



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL
“CARACTERIZACIÓN DE LA INFECCIÓN DEL VIRUS MAYARO EN CÉLULAS
DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y Y EVALUACIÓN DE
ROCAGLATOS COMO AGENTES ANTIVIRALES”

PATRICIA ALEJANDRA VALDÉS TORRES

DIRECTOR DE TESIS

Dr. JOSÉ GONZÁLEZ SANTAMARÍA

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

2024

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

HOJA DE APROBACIÓN

Título de la Tesis

“Caracterización de la infección del virus Mayaro en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y y Evaluación de Rocaglatos como agentes antivirales”

TESIS

Sometida para optar por el título de Magister en Microbiología Ambiental.

Aprobado por:



Dr. José González Santamaría



Dr. Jordi Querol Audi

Dr. Alex O. Martínez T.

Panamá, República de Panamá

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos, por ser mi pilar de apoyo en los momentos más difíciles y celebrar conmigo cada pequeño logro.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y amigos, por siempre creer en mí incluso en los momentos en que yo dudaba de mí misma, son mi fortaleza y mi refugio. Gracias por escucharme en mis momentos de frustración, por sus palabras de aliento y por celebrar conmigo cada pequeño paso a lo largo de este arduo camino.

A mi director de tesis, el Doctor José González Santamaría por las oportunidades brindadas, su confianza en mis capacidades, su paciencia, su orientación y por los valiosos consejos que marcaron el desarrollo de este trabajo.

Al grupo de investigación, por el esfuerzo conjunto, la paciencia y las ideas compartidas. En especial a mis queridas compañeras Paola, Dalkiria y Dalel.

A la Universidad de Panamá y la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT), por el apoyo financiero a través del programa de becas de Postgrado (Convenio UP-SENACYT 014-2021) que hizo posible la realización de este estudio y a mis compañeros de la maestría por hacer este proceso más llevadero.

Nuevamente a la SENACYT, por el financiamiento parcial de esta tesis a través del programa nuevos investigadores (Proyecto APY-NI-2023A-37) y por la oportunidad de realizar parte de este trabajo de investigación en el extranjero gracias al financiamiento de los proyectos de movilidad (MOV-2023-13), contribuyendo así a mi formación profesional como investigadora.

Al Instituto Conmemorativo Gorgas, por brindar el apoyo y acceso a sus instalaciones. Al Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas de la Universidad de Santiago de Compostela y a la Doctora Carmen Rivas y su grupo de laboratorio por el apoyo durante mi estadía en España.

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), quienes financian parcialmente este proyecto de tesis.

Finalmente, a todos los que, directa o indirectamente, han contribuido a mi formación y a la culminación de esta etapa, por enseñarme que los límites solo existen para ser superados. Gracias totales.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS.....	V
ÍNDICE GENERAL	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	XIV
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	4
CAPÍTULO I.....	7
INTRODUCCIÓN Y FUNDAMENTO TEÓRICO	7
Justificación	10
Descripción de la problemática.....	11
1. El virus Mayaro.....	12
1.1. Clasificación y Generalidades.....	12
1.2. Estructura del virión	12
1.3. Análisis filogenéticos.....	13
1.4. Transmisión y vectores	14
1.5. Epidemiología	16
1.6. Patogénesis	18
1.7. Manifestaciones clínicas	18
1.8. Ciclo de replicación viral	19
1.8.1. Internalización	19
1.8.2. Replicación.....	20
1.8.3. Salida	20

Objetivo General	26
Objetivos Específicos	26
Hipótesis	27
CAPÍTULO II	28
METODOLOGÍA	28
Cultivo celular y rocaglatos	29
Virus utilizados.....	29
Diferenciación celular	30
Ensayos de viabilidad celular.....	30
Ensayos de infección viral y efecto citopático (ECP)	31
Ensayo de formación de placas virales	31
Citometría de flujo.....	32
Análisis de proteínas mediante Western blot.....	32
Ensayo de inmunofluorescencia	33
Análisis de la expresión de ARNm por RT-qPCR	33
Análisis estadístico	34
CAPÍTULO III	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
1. Análisis de la viabilidad de las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y y evaluación de la replicación viral de MAYV y UNAV.	36
2. Las células infectadas por el MAYV y el UNAV expresan las proteínas virales E1 y nsP1.....	38
3. Las células diferenciadas con ácido retinoico y factor neurotrófico derivado del cerebro muestran características morfológicas de neuronas maduras y expresan marcadores neuronales.....	39

4. Las células SH-SY5Y diferenciadas a un modelo neuronal maduro e infectadas con MAYV, muestran títulos virales altos y expresan niveles de proteínas virales similares a las células no diferenciadas.	41
5. Evaluación de genes de respuesta inmune mediante RT-qPCR en células diferenciadas y no diferenciadas infectadas con MAYV.....	43
6. Análisis de la citotoxicidad celular de los compuestos derivados de rocaglatos en distintas líneas celulares humanas y determinación de las concentraciones a evaluar.	44
7. Los rocaglatos Zotatifin y CR1-31B reducen la producción de progenie viral de MAYV en distintas líneas celulares humanas de manera dependiente de la dosis probada.....	47
8. El efecto antiviral de Zotatifin es independiente de la cepa del MAYV evaluada.	49
9. Zotatifin reduce la expresión de la proteína estructural de MAYV E1 y la proteína no estructural nsP1.	50
10. El tratamiento con Zotatifin inhibe la infección del MAYV en diferentes etapas del ciclo viral.	51
11. El Zotatifin también disminuye la producción de progenie viral de los arbovirus UNAV y CHIKV dependiente de la dosis.	53
12. Zotatifin también muestra un efecto antiviral contra otros virus de ARN como Influenza A (IAV) y el virus de estomatitis vesicular (VSV).....	53
13. Zotatifin reduce los niveles de las proteínas nucleocápside (NP) de IAV, GFP de VSV y E3L del virus Vaccinia.	57
CAPÍTULO IV	66
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	66
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXOS.....	84

1- Congresos	85
2- Pasantías	87
3- Financiamiento	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de MAYV.	13
Figura 2. Árbol filogenético construido a partir de las 71 secuencias disponibles del genoma completo de MAYV.	14
Figura 3. Ciclo de replicación de MAYV.	16
Figura 4. Manifestaciones clínicas de MAYV.	19
Figura 5. Ciclo de Replicación del virus Mayaro.	21
Figura 6. Estructuras químicas de los compuestos rocaglatos a estudiar en este trabajo.	24
Figura 7. Las células SH-SY5Y son susceptibles a la infección con el MAYV.	37
Figura 8. UNAV también infecta las células SH-SY5Y de manera dependiente del tiempo y de la MOI utilizada.	38
Figura 9. Las células SH-SY5Y infectadas con los virus MAYV y UNAV expresan proteínas virales E1 y nsP1.	39
Figura 10. Proceso de diferenciación neuronal de las células SH-SY5Y.	40
Figura 11. Expresión de marcadores neuronales por células SH-SY5Y diferenciadas.	41
Figura 12. El MAYV replica eficientemente en células diferenciadas como en no diferenciadas.	42
Figura 13. Análisis de los genes de respuesta inmune en células diferenciadas y no diferenciadas.	44
Figura 14. Citotoxicidad de los compuestos de rocaglatos evaluados.	45
Figura 15. Zotatfin protege las células de cultivo primario de fibroblastos de piel humana (HDF's) del efecto citopático inducido por el MAYV.	46

Figura 16. Zotatifin y CR-1-31-B inhiben la replicación de MAYV en células HDF's y HMC3..	48
Figura 17. Zotatifin inhibe la replicación de MAYV en células SH-SY5Y no diferenciadas y diferenciadas..	49
Figura 18. El efecto antiviral de Zotatifin en células HDF's es independiente de la cepa de MAYV probada.....	50
Figura 19. Zotatifin inhibe la expresión de proteínas virales E1 y nsP1 en células HDF's.	51
Figura 20. Zotatifin inhibe la replicación a distintas etapas del ciclo viral de MAYV.	52
Figura 21. Zotatifin inhibe la replicación de CHIKV y UNAV.	53
Figura 22. Zotatifin disminuye el título viral y la intensidad de GFP de IAV en células A549.	55
Figura 23. Zotatifin disminuye el título viral y la intensidad de GFP de VSV en células A549.....	56
Figura 24. Zotatifin inhibe la expresión de las proteínas de NP de IAV y GFP de VSV.	57
Figura 25. Zotatifin inhibe la expresión de las proteínas E3L de VACV.....	58

