mangostin es independiente de la línea celular humana probada

Todos los experimentos previos se realizaron en células Vero-E6, que son células de mono verde africano. Así, para tener una mayor aproximación al uso de los compuestos como posibles fármacos, decidimos probarlos en células humanas de cáncer de cérvix (HeLa) y en células primarias como los fibroblastos de piel humana (HDFs), dos líneas celulares que han sido validadas previamente en nuestro laboratorio de ser susceptibles a la infección con MAYV (Sugasti-Salazar *et al.*, 2021). Para ello, en primer lugar, evaluamos la toxicidad de los compuestos a las dosis probadas en los ensayos anteriores, mediante el ensayo de MTT. En ambas líneas celulares no se observó una reducción de la viabilidad celular con las dosis utilizadas de Honokiol (Figura 8A, C). No obstante, α -Mangostin presentó una citotoxicidad significativa en las dos líneas celulares en la dosis máxima probada (10 μ M), tal y como habíamos observado con las células Vero-E6, pero muy poco o nada de toxicidad a la dosis de 5 μ M (Figura 8B, D). Para evaluar el efecto de estos compuestos, se procedió a cuantificar la producción de partículas virales en los sobrenadantes de células HeLa o HDFs tratadas con dosis crecientes de los mismos tras 24 h de infección. En estos experimentos, obtuvimos una reducción en la producción de partículas virales de alrededor de 3 logaritmos en las células tratadas con la mayor dosis de Honokiol en ambas líneas celulares, mientras que con α -Mangostin, obtuvimos una reducción de entre 3 y 5 logaritmos en la dosis máxima probada (Figura 8E-H). Todos resultados indican que Honokiol y α -Mangostin reducen la replicación de MAYV independientemente de la línea celular humana probada, pero de manera dependiente de la dosis del compuesto utilizada.

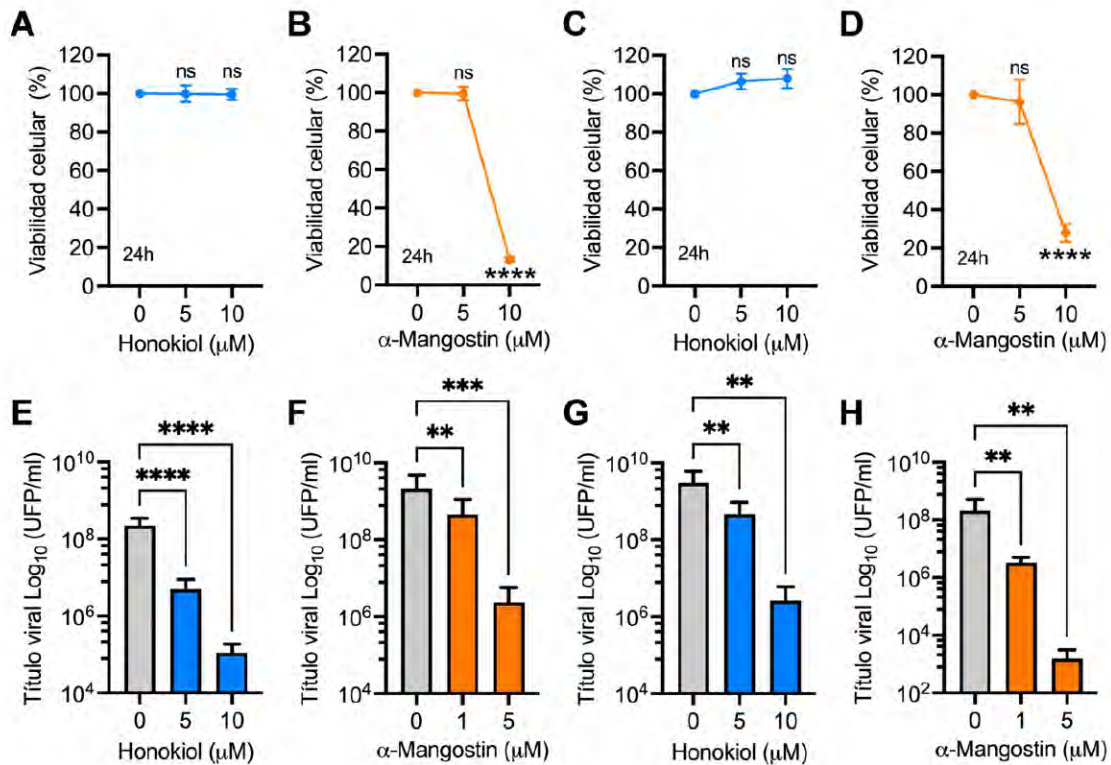


Figura 8. Honokiol y α -Mangostin inhiben la replicación de MAYV en las células humanas HeLa y HDFs. Células HeLa (A, B) o HDFs (C, D) fueron tratadas con las dosis indicadas de Honokiol o α -Mangostin y la viabilidad celular después de 24 h de incubación, se analizó mediante el ensayo de MTT, como explicamos previamente. Células HeLa (E, F) o HDFs (G, H) fueron infectadas a una MOI de 10 o 1, respectivamente. Después de la absorción del virus, las células fueron tratadas con dosis crecientes de Honokiol o α -Mangostin, e incubadas durante 24 h. La producción de partículas virales se cuantificó con la técnica de formación de placas. Los títulos virales se representaron como las unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml). Todos los datos representan el promedio \pm la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes con tres réplicas cada uno. La significancia estadística se muestra como: ns: no significativo ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$; **** $p < 0.0001$.