LISTADO DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AR	Ácido retinoico
ARBOVIRUS	Virus transmitidos por artrópodos
ARN	Ácido ribonucleico
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
BEBV	Virus Bebaru
BSA	Albúmina de suero bovina
CHIKV	Virus Chikungunya
DAA	Drogas de acción directa
DENV	Virus Dengue
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
ECP	Efecto citopático
eIF4A	Factor de iniciación de la traducción eucariota 4A
EMEM	Medio Esencial Mínimo Eagle
GETV	Virus Getah
GFP	Proteína verde fluorescente
HDF's	Células de fibroblastos de piel humana
HDT	Drogas dirigidas al hospedero
HMC3	Células de microglía humana
HPI	Horas postinfección
IAV	virus de la influenza A
IFN α	Interferón alfa
IFN β	Interferón beta
IL-1 β	Interleucina 1 beta
ISG15	Gen 15 estimulante de interferón
Kb	Kilo bases
MAYV	Virus Mayaro

<i>MdMs</i>	Macrófagos humanos primarios derivados de monocitos
<i>Mock</i>	No infectado
<i>MOI</i>	Multiplicidad de infección
<i>MX1</i>	Proteína de unión a GTP inducida por interferón
<i>nsP</i>	Proteína no estructural
<i>ONNV</i>	Virus O'nyong-nyong
<i>OPS</i>	Organización Panamericana de Salud
<i>ORF</i>	Marcos de lectura abiertos
<i>PBS</i>	Disolución salina tamponada con fosfato
<i>RE</i>	Retículo endoplasmático
<i>Roc-A</i>	Rocaglamide-A
<i>RRV</i>	Virus Ross River
<i>RT-qPCR</i>	Reacción en Cadena de la Polimerasa retro transcriptasa cuantitativa
<i>RuV</i>	Virus de la Rubeola
<i>SBF</i>	Suero bovino fetal
<i>SFV</i>	Virus Semliki Forest
<i>SH-SY5Y</i>	Células de neuroblastoma humano
<i>TF</i>	Proteína transframe
<i>TH</i>	Tirosina hidroxilasa
<i>TNFα</i>	Factor de necrosis tumoral alfa
<i>TrKB</i>	Receptor de tropomiosina quinasa B
<i>UFP</i>	Unidades formadoras de placas
<i>UNAV</i>	Virus Una
<i>UTR</i>	Regiones no traducidas
<i>VACV</i>	Virus Vaccinia
<i>VSV</i>	virus de la estomatitis vesicular
<i>WNV</i>	Virus del West Nile
<i>YFV</i>	Virus de la fiebre amarilla
<i>βIIITUB</i>	β -III-Tubulina

RESUMEN

El virus Mayaro (MAYV) es un patógeno emergente transmitido principalmente por mosquitos selváticos. Se ha descrito que MAYV provoca una enfermedad febril caracterizada por artralgias prolongadas, sin embargo, estudios recientes han revelado que MAYV puede infectar eficientemente células del sistema nervioso humano, lo que sugiere un posible riesgo de complicaciones neurológicas.

En este contexto, se evaluó la susceptibilidad de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) como modelo neuronal para caracterizar la infección por MAYV. Los resultados mostraron que MAYV disminuye significativamente la viabilidad de las células SH-SY5Y y provoca un notable efecto citopático en células no diferenciadas. Además, se observó un aumento significativo en la producción de progenie viral independientemente del estado de diferenciación celular. La expresión de las proteínas E1 y nsP1 de MAYV fue evidente en las SH-SY5Y independientemente de su estado de diferenciación celular. Además, se observaron resultados similares para el virus Una, otro alfavirus estrechamente relacionado a MAYV. Por otra parte, se evaluaron genes de respuesta inmune mediante RT-qPCR y se observó un estado antiviral general en células diferenciadas como no diferenciadas. Estos hallazgos confirman que las células SH-SY5Y son altamente susceptibles a la infección por MAYV independientemente de su estado de diferenciación celular, de manera que es capaz de infectar *in vitro*, un modelo neuronal maduro y esto coincide con investigaciones que demuestran que MAYV puede infectar células del cerebro humano. Por lo tanto, seguir investigando la patogénesis de MAYV en el sistema nervioso central puede ser clave para entender cómo actúa el virus en este entorno.

Paralelamente, dada la ausencia de tratamientos específicos contra MAYV, se evaluó el potencial antiviral de los rocaglatos, Rocaglamida A, CR-1-31-B y Zotatifin, compuestos derivados de plantas del género *Aglaia*, conocidos por inhibir el factor de iniciación de la traducción eucariota 4A (eIF4A), esencial para la síntesis proteica viral. Estos hallazgos demuestran que Zotatifin es altamente efectivo, protegiendo las células de los daños inducidos por MAYV y reduciendo significativamente la producción de progenie viral de forma dependiente de la dosis e independientemente de la cepa de MAYV utilizada. Por el contrario, Rocaglamida

A no presentó actividad, y CR-1-31B mostró efectos modestos. Posteriormente, se demostró que Zotatfin reducía la producción de progenie viral de los virus Chikungunya y Una, al igual que redujo la intensidad de la proteína verde fluorescente (GFP) en células infectadas con el virus de la influenza A (IAV) y el virus de la estomatitis vesicular (VSV). Adicionalmente, Zotatfin disminuyó de manera potente la expresión de proteínas virales de MAYV, VSV, IAV y el virus Vaccinia.

En conjunto, este estudio destaca la posible capacidad de MAYV de afectar el cerebro humano y resalta a Zotatfin como un candidato antiviral con potencial para combatir infecciones por distintos virus y lo posicionan como una molécula prometedora en el desarrollo de terapias antivirales.

Palabras claves: MAYV, SH-SY5Y, Zotatfin, antivirales, rocaglatos, eIF4A.

ABSTRACT

The Mayaro virus (MAYV) is an emerging pathogen primarily transmitted by sylvatic mosquitoes. MAYV has been shown to induce a febrile illness characterized by prolonged arthralgia. However, recent studies have demonstrated that MAYV can effectively infect human nervous system cells, indicating a potential risk of neurological complications. In this context, we evaluated the susceptibility of human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) as a neuronal model to characterize MAYV infection. The results showed that MAYV significantly reduced the viability of SH-SY5Y cells and induced a pronounced cytopathic effect in undifferentiated cells. Furthermore, a significant increase in viral progeny production was observed, regardless of the cellular differentiation status. MAYV E1 and nsP1 proteins were expressed in SH-SY5Y cells regardless of their differentiation status. In addition, the expression of immune response genes was assessed through RT-qPCR, which showed a general antiviral state in both differentiated and undifferentiated cells. These results confirm that SH-SY5Y cells, regardless of their differentiation state, are highly susceptible to MAYV infection, demonstrating the virus's ability to infect a mature *in vitro* neuronal model. This finding corroborates previous studies suggesting that MAYV can infect human brain cells. Further research into the pathogenesis of MAYV in the central nervous system is therefore essential to improve our understanding of its behavior in this environment.

Concurrently, in the absence of specific treatments for MAYV, the antiviral potential of the rocaglates, Rocaglamide A, CR-1-31B, and Zotatfin was assessed. These compounds, derived from plants of the genus *Aglaia*, are known to inhibit the eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A), which is essential for viral protein synthesis. The results of our study demonstrate that Zotatfin was highly effective in protecting cells from MAYV-induced damage and in significantly reducing viral progeny production in a dose-dependent manner, irrespective of the MAYV strain used. In contrast, Rocaglamide A showed no observable activity, while CR-1-31B exhibited only modest effects. Further characterization of Zotatfin showed that this rocaglate also demonstrated the ability to reduce viral progeny production of Chikungunya virus and Una virus, as well as the intensity of the green fluorescent protein (GFP) in cells infected with influenza A virus (IAV) and vesicular stomatitis virus (VSV). In

addition, Zotatfin was observed to significantly reduce the expression of viral proteins derived from MAYV, VSV, IAV and Vaccinia virus.

In summary, this study underscores the potential of MAYV to affect the human brain and establishes Zotatfin as a promising antiviral candidate to combat infections caused by various viruses, particularly in the context of the development of broad-spectrum antiviral therapies.

Keywords: MAYV, SH-SY5Y, Zotatfin, antivirals, rocaglates, eIF4A.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y FUNDAMENTO TEÓRICO

En los últimos años, la expansión y aparición a nivel global de los arbovirus (virus transmitidos por artrópodos) ha aumentado de manera exponencial. Varios de estos virus han emergido y reemergido convirtiéndose en responsables de importantes brotes epidémicos, impulsados por factores ambientales, cambios antropogénicos, la deforestación, la pérdida de biodiversidad, la expansión de vectores y las alteraciones genéticas causadas por la alta capacidad de mutación que poseen los virus de ARN (Lorenz et al., 2017). Esta variedad de aspectos facilita su adaptación a un amplio número de vectores y los convierte en una amenaza emergente para los sistemas de salud pública, lo que a su vez incrementa su relevancia en regiones tropicales, convirtiendo a países en vías de desarrollo en donde la vigilancia epidemiológica y los recursos para el control de brotes suelen ser limitados, en zonas de mayor riesgo (Caicedo et al., 2021; Lopes Marques, Ranzolin, Cavalcanti, y Branco Pinto Duarte, 2020).

Los *Alfavirus* son un género de arbovirus que pertenece a la familia *Togaviridae*. Los virus de este género son virus envueltos de ARN monocatenario con polaridad positiva y genomas que varían entre 10 a 12 kilo bases (kb) de longitud (Fros y Pijlman, 2016). Se distribuyen globalmente y se clasifican en *Alfavirus* del viejo y del nuevo mundo. Los *Alfavirus* del nuevo mundo se caracterizan por causar encefalitis, mientras que los del viejo mundo causan principalmente síntomas reumáticos, por lo que se les llama *Alfavirus* artritogénicos (Levi and y Vignuzzi, 2019).

Los *Alfavirus* artritogénicos se agrupan dentro del complejo serológico de Semliki Forest, dentro del cual se encuentran los virus: Mayaro (MAYV), Chikungunya (CHIKV), Una (UNAV), Bebaru (BEBV), Getah (GETV), O'nyong-nyong (ONNV), Ross River (RRV) y Semliki Forest (SFV); estos virus comparten sitios antigénicos comunes y producen síntomas similares (Abdelnabi and y Delang., 2020)

El MAYV es el agente causal de la fiebre de Mayaro, esta enfermedad se caracteriza por producir síntomas inespecíficos, entre los más comunes están 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). Adicionalmente, el MAYV es capaz de causar algunas complicaciones graves como miocarditis, poliartritis crónica incapacitante que puede persistir por meses o años y también, se ha demostrado que tiene la capacidad de infectar células del cerebro (Acosta-Ampudia et al., 2018; Bengue et al., 2021; Campos et al., 2024). Al igual que MAYV, otros arbovirus como Dengue (DENV) y CHIKV, producen síntomas parecidos, por lo que es posible que, al ser estos virus más prevalentes que MAYV, este virus sea mal diagnosticado y no se estén reportando los casos reales (de Souza Costa et al., 2019)

MAYV posee un ciclo de transmisión principalmente enzoótico a través de la picadura de mosquitos del género *Haemagogus* spp. (Azar et al., 2020), el cual se aisló por primera vez en Trinidad y Tobago en 1954 a partir de muestras de sangre de trabajadores forestales, desde entonces, ha sido responsable de pequeños brotes en Centro y Suramérica (Casals and Whitman 1957; Acosta-Ampudia et al., 2018; Casals and Whitman, 1957).

En los últimos años distintos reportes de casos demuestran que MAYV está ampliando su circulación tanto en poblaciones humanas como en hospederos selváticos en Latinoamérica y el Caribe (Ganjan and y Riviere-Cinamond, 2020). Se han desarrollado modelos matemáticos que predicen que los mosquitos vectores de arbovirus tienen tendencia a la expansión de su distribución. Además, hay evidencias de que siguen ocurriendo casos de infecciones por alfavirus, pero han pasado desapercibidas por los sistemas de vigilancia de la región latinoamericana (Carrera et al., 2020; Iwamura, Guzman-Holst, y Murray, 2020).

Pese a que el MAYV es considerado un patógeno emergente, se siguen desconociendo muchos aspectos de la enfermedad que causa, su biología, secuelas, medios de transmisión y factores de riesgo, además, no existen vacunas ni antivirales aprobados contra este virus. Se ha comprobado que el virus del Chikungunya, perteneciente al mismo complejo serológico que MAYV, puede causar complicaciones neurológicas y provocar apoptosis neuronal. Sin embargo, en el caso del MAYV existe poca información sobre su capacidad para infectar el cerebro, en tal sentido, es de interés dilucidar si este virus posee neurotropismo y encontrar moléculas que funcionen como antivirales, por lo que, en este trabajo se

utilizaron células de neuroblastoma humano SH-SY5Y como modelo neuronal para caracterizar la infección causada por el MAYV y, además, se evaluó el uso de rocaglatos como posibles agentes antivirales contra MAYV.

Justificación

La expansión y emergencia de los arbovirus ha incrementado rápidamente en los últimos años a nivel global. Virus de ARN como el MAYV presentan una elevada tasa de mutación, lo que acelera su evolución y les permite adaptarse a una amplia variedad de vectores y huéspedes (Gould, Pettersson, Higgs, Charrel, y de Lamballerie, 2017). Esta capacidad de adaptación los convierte en una amenaza creciente para la salud pública, especialmente en países en desarrollo. Este panorama subraya la necesidad de intensificar la investigación sobre la biología de los arbovirus, la búsqueda de antivirales o posibles tratamientos, el mejoramiento de las estrategias de control de vectores y fortalecer los sistemas de vigilancia epidemiológica para anticipar y mitigar futuros brotes (Figueiredo and y Figueiredo, 2014).

A pesar de que el MAYV representa un potencial problema de salud pública, es un virus desatendido y, actualmente, se conoce poco sobre su patogénesis y no existen vacunas aprobadas 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 (Esposito and y Fonseca, 2017a; Ganjian and y Riviere-Cinamond, 2020; O Mota et al., 2019).

Además, estudios *in vitro* demuestran que mosquitos urbanos como *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, son capaces de transmitir este virus con eficacia (Pereira, Carvalho, De Mendonça, Rocha, y Moreira, 2020), 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 y Murray, 2017).

Descripción de la problemática

Las neuronas son responsables de transmitir respuestas sensoriales y motoras al organismo y, a su vez, mantienen la homeostasis del sistema nervioso y median respuestas inmunes. Debido a esto, la degeneración, trauma o disfunción de estas células puede causar trastornos del sistema nervioso central que podrían llegar a ser peligrosos para el ser humano (Dravid et al., 2021; Singh et al., 2021; Vazquez and y Jurado, 2022).

Aunado a esto, existe la necesidad de identificar nuevos tratamientos antivirales capaces de combatir las infecciones por arbovirus como MAYV y los productos naturales tienen gran potencial para este fin. Se sabe 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 (Goh, Mok, y Chu, 2020; Santhi et al., 2021; Shaneyfelt, Burke, Graff, Jutila, y Hardy, 2006).