6. Honokiol y α -Mangostin reducen la expresión de las proteínas virales estructural E1 y no estructural nsP1 de MAYV de manera dependiente de la dosis

Con el objetivo de explorar un posible mecanismo por el cual Honokiol y α -Mangostin reducen la replicación de MAYV, decidimos evaluar la expresión de las

proteínas virales estructural E1 y no estructural nsP1 en células Vero-E6 y HeLa infectadas con el virus y tratadas con dosis crecientes de ambos compuestos. Después de 24 h de incubación, se recolectaron los extractos de proteínas y se analizaron los niveles de E1 y nsP1 mediante inmunoblot o Western-Blot. Los resultados de estos experimentos mostraron una reducción de la expresión de las proteínas virales E1 y nsP1 con ambos compuestos, en ambas líneas celulares, de manera dependiente de la concentración. Estos hallazgos sugieren que Honokiol y α -Mangostin reducen la expresión de las proteínas virales E1 y nsP1 en células Vero-E6 (Figura 9A, B) y HeLa (Figura 9C, D).

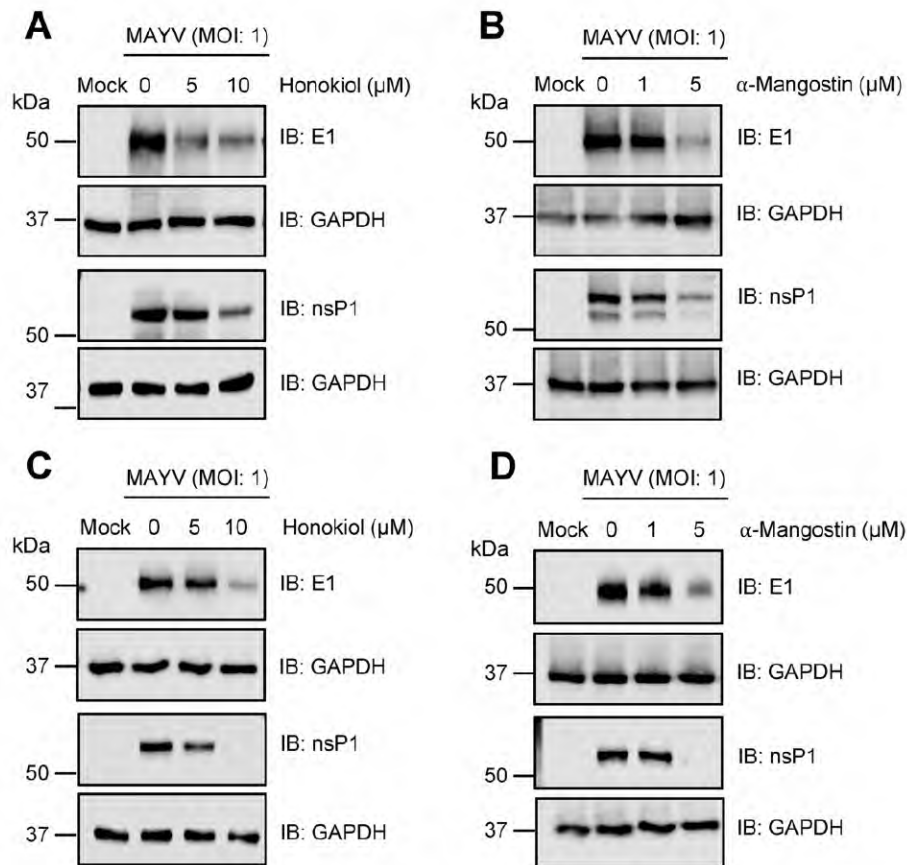


Figura 9. Honokiol y α -Mangostin reducen la expresión de las proteínas virales E1 y nsP1 en las células Vero-E6 y HeLa. Células Vero-E6 (A, B) o HeLa (C, D) fueron infectadas con MAYV como explicamos previamente, y después, tratadas con las dosis indicadas de Honokiol o α -Mangostin durante 24 h. Los extractos de proteínas se analizaron mediante inmunoblot para determinar los niveles de las proteínas E1 y nsP1. Se utilizó la proteína GAPDH como control de carga. Se muestra una imagen representativa de al menos tres experimentos independientes. kDa:

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

Los arbovirus representan una seria amenaza para la salud pública global, debido a que, en las últimas dos décadas, estos patógenos se han expandido a distintas regiones del mundo, provocando importantes epidemias. Este fenómeno es favorecido por la poca vigilancia, falta de prevención, adaptación a nuevos vectores, calentamiento global y factores antropogénicos, como la deforestación, la urbanización y la globalización, que impulsan la expansión de los vectores y a su vez, propician la propagación de estos virus. Las infecciones por MAYV se han reportado principalmente en zonas boscosas o rurales, sin embargo, en los últimos años se han descrito casos en áreas urbanas. Aunado a esto, se demostró mediante estudios experimentales que mosquitos del género *Aedes spp* son susceptibles a la infección por el MAYV y podrían ser vectores competentes para este virus (Marchi, et al., 2018; Langendries et al., 2021).