Comprender la estructura del virus, los mecanismos o rutas que utiliza para secuestrar la maquinaria celular, su tropismo y las interacciones con los hospederos, es un paso clave para enfrentarnos eficazmente contra nuevos brotes o epidemias (Diagne et al., 2020; Srichawla et al., 2024). Este conocimiento permite, no solo anticipar y prevenir la propagación de la enfermedad, sino también acelerar el desarrollo de tratamientos terapéuticos y profilácticos mediante la identificación de agentes antivirales específicos (Hotez and y Murray, 2017). Además, proporciona las bases para diseñar estrategias integrales que minimicen los posibles efectos nocivos del virus, protegiendo así la salud pública de manera más efectiva (Dos Santos et al., 2014; Levi y Vignuzzi, 2019; Lopes Marques et al., 2020)

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. El virus Mayaro

1.1. Clasificación y Generalidades

El virus Mayaro (MAYV) es un virus emergente transmitido por artrópodos (arbovirus) que pertenece a la familia *Togaviridae* y al género *Alfavirus*. MAYV es un virus de ARN envuelto de cadena simple con polaridad positiva con un tamaño alrededor de 70 nm de diámetro y un genoma que consta de aproximadamente 11.5 kilobases (kb) de longitud (Diagne et al., 2020). El MAYV pertenece al complejo serológico de Semliki Forest junto a otros siete virus (CHIKV, UNAV, BEBV, GETV, ONNV, RRV y SFV). Estos virus son bastante similares entre sí debido a que comparten sitios antigénicos comunes que generan reactividad cruzada y, además, producen síntomas similares, lo que dificulta un diagnóstico apropiado (Fumagalli et al., 2021; dos Santos Souza Marinho et al., 2022).

MAYV fue identificado por primera vez a partir de muestras de suero de trabajadores forestales que presentaban síntomas febriles en el Condado de Mayaro en Trinidad y Tobago en 1954, de allí se deriva su nombre. Posteriormente, fue caracterizado por Casals y Whitman en 1957, no obstante, en estudios retrospectivos se ha evidenciado la presencia de este virus durante la construcción del Canal de Panamá entre 1904 y 1914, y desde entonces ha sido responsable de distintos brotes en el continente americano. Sin embargo, MAYV es un arbovirus que ha sido poco estudiado, por lo que el conocimiento sobre su biología y patogénesis es limitado (Anderson et al., 1957; Caicedo et al., 2021; Casals and Whitman, 1957; Srihongse et al., 1973).

1.2. Estructura del virión

El MAYV es un virus envuelto de ARN con cápside icosaédrica, posee dos marcos de lectura abiertos (ORF): el ORF 5' proximal, que codifica para las 4 proteínas no estructurales (nsP) que llevan a cabo la síntesis de ARN viral en las células hospederas (nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4), estas proteínas se sintetizan en la fase temprana del proceso de replicación; y el ORF 3' proximal, que codifica para la poliproteína que origina las proteínas estructurales que permiten el ensamblaje viral

en el hospedero luego de la replicación: la proteína de la cápside (C), las glicoproteínas de envoltura (E1 y E2), los polipéptidos (E3, 6k) y la proteína transframe (TF) implicada en la gemación viral y factor de virulencia (Andreolla et al., 2022; Esposito and Fonseca, 2017a) (Figura 1).

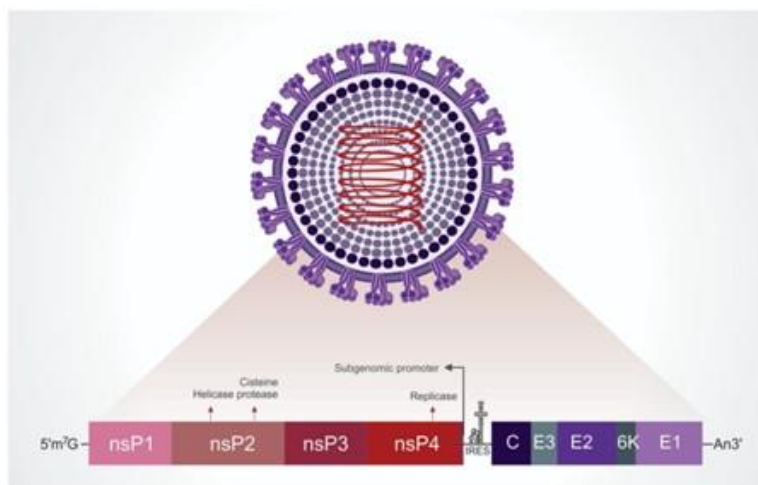


Figura 1. Estructura de MAYV. Diagrama en el que se observa la partícula de MAYV y su organización genómica. Imagen tomada de (Andreolla et al., (2022), doi: <https://doi.org/10.3390/v14081787>.

1.3. Análisis filogenéticos

El MAYV se agrupa en tres genotipos D (Disperso), L (Limitado) y N (Nuevo), donde el genotipo D es el de mayor distribución geográfica, y ha sido reportado en Brasil, Guyana Francesa, Bolivia, Perú, Surinam, Trinidad y Tobago, Argentina, Colombia y Venezuela; el genotipo L, reportado en Brasil y Haití, mientras que el genotipo N solo ha sido reportado en Perú y Venezuela (Auguste et al., 2015; Pereira, Virginio, Souza, y Moreira, 2021).

Existen pocos estudios filogenéticos sobre el MAYV, hasta el año en curso solo se han reportado 71 secuencias genómicas completas en GenBank recolectadas entre los años 1954 y 2016. Estas secuencias comparten ancestros comunes y exhiben proximidad filogenética, lo que sugiere circulación sostenida del virus. Además, investigadores de Brasil demostraron que estas secuencias del genoma completo de MAYV están bajo presión de selección negativa y positiva,

persona infectada durante la etapa virémica, adquieren el virus y pueden transmitirlo a otros humanos en las siguientes picaduras (Diagne et al., 2020) (Figura 3).

Los vectores primarios de MAYV son los mosquitos *Haemagogus janthinomys*, sin embargo, este virus también ha sido aislado de otros géneros de mosquitos incluyendo *Culex*, *Mansonia*, *Psorophora*, *Coquilleltidia*, *Aedes* y *Sabethes* en países como Trinidad y Tobago, Panamá, Colombia y Brasil (Diagne et al., 2020). También, se han realizado ensayos de laboratorio que demuestran la competencia eficiente de mosquitos antropofílicos para transmitir el MAYV, donde se ha reportado competencia vectorial de mosquitos del género *Aedes*, entre los que se encuentra el mosquito vector de virus del Dengue, el *Aedes aegypti*, y varias especies de *Anopheles* spp., asimismo, otros estudios han alertado de que mosquitos autóctonos de Europa como *Aedes albopictus* y *Anopheles atroparvus* son vectores competentes para MAYV (Brustolin et al., 2024; Pereira et al., 2020).

Hay evidencia de la transmisión de MAYV en distintos animales, siendo los primates no humanos y mamíferos pequeños sus hospederos primarios, el virus también infecta a humanos y se ha aislado de otros reservorios como marsupiales, roedores, reptiles y aves (Azar, Campos, Bergren, Camargos, y Rossi, 2020; Diagne et al., 2020).

La variedad de vectores competentes, tanto en América como en otras regiones, que se han descrito durante los últimos años en condiciones de laboratorio pone en evidencia la considerable plasticidad de MAYV en cuanto a especies de vectores permisivas, lo que resulta preocupante si se tiene en cuenta que, estos posibles vectores mantienen una diversa cantidad de animales dentro de sus hábitos alimenticios, la vigilancia entomológica es limitada, la tendencia al aumento de arbovirus emergentes y reemergentes, los cambios antropogénicos a nivel global y el aumento de las temperaturas. Todo esto, nos alerta de la posibilidad de que MAYV se adapte a nuevos vectores y pueda emerger en ciclos de transmisión urbanos, además, pone de manifiesto el potencial de propagación que puede tener el MAYV y otros arbovirus (Azar et al., 2020; Brustolin et al., 2024; Iwamura et al., 2020; Lorenz et al., 2017; Pereira et al., 2021).

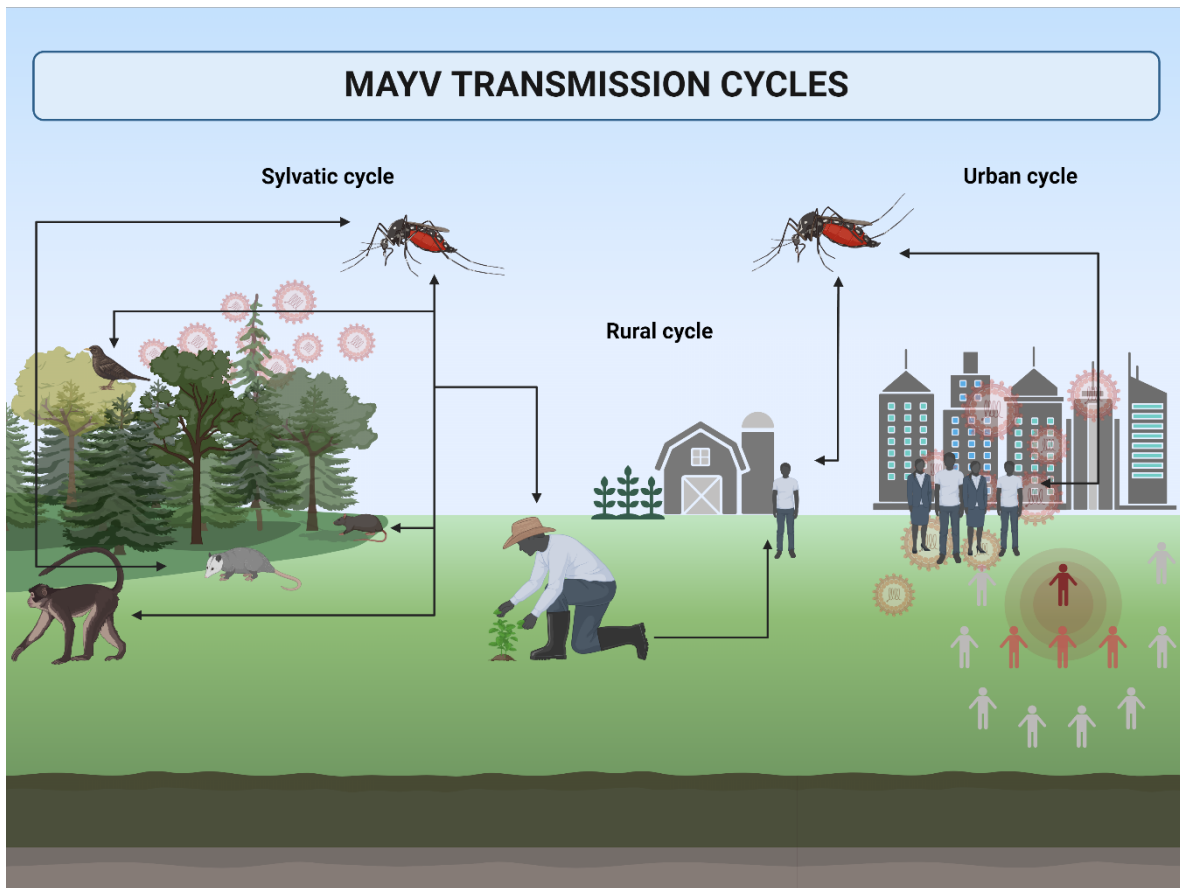


Figura 3. Ciclo de replicación de MAYV. Figura creada por Patricia Valdés con BioRender.

1.5. Epidemiología

Desde que se aisló por primera vez, el MAYV ha seguido circulando en distintas regiones tropicales y ha sido responsable de varios brotes en Centro y Suramérica, principalmente relacionados con zonas selváticas. Además, en los últimos años, se han presentado una mayor cantidad de casos en regiones no endémicas y se ha detectado el virus en una mayor cantidad de países con casos aislados o pequeños brotes (Caicedo et al., 2021; Esposito and y Fonseca, 2017a; Ganjian and Riviere-Cinnamond, 2020; Pereira et al., 2021).

Según 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. La mayoría de los datos reportados se basan en pruebas serológicas, y conociendo la existencia de la elevada reactividad

cruzada con otros alfavirus, es probable que muchos casos no hayan sido reportados o diagnosticados erróneamente con otros virus similares (Ganjan and y Riviere-Cinamond, 2020).

Según los datos publicados, han ocurrido siete brotes de MAYV con evidencia en Brasil, Bolivia y Venezuela; el primer brote se registró en 1955 en Belém, en el estado de Pará-Brasil; luego ocurrió un brote en Bolivia, al cual se denominó “Uruma virus” durante el mismo año, a continuación, se descubrió que Uruma era otra cepa del MAYV y no un virus diferente, durante este brote el MAYV se identificó como el virus causante de entre el 10-15% de 192 casos (Azar et al., 2020). Posteriormente, ocurrió otro brote entre 1977 y 1978 en otra comunidad rural del estado de Pará en Brasil, en este brote se infectó cerca del 20% de la población; después, 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. Posteriormente, en el 2010 se reportó 25% de casos positivos para MAYV de 77 casos analizados en el estado de Portuguesa en Venezuela (Caicedo et al., 2021).

Igualmente, existen estudios de seroprevalencia y reportes de casos humanos confirmados y/o presuntivos de MAYV en países como Surinam (1964), Ecuador (1997), Guyana Francesa (1998), Venezuela (2000), Bolivia y Perú (2000-2007), México (2001), Perú (2010-2013), Haití (2015) y Colombia (2020-2023) (Acosta-Ampudia et al., 2018; Azar et al., 2020; Hozé et al., 2020; Perez-Restrepo et al., 2024). Varios de estos reportes mencionan la co-circulación de MAYV en conjunto con CHIKV y DENV.

También, se han reportado casos importados en otras regiones como 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) (Ganjan and y Riviere-Cinamond, 2020).

Existen estudios in vivo que sugieren que la expansión de MAYV en Latinoamérica se ha limitado por la inmunidad colectiva que han generado las epidemias causadas por CHIKV entre 2013 y 2015 (Webb et al., 2019). Además, se

relaciona a MAYV con el virus de la fiebre amarilla (YFV) debido a su similitud geográfica, patogénesis, epidemiología, reservorios y vector, estas características sirven de indicador del comportamiento del virus, por lo que se piensa que MAYV podría comportarse de manera similar a YFV, y teniendo en cuenta los efectos que tuvo la fiebre amarilla, no se debe obviar la probabilidad de emergencia de este patógeno (Caicedo et al., 2021).

1.6. Patogénesis

El MAYV infecta al mosquito a nivel del intestino medio, esto da como resultado una infección persistente que no afecta ni produce pérdida de aptitud en los mosquitos (Fros and y Pijlman, 2016). Luego de la inoculación subcutánea producida por la picadura del mosquito infectado, el virus se replica en la piel, pasa a través de los vasos sanguíneos del hospedero y se replica en los glóbulos blancos, la sangre transporta los viriones a los órganos diana, el hígado y el bazo, donde se produce una mayor replicación viral, contribuyendo a la diseminación del virus a los huesos, músculos y tejidos de las articulaciones (Acosta-Ampudia et al., 2018; Diagne et al., 2020).

1.7. Manifestaciones clínicas

El virus Mayaro es el agente causal de la fiebre de Mayaro, esta enfermedad presenta un cuadro clínico similar a otros virus, se caracteriza por presentar fiebres abruptas, que pueden durar hasta 10 días y es capaz de reaparecer luego de la hipertemia; mialgias, erupciones cutáneas, dolor retro ocular, escalofríos, mareos, manifestaciones gastrointestinales, anorexia, edemas articulares, dolor abdominal, leucopenia y artralgias (Diagne et al., 2020; Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud, 2019) (Figura 4). Aunque el MAYV generalmente causa una enfermedad no fatal e inespecífica, también se han reportado casos relacionados con manifestaciones graves como miocarditis, hemorragias, encefalitis y secuelas del sistema nervioso (Acosta-Ampudia et al., 2018; Navarrete-Espinosa and y Gómez-Dantés, 2006)

Su periodo de incubación varía de 1 a 12 días y su fase clínica generalmente se divide en dos etapas: aguda y subaguda. La etapa aguda posee una viremia transitoria de 3 a 5 días y la subaguda dura de los 7 a los 12 días, y es donde se presentan los síntomas más importantes (Acosta-Ampudia et al., 2018). Este patógeno causa una enfermedad incapacitante y en más del 50% de los casos suelen dejar como secuela importantes artralgias de larga duración que pueden persistir de meses a años, lo que indica que la fiebre de Mayaro es más debilitante que las infecciones ocasionadas por los flavivirus dado la duración de los síntomas (Diagne et al., 2020).