Estudios estadísticos basados en datos de urbanización, conectividad y cambio climático demuestran la diseminación global de mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, prediciendo la expansión de ambas especies y la saturación de sus nichos ecológicos entre los años 2030 y 2050, de manera que el riesgo de contraer enfermedades transmitidas por estos mosquitos continua en aumento constante (Kraemer *et al.*, 2019). Teniendo en cuenta el riesgo de urbanización y la ampliación hacia áreas no boscosas, el potencial de emerger del MAYV no se debería despreciar, por lo que resulta de importancia el desarrollo de pruebas de diagnóstico específicas, vacunas y tratamientos antivirales que disminuyan la gravedad de la enfermedad y aceleren la eliminación del virus.(Mackay y Arden, 2016; Goh et al., 2020; Pereira et al., 2021)

La búsqueda de antivirales de acción directa puede ser útil ante la amenaza de futuras epidemias, sin embargo, la falta de disponibilidad, efectos secundarios y la aparición de resistencia, dificulta el uso de estos fármacos. En este sentido, la exploración de moléculas de origen natural podría ser una estrategia eficaz para el desarrollo de nuevos fármacos, debido a su diversidad química y estructural, baja toxicidad, eficiencia y bajo costo; de hecho, se ha descrito la utilización de compuestos naturales con propiedades antivirales en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Goh et al., 2020; Thomas et al., 2021).

En este trabajo exploramos el potencial antiviral contra el alfavirus emergente Mayaro, de 6 compuestos naturales obtenidos de distintas plantas del continente Asiático: Sanguinarine, Shikonin, Tanshinone IIA, Fisetin, Honokiol y α -Mangostin. Nuestros resultados de viabilidad celular mostraron que los compuestos Sanguinarine y Shikonin tienen una alta citotoxicidad, por lo que no pudimos evaluarlos como moléculas antivirales. Previamente, otros grupos han descrito que estos compuestos son citotóxicos en varias líneas celulares, en particular, reducen la proliferación celular e inducen apoptosis en células tumorales (Achkar *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020). Los otros 4 compuestos fueron bien tolerados en todas las líneas celulares evaluadas en dosis de 5 o 10 μ M.

Previamente, se ha reportado que el MAYV induce un fuerte ECP en células Vero. Así, decidimos investigar si los compuestos Fisetin, Tanshinone IIA, Honokiol o α -Mangostin protegen las células Vero-E6 del daño inducido por el virus. Estos experimentos revelaron que los compuestos Honokiol y α -Mangostin, previenen el ECP inducido por MAYV de manera dependiente de la dosis de estos compuestos. Por el contrario, Fisetin y Tanshinone IIA no parecen proteger las células del virus. En consecuencia, evaluamos la producción de partículas virales de MAYV en células Vero-E6 tratadas con dosis crecientes de estos compuestos. En estos ensayos encontramos una bajada significativa de los títulos virales de MAYV en las células tratadas con Honokiol o α -Mangostin. En el caso de Tanshinone IIA, observamos una pequeña, aunque significativa reducción de los títulos virales y no observamos un efecto en las células tratadas con Fisetin. El efecto inhibitorio de Honokiol o α -Mangostin fue independiente de las cepas de MAYV utilizadas o de las líneas celulares humana infectadas. Finalmente, observamos que Honokiol y α -Mangostin también reducen la expresión de las proteínas virales E1 y nsP1. En conjunto, estos hallazgos demuestran que Honokiol y α -Mangostin poseen actividad antiviral contra el MAYV.

Estudios anteriores también han descrito la actividad de estos compuestos contra distintos agentes patógenos, entre estos, se encontró actividad antiviral de Honokiol contra los virus de la Hepatitis C (Lan *et al.*, 2012); Hepatitis B (Chen *et*

al., 2012); Dengue tipo 2 (Fang *et al.*, 2015); Reovirus de Carpa Herbívora (Chen *et al.*, 2017); Herpes Simplex 1 (Liu *et al.*, 2019); Influenza (Lin *et al.*, 2019); Norovirus murino, calicivirus felino (Kim, Lim and Chung, 2021); Zika, virus del Oeste del Nilo, virus Usutu (Albentosa-González, Sabariegos, *et al.*, 2021) y un efecto modesto en SARS-CoV-2 (Guo *et al.*, 2021). Nuestros resultados son los primeros en demostrar la actividad de Honokiol contra un alfavirus. Mientras que, con el compuesto α -Mangostin se ha reportado actividad antiviral contra HIV (Vlietinck *et al.*, 1998), DENV 1-4 (Tarasuk *et al.*, 2017; Sugiyanto *et al.*, 2019; Panda *et al.*, 2021) y el CHIKV (Patil *et al.*, 2021).

De acuerdo con los resultados obtenidos, nuestros datos aportan información nueva sobre la actividad antiviral de ambos compuestos. Además, debido a la similitud estructural, sintomática y reactividad serológica cruzada, es probable que estos compuestos también presenten actividad contra otros arbovirus. Estudios previos sugieren que α -Mangostin activa el factor nuclear kappa B (NF- κ B) durante la replicación, bloqueando la unión al receptor, lo cual podría afectar la endocitosis en CHIKV (Patil *et al.*, 2021). Otros posibles mecanismos, podrían ser el efecto virucida y la modulación de la respuesta inmune mediante la activación de genes de respuesta a interferón (Panda *et al.* 2021). Por otro lado, se sugiere que Honokiol podría interactuar con la vía PI3K/Akt afectando así, la entrada del virus (Albentosa-González *et al.*, 2021a; Albentosa-González, *et al.*, 2021b); otro posible mecanismo por el cual Honokiol reduce el título viral del MAYV+ sería mediante la activación de sirtuinas, ya que este lignano bifenol ha demostrado que activa las sirtuina 3 (SIRT-3), que son enzimas que participan en la regulación metabólica de las células, por lo cual podrían regular la expresión génica virus-huésped previniendo la producción de progenie viral (Pillai *et al.*, 2017; Alqarni *et al.*, 2021). Además, se demostró que Honokiol facilita la expresión de genes regulados por interferón para resistir a la infección por el Reovirus de la carpa herbívora (GCRV) en células de riñón de carpa, y de esta manera, la producción de interferón fortalece las respuestas de señalización de la inmunidad innata, por lo cual, aunque este estudio se realizó en peces, no se debe descartar este posible mecanismo (Chen *et al.*, 2017).