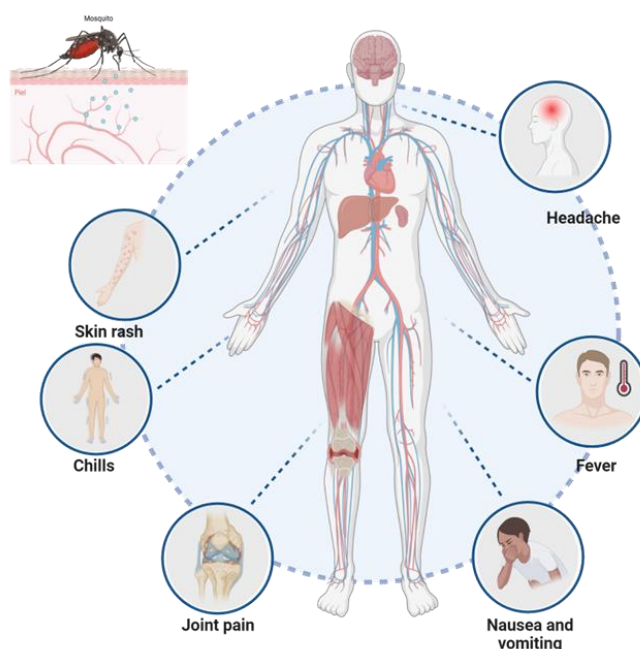


Figura 4. Manifestaciones clínicas de MAYV. Órganos susceptibles y síntomas producidos por el virus. Creado por Patricia Valdés con BioRender.

1.8. Ciclo de replicación viral

1.8.1. Internalización

El ciclo de vida de MAYV comienza cuando la envoltura viral se fusiona a la membrana plasmática de la célula diana a través de los receptores de superficie, entre los que se encuentra la proteína MXRA8, la unión de los viriones al receptor celular es mediada por la proteína E2 (R. Zhang et al., 2018). Posteriormente, el virión entra a la célula por endocitosis a través de una vesícula de clatrina o

alternativamente de caveola, y ya dentro del citoplasma, se forma un endosoma en el que disminuye el pH, debido a la presencia de bombas de protones dependientes de ATP, se libera la nucleocápside viral, el virus se desensambla y, en consecuencia, libera su ARN genómico al desarmar su estructura (Diagne et al., 2020) (Figura 5).

1.8.2. Replicación

El ARN se traduce a proteínas no estructurales (nsP) que forman un complejo de replicación, el cual cataliza la síntesis de ARN de la hebra de sentido negativo, que a su vez se utiliza como plantilla para la síntesis de ARN genómico (49S) y ARN subgenómico (26S) (Diagne et al., 2020). El ARN subgenómico funciona como ARN mensajero para producir proteínas estructurales (sP), la primera proteína estructural que se genera es la proteína de la cápside (C), que se libera por su actividad auto proteasa, la poliproteína restante que comprende los precursores de las glicoproteínas E3-E2-6K-E1 que se procesan en el Retículo Endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi (AG), las proteínas C interactúan con el ARN genómico para encapsidar el genoma y formar nucleocápsides (Abdelnabi and y Delang, 2020; Andreolla et al., 2022).

Un cambio de marco de lectura en el gen que codifica a la proteína 6k puede producir la proteína Transframe (TF) en vez de la 6K; estas proteínas poseen una porción N-terminal idéntica, pero cambian en la porción C-terminal (Andreolla et al., 2022).

1.8.3. Salida

Los componentes virales se ensamblan y las nucleocápsides son transportadas a la membrana plasmática, luego adquieren la envoltura con glicoproteínas virales a través de la gemación con la membrana del hospedero, y forman los viriones que se liberan al exterior, estas partículas virales infectan otras células y se repite el ciclo (Abdelnabi and y Delang, 2020).

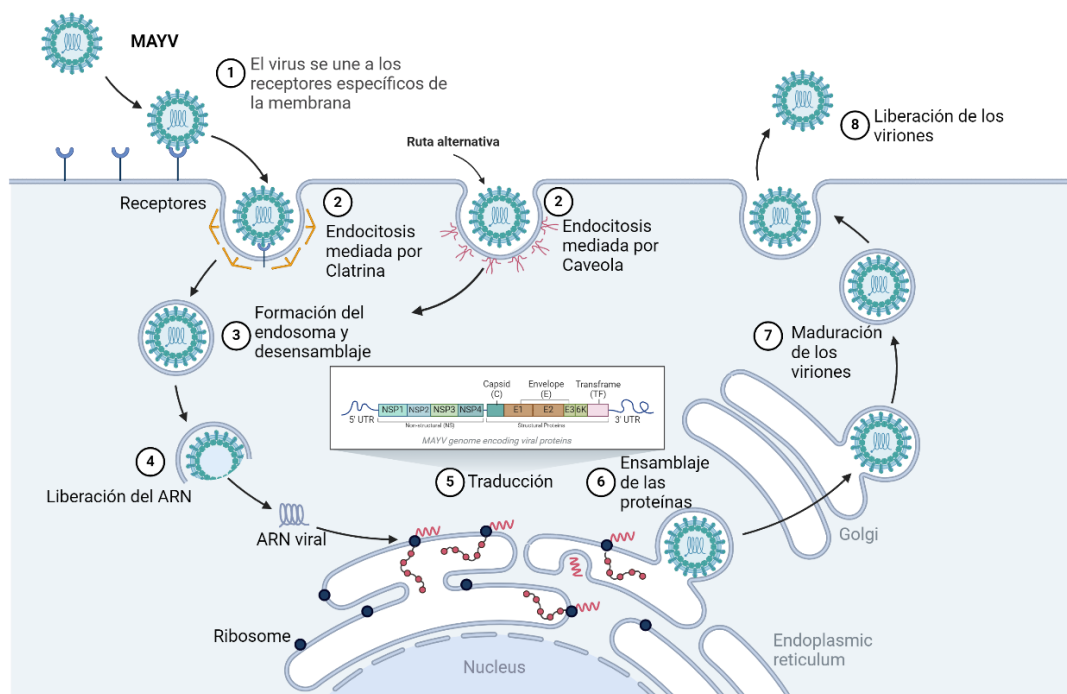


Figura 5. Ciclo de Replicación del virus Mayaro. Creado por Patricia Valdés con BioRender.

2. Células SH-SY5Y

La línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y es un subclon derivado de la línea parental SK-N-SH. Esta se generó en 1970 a partir de una biopsia de tumor en la médula ósea. Estas células se subclonaron primero a SH-SY, luego a SH-SY5 y, por último, este subclon SH-SY5Y se almacenó en la ATCC en 1970 (Kovalevich and y Langford, 2013). Las células SH-SY5Y poseen dos morfologías: células similares a neuroblastos “tipo N” y células similares a epiteliales “tipo S”, y los cultivos se caracterizan por incluir células viables tanto adherentes como flotantes. Esta línea celular ha sido ampliamente utilizada como modelo *in vitro* para estudios neurológicos, así como estudios de neurodegeneración, neuro traumatismo y neurotoxicidad (Dravid et al., 2021).

Las células SH-SY5Y se pueden diferenciar en un fenotipo neuronal maduro caracterizado por marcadores neuronales mediante distintos métodos, siendo el método del ácido retinoico (AR) el más utilizado (Kovalevich and y Langford, 2013).

La exposición secuencial de esta línea celular al ácido retinoico induce poblaciones homogéneas de células con morfología neuronal humana. Este proceso activa el receptor de tropomiosina quinasa B (TrkB), permitiendo la supervivencia exclusiva de células dependientes de neurotrofinas. Estas células expresan proteínas con localización subcelular característica de neuronas maduras y presentan múltiples características similares a los cultivos primarios de neuronas (Encinas et al., 2000; Shipley, Mangold, y Szpara, 2016).

Este modelo celular es útil para llevar a cabo estudios bioquímicos y moleculares a gran escala debido a su susceptibilidad a la manipulación genética y la disponibilidad de una cantidad ilimitada de células.

3. Antivirales y rocaglatos

Los virus son patógenos intracelulares obligados cuya replicación depende de las funciones y vías del hospedero, por lo que ellos utilizan diversas estrategias para secuestrar la maquinaria molecular de las células que infectan con el fin de garantizar su replicación, amplificación y posterior propagación (Lozach, 2020). La infección viral se asocia con efectos en la morfología, la fisiología y la bioquímica celular, así como, también se relaciona con efectos genotóxicos y biológicos en la célula (Albrecht, Fons, Boldogh, y Rabson, 1996). Algunos de los procesos que afectan son el metabolismo celular, la respuesta inmune, las vías de transducción de señales, el ciclo celular, la apoptosis, la inflamación, entre otros (Christiaansen, Varga, y Spencer, 2015; Fan, Sanyal, y Bruzzzone, 2018; Huckestein y Alcorn, 2022; Józefiak, Larska, Pomorska-Mól, y Ruzkowski, 2021; S. Zhang, Carriere, Lin, Xie, y Feng, 2018; Zhou, Jiang, Liu, Liu, y Liang, 2017).

Existen dos tipos fundamentales de terapias antivirales: las drogas de acción directa (DAA) y las drogas dirigidas a un blanco del hospedero (HDT). Los antivirales de acción directa actúan sobre el virus, se pueden dirigir a señuelos receptores, proteasa o nucleósidos del virus, y también pueden actuar sobre la traducción o proteínas virales; estos antivirales han sido los más utilizados, ya que poseen tiempos de acción cortos, sin embargo, pueden favorecer la aparición de variantes resistentes (Meganck and y Baric, 2021; Obermann et al., 2022). Por otra parte, los

antivirales dirigidos a un blanco del hospedero actúan sobre factores que utilizan los virus para infectar eficientemente la célula hospedera. Entre estos, encontramos inhibidores de endocitosis, inhibidores de cinasas e inhibidores de proteasas del huésped, así como también, estimuladores de la respuesta inmune, fármacos de reprogramación lipidómica y anticuerpos que bloquean receptores (Kaufmann et al., 2017; Meganck and y Baric, 2021).

Los HDT son una estrategia antiviral alternativa que ofrece ventajas en términos de que ocasiona una menor resistencia antiviral en comparación a los DAA. La terapia dirigida al hospedero también puede mostrar una actividad inhibitoria de amplio espectro y es menos probable que estos agentes antivirales pierdan su eficacia contra virus que evolucionan rápidamente, puesto que la resistencia requeriría que el virus se vuelva menos dependiente del factor objetivo, utilice otro factor del hospedero para poder replicarse o que esquive los mecanismos de defensa activados del hospedero. Esta evasión requeriría cambios genéticos considerables en el patógeno. Todas estas ventajas se deben a que la variabilidad genética y la tasa de mutación de la célula hospedera es baja comparada con los virus (Kaufmann et al., 2017; Mahajan, Choudhary, Kumar, y Tomar, 2021).

Entre las funciones esenciales del hospedero utilizadas para la replicación viral se encuentra la síntesis de proteínas llevada a cabo por la maquinaria de traducción celular (Nebigil et al., 2020). La traducción eucariótica está fuertemente regulada por factores de iniciación eucarióticos (eIF). Así, el factor de iniciación eucariota eIF4A es fundamental para el reclutamiento de ribosomas al ARNm. Se ha descrito que distintos virus de ARN, entre estos, los arbovirus CHIKV y ZIKV, contienen regiones 5' no traducidas (5'UTR) altamente estructuradas, por lo que dependen de la actividad helicasa de eIF4A para formar el complejo de pre-iniciación 43S (43S-PIC) en el inicio de la traducción del ARNm (Montero, Pérez-Gil, y Sampieri, 2019).

Los rocaglatos son compuestos naturales extraídos de plantas del género *Aglaia*, utilizadas en la medicina popular oriental. Estos compuestos se caracterizan por un esqueleto de ciclopenta[b]benzofurano, pertenecen a las flavaglinas y son inhibidores específicos de eIF4A (Skofler et al., 2021). Ejemplos destacados de

rocaglatos son los compuestos Rocaglamide-A y los rocaglatos sintéticos Zotatifin y CR-1-31-B. La Rocaglamide-A presenta actividad antitumoral, antiinflamatoria, insecticida y antiviral contra el virus de la Hepatitis C (Ebada et al., 2011; Liu et al., 2015; Proksch et al., 2005). El Zotatifin, también llamado eFT226, presenta actividad antitumoral y ha avanzado hasta estudios clínicos contra SARS-CoV-2 (Ernst et al., 2020; Gerson-Gurwitz et al., 2021; Thompson et al., 2021). Por su parte, la molécula CR-1-31-B es capaz de inducir apoptosis, presenta actividad antimalárica y ha demostrado una potente actividad antiviral en concentraciones nano molares bajas y con baja citotoxicidad en células humanas primarias contra algunos virus como: SARS-CoV-2, Zika, Lassa, Fiebre hemorrágica de Crimea del Congo y en menor medida, contra hepatitis E (Cao et al., 2021; Langlais et al., 2018; Müller et al., 2021, 2020). Aunque estos compuestos son muy interesantes como potenciales tratamientos antivirales, los rocaglatos no se han estudiado en el contexto del MAYV (Figura 6).

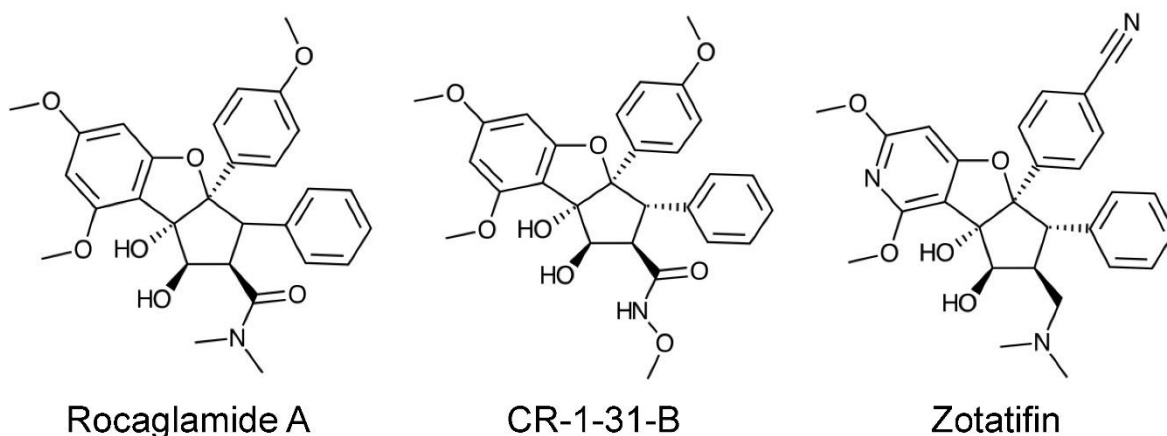


Figura 6. Estructuras químicas de los compuestos rocaglatos a estudiar en este trabajo.

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 como cambios antropogénicos, cambio climático y alteraciones genéticas (Young, 2018). Es importante resaltar que, los virus de ARN, como el MAYV, 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 amenaza para la salud pública, principalmente en países en vías de desarrollo con escasa vigilancia epidemiológica (Lopes Marques et al., 2020).

A pesar de que el MAYV representa un potencial problema de salud pública, es un virus desatendido y actualmente no existen vacunas aprobadas 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 (Esposito y Fonseca, 2017b; Ganjian y Riviere-Cinnamond, 2020; O Mota et al., 2019).