Pese a todos los posibles mecanismos mencionados, existen múltiples posibilidades de que estos compuestos naturales actúen sobre otras enzimas, vías de señalización, regulen genes que promuevan inmunidad, afecten la entrada, replicación o la interacción del virus con las proteínas de la célula, entre otros; de manera que, aún queda pendiente determinar el posible mecanismo de acción mediante el cual estos compuestos reducen los títulos virales del MAYV. También hay que mencionar que Honokiol posee un isómero denominado Magnolol, el cual sólo se diferencia por la posición de un grupo hidroxilo, y así, sería interesante probar si este isómero también muestra actividad antiviral contra Mayaro u otros alfavirus (Amblard *et al.*, 2007). A pesar de todos los aspectos positivos, diversos usos, mecanismos de acción y demás, existen factores limitantes en el uso de compuestos de origen natural como el uso de extractos no estandarizados y/o concentraciones *in vitro* demasiado altas que no representan su biodisponibilidad *in vivo*, así como la falta de estudios *in vivo* y ensayos clínicos que validen sus usos terapéuticos (Denaro *et al.*, 2020).

La creciente probabilidad de emergencia y resurgimiento de arbovirus hace imperativo el mejoramiento de las tecnologías y conocimientos eficaces capaces de hacer frente a futuras epidemias transmitidas por vectores, así como muestra la importancia de la divulgación y capacitación al personal de salud sobre arbovirus, programas de control de vectores, el mejoramiento en los sistemas de vigilancia y métodos de detección más específicos al igual que la disponibilidad de medicamentos que ayuden a controlar los síntomas y reducir la replicación viral (Mackay y Arden, 2016).

En resumen, los compuestos de origen natural Honokiol y α -Mangostin fueron capaces de reducir la replicación de las cepas AVR0565, TRVL4875 y Guyane del MAYV, por lo cual estos compuestos podrían ser candidatos para el desarrollo de antivirales contra este virus. Sin embargo, este trabajo se llevó a cabo mediante estudios *in vitro*, por lo que para la exploración del potencial de aplicación se requieren estudios *in vivo* seguido de ensayos clínicos que permitan desarrollar tratamientos antivirales efectivos y seguros.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

1. Los compuestos de origen natural Honokiol, Fisetin, α -Mangostin y Tanshinone IIA presentaron una viabilidad celular mayor al 70% en células Vero E6.
2. Honokiol y α -Mangostin protegen contra el efecto citopático inducido por el MAYV de manera dependiente de la dosis en células Vero E6.
3. Honokiol y α -Mangostin reducen la replicación de MAYV en células Vero-E6.
4. Honokiol y α -Mangostin inhiben la replicación de MAYV en células Vero-E6 independientemente de la cepa de virus probada
5. Honokiol y α -Mangostin reducen la replicación de MAYV independientemente de la línea celular humana probada, pero de manera dependiente de la dosis del compuesto utilizada.
6. Honokiol y α -Mangostin reducen la expresión de las proteínas virales E1 y nsP1 en células infectadas con MAYV.

Recomendaciones

1. Determinar el posible mecanismo de acción mediante el cual estos compuestos reducen los títulos virales del MAYV.
2. Probar si el isómero del Honokiol, Magnolol, también muestra actividad antiviral contra Mayaro u otros alfavirus.
3. Probar un mayor número de compuestos naturales que permitan una mejor representación de estos como posibles antivirales.
4. Incluir compuestos naturales de distintas localidades del país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdelnabi, R. and Delang, L. (2020) "Antiviral Strategies against Arthritogenic Alphaviruses," *Microorganisms*, 8(1365), 1–18. doi:10.3390/microorganisms8091365.
2. Achkar, I.W. *et al.* (2017) "Anticancer potential of sanguinarine for various human malignancies," *Future Medicinal Chemistry*, 9(9), 933–950. doi:10.4155/fmc-2017-0041.
3. Acosta-Ampudia, Y. *et al.* (2018) "Mayaro: an emerging viral threat?," *Emerging Microbes & Infections*, 7(1), 1–11. doi:10.1038/s41426-018-0163-5.
4. Adhikari, B. *et al.* (2021) "Potential roles of medicinal plants for the treatment of viral diseases focusing on COVID-19: A review," *Phytotherapy Research*, 35(3), 1298–1312. doi:10.1002/ptr.6893.
5. Albentosa-González, L., Sabariego, R., *et al.* (2021) "Akt interacts with usutu virus polymerase, and its activity modulates viral replication," *Pathogens*, 10(2), 1–15. doi:10.3390/pathogens10020244.
6. Albentosa-González, L., de Oya, N.J., *et al.* (2021b) "Akt kinase intervenes in flavivirus replication by interacting with viral protein ns5," *Viruses*, 13(5). doi:10.3390/v13050896.
7. Alqarni, M.H. *et al.* (2021) "The Pleiotropic Function of Human Sirtuins as Modulators of Metabolic Pathways and Viral Infections," *Cells*, 10(2), 1–20. doi:10.3390/CELLS10020460.
8. Alves Esposito, D.L. and Lopes da Fonseca, B.A. (2017) "Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil?," *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 21(5), 540–544. doi:10.1016/j.bjid.2017.06.002.
9. Amblard, F. *et al.* (2007) "Synthesis, cytotoxicity, and antiviral activities of new neolignans related to honokiol and magnolol," *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(16), 4428–4431. doi:10.1016/j.bmcl.2007.06.024.
10. Anderson, C.R. *et al.* (1957) "Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, B.W.I.," *The American journal of*

- tropical medicine and hygiene*, 6(6), 1012–1016.
doi:10.4269/AJTMH.1957.6.1012.
11. Arakawa, T. *et al.* (2009) “Antiviral and Virucidal Activities of Natural Products,” *Current Medicinal Chemistry*, 16(20), 2485–2497.
doi:10.2174/092986709788682065.
 12. Auguste, A.J. *et al.* (2015) “Evolutionary and Ecological Characterization of Mayaro Virus Strains Isolated during an Outbreak, Venezuela, 2010,” *Emerging infectious diseases*, 21(10), 1742–1750.
doi:10.3201/EID2110.141660.
 13. Azar, S.R. *et al.* (2020) “Epidemic Alphaviruses: Ecology, Emergence and Outbreaks,” *Microorganisms*, 8(8), 1167.
doi:10.3390/microorganisms8081167.
 14. Barroso, M.M.S. *et al.* (2002) “Mayaro virus infection cycle relies on casein kinase 2 activity,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296(5), 1334–1339. doi:10.1016/S0006-291X(02)02093-4.
 15. Basu, P. and Kumar, G.S. (2016) “Sanguinarine and Its Role in Chronic Diseases,” in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 155–172.
doi:10.1007/978-3-319-41334-1_7.
 16. Bekhit, A.E.D. and Bekhit, A.A. (2014) “Natural antiviral compounds,” in *Studies in Natural Products Chemistry*, 195–228. doi:10.1016/B978-0-444-63281-400007-0.
 17. Bengue, M. *et al.* (2021) “Mayaro Virus Infects Human Brain Cells and Induces a Potent Antiviral Response in Human Astrocytes,” *Viruses*, 13(3), 465. doi:10.3390/v13030465.
 18. Ben-shabat, S. *et al.* (2020) “Antiviral effect of phytochemicals from medicinal plants: Applications and drug delivery strategies,” *Drug Delivery and Translational Research*, 10, 354–367. doi:10.1007/s13346-019-00691-6.
 19. Caicedo, E.-Y. *et al.* (2021) “The epidemiology of Mayaro virus in the Americas: A systematic review and key parameter estimates for outbreak modelling,” *PLOS Neglected Tropical Diseases*. Edited by E. Corrales-Aguilar, 15(6), e0009418. doi:10.1371/journal.pntd.0009418.

20. Camini, F.C. *et al.* (2018) "Antiviral activity of silymarin against Mayaro virus and protective effect in virus-induced oxidative stress," *Antiviral Research*, 158, 8–12. doi:10.1016/j.antiviral.2018.07.023.
21. Campos, D. *et al.* (2020) "Broad Antiviral Activity of Ginkgolic Acid against Chikungunya, Mayaro, Una, and Zika Viruses," *Viruses*, 12(4), 449. doi:10.3390/v12040449.
22. Carrera, J.-P. *et al.* (2020) "Endemic and Epidemic Human Alphavirus Infections in Eastern Panama: An Analysis of Population-Based Cross-Sectional Surveys," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(6), 2429–2437. doi:10.4269/ajtmh.20-0408.
23. Casals, J. and Whitman, L. (1957) "Mayaro Virus: A New Human Disease Agent," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 6(6), 1004–1011. doi:10.4269/ajtmh.1957.6.1004.
24. Chen, H. *et al.* (2012) "Anti-HBV activities of *Streblus asper* and constituents of its roots," *Fitoterapia*, 83(4), 643–649. doi:10.1016/j.fitote.2012.01.009.
25. Chen, X. *et al.* (2017) "Magnolol and honokiol from *Magnolia officinalis* enhanced antiviral immune responses against grass carp reovirus in *Ctenopharyngodon idella* kidney cells," *Fish and Shellfish Immunology*, 63, 245–254. doi:10.1016/j.fsi.2017.02.020.
26. Coelho Ferraz, A. *et al.* (2019) "Virucidal activity of proanthocyanidin against Mayaro virus," *Antiviral Research*, 168, 76–81. doi:10.1016/j.antiviral.2019.05.008.
27. Costa, L. *et al.* (2019) "Antiviral peptides as promising therapeutic drugs," *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(18), 3525–3542. doi:10.1007/s00018-019-03138-w.
28. Denaro, M. *et al.* (2020) "Antiviral activity of plants and their isolated bioactive compounds: An update," *Phytotherapy research: PTR*, 34(4), 742–768. doi:10.1002/PTR.6575.
29. Diagne, C.T. *et al.* (2020) "Mayaro Virus Pathogenesis and Transmission Mechanisms," *Pathogens*, 9(9), 738. doi:10.3390/pathogens9090738.

30. Fang, C.Y. *et al.* (2015) "Honokiol, a Lignan Biphenol Derived from the Magnolia Tree, Inhibits Dengue Virus Type 2 Infection," *Viruses*, 7(9), 4894–4910. doi:10.3390/V7092852.
31. Fros, J. and Pijlman, G. (2016) "Alphavirus Infection: Host Cell Shut-Off and Inhibition of Antiviral Responses," *Viruses*, 8(6), 166. doi:10.3390/v8060166.
32. Ganjian, N. and Riviere-Cinamon, A. (2020) "Mayaro virus in Latin America and the Caribbean," *Revista Panamericana de Salud Pública*, 44(14), 1–11. doi:10.26633/RPSP.2020.14.
33. George, D.R. *et al.* (2014) "Present and future potential of plant-derived products to control arthropods of veterinary and medical significance," *Parasites and Vectors*, 7(1), 1–12. doi:10.1186/1756-3305-7-28.
34. Goh, V.S.L., Mok, C.-K. and Chu, J.J.H. (2020) "Antiviral Natural Products for Arbovirus Infections," *Molecules*, 25(12), 2796. doi:10.3390/molecules25122796.
35. Guo, C. *et al.* (2019) "Pharmacological properties and derivatives of shikonin—A review in recent years," *Pharmacological Research*, 149, 104463. doi:10.1016/j.phrs.2019.104463.
36. Guo, Y. *et al.* (2020) "Honokiol Restores Polymyxin Susceptibility to MCR-1-Positive Pathogens both In Vitro and In Vivo," *Applied and Environmental Microbiology*. Edited by D.W. Schaffner, 86(5), 1–12. doi:10.1128/AEM.02346-19.
37. Guo, Y. *et al.* (2021) "Synthesis and Biological Evaluation of Honokiol Derivatives Bearing 3-((5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)methyl)oxazol-2(3H)-ones as Potential Viral Entry Inhibitors against SARS-CoV-2," *Pharmaceuticals*, 14(9), 885. doi:10.3390/ph14090885.
38. Gutierrez-Orozco, F. and Failla, M.L. (2013) "Biological Activities and Bioavailability of Mangosteen Xanthenes: A Critical Review of the Current Evidence," *Nutrients*, 5, 3163–3183. doi:10.3390/nu5083163.
39. Hotez, P.J. and Murray, K.O. (2017) "Dengue, West Nile Virus, Chikungunya, Zika—and now Mayaro?," *PLOS Neglected Tropical Diseases*. Edited by D.J. Gubler, 11(8), e0005462. doi:10.1371/journal.pntd.0005462.

40. Ibrahim, M.Y. *et al.* (2014) "α-Mangostin from *Garcinia mangostana* Linn: An updated review of its pharmacological properties," *Arabian Journal of Chemistry*, 9(3), 317–329. doi:10.1016/j.arabjc.2014.02.011.
41. Islam, F. *et al.* (2021) "Natural bioactive molecules: An alternative approach to the treatment and control of Covid-19," *International Journal of Molecular Sciences*. Int J Mol Sci, 12638. doi:10.3390/ijms222312638.
42. Jasso-Miranda, C. *et al.* (2019) "Antiviral and immunomodulatory effects of polyphenols on macrophages infected with dengue virus serotypes 2 and 3 enhanced or not with antibodies," *Infection and Drug Resistance*, 12, 1833–1852. doi:10.2147/IDR.S210890.
43. Jin, U.-H. *et al.* (2008) "Tanshinone IIA From *Salvia miltiorrhiza* BUNGE Inhibits Human Aortic Smooth Muscle Cell Migration and MMP-9 Activity Through AKT Signaling Pathway," *Journal of Cellular Biochemistry*, 104, 15–26. doi:10.1002/jcb.21599.
44. Kashyap, D. *et al.* (2019) "Fisetin and Quercetin: Promising Flavonoids with Chemopreventive Potential," *Biomolecules*, 9(5), 174. doi:10.3390/biom9050174.
45. Kim, H., Lim, C.Y. and Chung, M.S. (2021) "Magnolia officinalis and Its Honokiol and Magnolol Constituents Inhibit Human Norovirus Surrogates," *Foodborne pathogens and disease*, 18(1), 24–30. doi:10.1089/FPD.2020.2805.
46. Kraemer, M.U.G. *et al.* (2019) "Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*," *Nature Microbiology*, 4(5), 854–863. doi:10.1038/s41564-019-0376-y.
47. Kumar, M. *et al.* (2016) "Phytoconstituents as apoptosis inducing agents: strategy to combat cancer," *Cytotechnology*, 68(4), 531–563. doi:10.1007/s10616-015-9897-2.
48. Lan, K.-H. *et al.* (2012) "Multiple effects of honokiol on the life cycle of hepatitis C virus," *Liver International*, 32(6), 989–997. doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02621.x.

49. Langendries, L. *et al.* (2021) "Repurposing Drugs for Mayaro Virus: Identification of EIDD-1931, Favipiravir and Suramin as Mayaro Virus Inhibitors," *Microorganisms*, 9(4), 734. doi:10.3390/microorganisms9040734.
50. Levi, L.I. and Vignuzzi, M. (2019) "Arthritogenic Alphaviruses: A Worldwide Emerging Threat?," *Microorganisms*, 7(5), 133. doi:10.3390/microorganisms7050133.
51. Lin, D. *et al.* (2019) "Design, synthesis and biological evaluation of honokiol derivatives as influenza neuraminidase inhibitors," *Journal of Asian natural products research*, 21(11), 1052–1067. doi:10.1080/10286020.2018.1509854.
52. Lin, L.-T., Hsu, W.-C. and Lin, C.-C. (2014) "Antiviral Natural Products and Herbal Medicines," *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 4(1), 24–35. doi:10.4103/2225-4110.124335.
53. Lin, Y.-J. *et al.* (2012) "Fisetin and rutin as 3C protease inhibitors of enterovirus A71," *Journal of Virological Methods*, 182, 93–98. doi:10.1016/j.jviromet.2012.03.020.
54. Liu, S. *et al.* (2019) "Inhibition of Herpes Simplex Virus-1 Replication by Natural Compound Honokiol," *Virologica Sinica*, 34(3), 315–323. doi:10.1007/s12250-019-00104-5.
55. Llamas-González, Y.Y. *et al.* (2019) "A Functional Ubiquitin-Proteasome System is Required for Efficient Replication of New World Mayaro and Una Alphaviruses," *Viruses*, 11(4), 370. doi:10.3390/v11040370.
56. Lopes Marques, C.D. *et al.* (2020) "Arboviruses related with chronic musculoskeletal symptoms," *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 34(4), 101502. doi:10.1016/j.berh.2020.101502.
57. Lorenz, C. *et al.* (2017) "Impact of environmental factors on neglected emerging arboviral diseases," *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(9), pe0005959. doi:10.1371/journal.pntd.0005959.
58. Mackay, I.M. and Arden, K.E. (2016) "Mayaro virus: a forest virus primed for a trip to the city?," *Microbes and infection*, 18(12), 724–734. doi:10.1016/J.MICINF.2016.10.007.

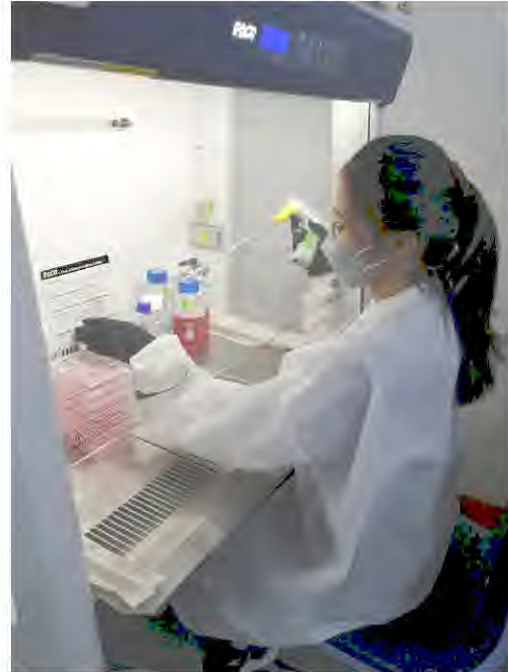
59. Mackraj, I., Govender, T. and Gathiram, P. (2008) "Sanguinarine," *Cardiovascular Drug Reviews*, 26(1), 75–83. doi:10.1111/j.1527-3466.2007.00037.x.
60. Marchi, S., Trombetta, C.M. and Montomoli, E. (2018) "Emerging and Re-emerging Arboviral Diseases as a Global Health Problem," in Md. Anwarul Azim Majumder, Russell, K., and Sayeeda, R. (eds) *Public Health - Emerging and Re-emerging Issues*. London: InTech, 25–46. doi:10.5772/intechopen.77382.
61. Mukherjee, P.K. (2019) "Antiviral Evaluation of Herbal Drugs," in *Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs*. Elsevier, 599–628. doi:10.1016/B978-0-12-813374-3.00016-8.
62. Mota, M., Avilla, C.M. and Nogueira, M.L. (2019) "Mayaro virus: a neglected threat could cause the next worldwide viral epidemic," *Future Virology*, 14(6), 375–377. doi:10.2217/fvl-2019-0051.
63. Organización Panamericana de la Salud and Organización Mundial de la Salud (2019) *Alerta Epidemiológica Fiebre de Mayaro*. Washington, DC. Disponible en: <https://www.paho.org/en/documents/epidemiological-alert-mayaro-fever-1-may-2019>.
64. Pal, H.C., Pearlman, R.L. and Afaq, F. (2016) "Fisetin and Its Role in Chronic Diseases," in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 213–244. doi:10.1007/978-3-319-41334-1_10.
65. Panda, K. *et al.* (2021) "In Vitro Antiviral Activity of α -Mangostin against Dengue Virus Serotype-2 (DENV-2)," *Molecules*, 26(10), 3016. doi:10.3390/molecules26103016.
66. Patil, P. *et al.* (2021) "In vitro and in vivo studies reveal α -Mangostin, a xanthonoid from *Garcinia mangostana*, as a promising natural antiviral compound against chikungunya virus," *Virology Journal*, 18(1). doi:10.1186/s12985-021-01517-z.
67. Pereira, T.N. *et al.* (2020) "Vector competence of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes for Mayaro virus," *PLOS*

- Neglected Tropical Diseases*. Edited by P. Kittayapong, 14(4), e0007518. doi:10.1371/journal.pntd.0007518.
68. Pereira, T.N. *et al.* (2021) “Emergent Arboviruses: A Review About Mayaro virus and Oropouche orthobunyavirus,” *Frontiers in Tropical Diseases*, 2(737436), 1–10. doi:10.3389/fitd.2021.737436.
69. Pillai, V.B. *et al.* (2017) “Honokiol, an activator of Sirtuin-3 (SIRT3) preserves mitochondria and protects the heart from doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice,” *Oncotarget*, 8(21), 34082–34098. doi:10.18632/ONCOTARGET.16133.
70. Rauf, A. *et al.* (2018) “Honokiol: An anticancer lignan,” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 107, 555–562. doi:10.1016/j.biopha.2018.08.054.
71. Sagaya Jansi, R. *et al.* (2021) “Emerging paradigms of viral diseases and paramount role of natural resources as antiviral agents,” *Science of The Total Environment*, 759, 143539. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.143539.
72. Santhi, V.P. *et al.* (2021) “Therapeutic potential of phytoconstituents of edible fruits in combating emerging viral infections.,” *Journal of food biochemistry*, 45(8), e13851. doi:10.1111/jfbc.13851.
73. Santiago, F.W. *et al.* (2015) “Long-Term Arthralgia after Mayaro Virus Infection Correlates with Sustained Pro-inflammatory Cytokine Response,” *PLOS Neglected Tropical Diseases*. Edited by A. Bingham, 9(10), e0004104. doi:10.1371/journal.pntd.0004104.
74. dos Santos, A.E. *et al.* (2014) “Quercetin and quercetin 3-O-glycosides from *Bauhinia longifolia* (Bong.) Steud. show anti-Mayaro virus activity,” *Parasites and Vectors*, 7(1), 1–7. doi:10.1186/1756-3305-7-130.
75. Shaneyfelt, M.E. *et al.* (2006) “Natural products that reduce rotavirus infectivity identified by a cell-based moderate-throughput screening assay,” *Virology Journal*, 3(1), 68. doi:10.1186/1743-422X-3-68.
76. Spindola, K.C.W. *et al.* (2014) “Anti-Mayaro virus activity of *Cassia australis* extracts (Fabaceae, Leguminosae),” *Parasites & Vectors*, 7(1), 537. doi:10.1186/s13071-014-0537-z.

77. Srihongse, S., Stacy, H.G. and Gauld, J.R. (1973) "A survey to assess potential human disease hazards along proposed sea level canal routes in Panamá and Colombia. IV. Arbovirus surveillance in man," *Military Medicine*, 138(7), 422–426.
78. Sugasti-Salazar, M. *et al.* (2021) "Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Impairs Mayaro Virus Replication in Human Dermal Fibroblasts and HeLa Cells," *Viruses*, 13(6), 1156. doi:10.3390/v13061156.
79. Sugiyanto, Z. *et al.* (2019) "Inhibitory Effect of Alpha-Mangostin to Dengue Virus Replication and Cytokines Expression in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells.," *Natural products and bioprospecting*, 9(5), 345–349. doi:10.1007/s13659-019-00218-z.
80. Svensson, F., Norinder, U. and Bender, A. (2017) "Modelling compound cytotoxicity using conformal prediction and PubChem HTS data," *Toxicology Research*, 6(1), 73. doi:10.1039/C6TX00252H.
81. Tarasuk, M. *et al.* (2017) "Alpha-mangostin inhibits both dengue virus production and cytokine / chemokine expression," *Virus Research*, 240, 180–189. doi:10.1016/j.virusres.2017.08.011.
82. Thomas, E. *et al.* (2021) "Plant-Based Natural Products and Extracts: Potential Source to Develop New Antiviral Drug Candidates," *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(20), 6197. doi:10.3390/MOLECULES26206197.
83. Vlietinck, A.J. *et al.* (1998) "Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection," *Planta Medica*, 64(2), 97–109. doi:10.1055/s-2006-957384.
84. Wang, F. *et al.* (2019) "Synthesis, biological function and evaluation of Shikonin in cancer therapy," *Fitoterapia*, 134, 329–339. doi:10.1016/j.fitote.2019.03.005.
85. Wang, F. *et al.* (2020) "Shikonin Inhibits Cancer Through P21 Upregulation and Apoptosis Induction," *Frontiers in Pharmacology*, 11, 861. doi:10.3389/fphar.2020.00861.

86. Wang, M.-H. *et al.* (2017) "Pharmacology of mangostins and their derivatives: A comprehensive review.," *Chinese journal of natural medicines*, 15(2), 81–93. doi:10.1016/S1875-5364(17)30024-9.
87. Wu, Y. *et al.* (2020) "Sanguinarine metabolism and pharmacokinetics study in vitro and in vivo," *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 43(2), 208–214. doi:10.1111/jvp.12835.
88. Ye, H. *et al.* (2020) "Antifungal Activity of Alpha-Mangostin against *Colletotrichum gloeosporioides* In Vitro and In Vivo," *Molecules*, 25(22), 5335. doi:10.3390/molecules25225335.
89. Zhang, R. *et al.* (2018) "Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses," *Nature*, 557(7706), 570–574. doi:10.1038/s41586-018-0121-3.
90. Zhou, X. *et al.* (2020) "α-mangostin attenuates pristane-induced lupus nephritis by regulating Th17 differentiation," *International Journal of Rheumatic Diseases*, 23(1), 74–83. doi:10.1111/1756-185X.13743.

ANEXOS



Anexo 1. Imágenes ilustrativas del trabajo en el laboratorio multiusuarios del Instituto Conmemorativo Gorgas.

XIII CONGRESO ARGENTINO DE VIROLOGÍA 2021

asociación argentina de microbiología aam

SAV Sociedad Argentina de Virología

Certificamos que los siguientes autores
Patricia Valdés; Dalkiria Campos; José González-Santamaría

Presentaron en formato E-POSTER el trabajo denominado
**ACTIVIDAD ANTIVIRAL IN VITRO DE HONOKIOL Y
ALFA-MANGOSTIN CONTRA EL VIRUS MAYARO**

en el **XIII Congreso Argentino de Virología 2021**
VI Simposio de Virología Clínica | IV Simposio de Virología Veterinaria | V Simposio Latinoamericano de Virología Ambiental y Alimentaria
29, 30 de noviembre y 1 de diciembre de 2021 | Modalidad Virtual


Lucía V. Cavallaro
PRESIDENTA SAV


**XIII CONGRESO ARGENTINO DE
VIROLOGIA 2021**


Mariano Pérez Filgueira
PRESIDENTE DEL XII CAV 2021

Anexo 2. Este trabajo fue presentado en el Congreso Argentino de Virología en noviembre del 2021.