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 sabe 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 (Goh et al., 2020; Santhi et al., 2021; Shaneyfelt et al., 2006). Comprender la estructura viral, los mecanismos o rutas que utiliza el virus para secuestrar la maquinaria celular, además de las interacciones con los huéspedes y el desarrollo de agentes antivirales capaces de acelerar el desarrollo de tratamientos terapéuticos y profilácticos es un paso clave para prepararnos ante nuevos brotes o epidemias, por lo que su estudio tiene gran potencial y relevancia (Diagne et al., 2020; Dos Santos et al., 2014; Hotez y Murray, 2017; Levi y Vignuzzi, 2019; Lopes Marques et al., 2020).

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar y caracterizar la susceptibilidad de células de neuroblastoma SH-SY5Y a la infección con el alfavirus Mayaro y estudiar la potencial actividad antiviral de compuestos de rocaglatos.

Objetivos Específicos

- Estudiar el efecto del MAYV en la viabilidad de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y y cuantificar la producción de partículas virales.
- Evaluar el impacto de la diferenciación de células SH-SY5Y en la infectividad del MAYV.
- Analizar la expresión de las proteínas virales estructurales y no estructurales.
- Estudiar la expresión de genes de respuesta.
- Analizar la citotoxicidad de los compuestos Rocaglamide, CR-1-31-B y Zotatfin en células humanas.
- Examinar el efecto citopático causado por el MAYV en las células tratadas con los compuestos.
- Evaluar la producción de partículas virales y la expresión de proteínas virales nsP1 y E1 del MAYV en las células humanas seleccionadas tratadas o no con los rocaglatos.
- Analizar la etapa en el ciclo de replicación del MAYV en la que podrían estar actuando los rocaglatos.

Hipótesis

Ha1: Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y son susceptibles al MAYV.

Ha2: Los compuestos derivados de rocaglatos tienen actividad antiviral contra el MAYV.

Ho1: Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y no son susceptibles al MAYV.

Ho2: Los compuestos derivados de rocaglatos no tienen actividad antiviral contra MAYV.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

Cultivo celular y rocaglatos

Las células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) fueron cultivadas en Medio Esencial Mínimo Eagle (EMEM) suplementado con aminoácidos no esenciales y sales de Earle y las células de fibroblastos de piel humana (HDF's) y Microglía humana (HMC3) fueron cultivadas 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 Rocaglamide-A, Zotatifin, CR-1-31-B se obtuvieron de la casa comercial MedChemExpress (MCE) y se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) como indica el fabricante. Todos los compuestos fueron alicuotados y almacenados a -20 o -70 °C, hasta su uso.

Virus utilizados

Para los ensayos principales se utilizó la cepa del MAYV AVR0565, proveniente de San Martín, Perú. Mientras que para la evaluación de otras cepas del MAYV, se utilizaron las cepas TRVL4675 de Trinidad y Tobago, D218 de Surinam y BeH256 de Brasil, obtenidas del Centro de Referencia de Virus Emergentes y Arbovirus (WRCEVA) de la University of Texas, Medical Branch, Estados Unidos (EEUU), a través de los Doctores Robert Tesh y Scott Weaver. El virus recombinante VSV que expresa GFP (rVSV-GFP) y el virus IAV PR8-GFP fueron amablemente proporcionados por el Doctor Adolfo García-Sastre de la Icahn School of Medicine at Mount Sinai, Ciudad de Nueva York, EEUU. El virus Vaccinia (cepa WR) fue amablemente proporcionado por el Doctor Mariano Esteban del Centro Nacional de Biotecnología del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CNB, CSIC) de Madrid, España.

Los virus se amplificaron en células Vero-E6 y A549, se cuantificaron los títulos virales y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Diferenciación celular

Para inducir la diferenciación de las células a neuronas maduras se adaptaron los protocolos descritos por Dravid et al. (2021) y Shipley et al. (2016). Se sembraron las células en placas tratadas para cultivo celular de 6, 12 o 24 pocillos a las densidades deseadas para los experimentos, en medio EMEM o DMEM+F12k suplementado con SBF, 1% de L-glutamina, 1% de penicilina-estreptomicina. Al siguiente día, se colocó medio de etapa 1 compuesto de EMEM suplementado al 2% con SBF, 1% de L-glutamina, 1% de penicilina-estreptomicina y ácido retinoico (RA) a 10 μ M (Cat. No. R2625, Sigma). Después de 4 días de incubación, se cambió al medio de etapa II compuesto de medio Neurobasal suplementado con 1% de Gluta-Max, 1% penicilina-estreptomicina, 20 mM de Cloruro de potasio (KCl) (Cat. No. P5405, Sigma) y 50 ng/mL de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y 1X de suplemento B-27 (Cat. No. 12564-044, Gibco), durante 8 días adicionales, refrescando el medio cada 3 días. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y se tomaron imágenes de los diferentes estados de diferenciación mediante un microscopio invertido (Leica Biosystems, EEUU).

Ensayos de viabilidad celular

La citotoxicidad de los compuestos y el efecto citopático (ECP) provocado por el virus 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 EMEM o DMEM sin rojo fenol y se trataron con los compuestos a distintas concentraciones o DMSO al 0.1% como control, durante 24 o 48 h o se infectaron con MAYV a MOI 1 o 10 durante 8 a 96 h. Después del periodo de incubación, se añadió una solución de MTT a una concentración de 5 mg/mL preparada en PBS estéril y se incubó en la oscuridad a 37°C durante 3 h. Posteriormente, los cristales de formazán formados se disolvieron en DMSO y 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 no infectadas o DMSO).

Ensayos de infección viral y efecto citopático (ECP)

Para evaluar el efecto citopático inducido por MAYV o la cuantificación de partículas virales, se cultivaron células en platos de 12 pocillos y se infectaron durante 1 h en medio sin SBF a una multiplicidad de infección de 1 o 10. Después de la h de absorción del virus, se retiró el inóculo y se agregó medio EMEM de mantenimiento (con SBF al 2%) o se trataron las células con las concentraciones descritas de los compuestos en medio de mantenimiento (al 2% de SBF). Para las células SH-SY5Y se realizó una cinética de infección desde las 8 hasta las 96 h, sin embargo, se observó el ECP después de las 24 o 48 h de incubación con un microscopio invertido (Leica Biosystems, EEUU). Para la recolección de sobrenadantes para la titulación de placas o proteínas para evaluar la síntesis de proteínas, se realizó el mismo método con controles y se colectaron los sobrenadantes y/o se lisaron las células y se almacenaron a -20 °C.

Ensayo de formación de placas virales

Se evaluó la producción de partículas virales en los sobrenadantes de células infectadas y tratadas o no 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 2% en MEM 2X suplementado con SBF al 4% y se incubó 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 contaron el número de placas. Los títulos virales se expresaron como unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL) y la cuantificación se llevó a cabo utilizando la siguiente fórmula:

$$UFP/mL = \frac{\# \text{ de placas} * \text{dilución} * \text{volumen de dilución}}{\text{volumen de infección}}$$

Citometría de flujo

Luego de infectar las células con virus conjugados a GFP y tratar las células con los compuestos, estas se fijaron con paraformaldehído, se permeabilizaron y se suspendieron en PBS. Posteriormente, las muestras se analizaron en un citómetro de flujo marca CytoFLEX S (Beckman Coulter, FL, EE.UU.), registrando al menos 10,000 eventos por muestra. Los datos obtenidos se procesaron con el software CytExpert (Versión 2.4.0.28), aplicando controles de compensación. Durante el análisis, las partículas se excitaron con un láser de 488 nm-Canal B525, registrando la emisión de fluorescencia en el rango de 525-540 nm. El software del citómetro contabilizó los eventos fluorescentes, permitiendo calcular la concentración de partículas virales GFP en la muestra según el volumen analizado y las diluciones aplicadas.

Análisis de proteínas mediante Western blot

Las proteínas virales o celulares se analizaron mediante Western Blot. Para ello, las células se lisaron con tampón de carga de Laemmli con Ditiotreitól al 10%. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (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 durante 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 (Cat. No. VMA00046, Bio-Rad) o β -Actina (Cat. No. VMA00048, Bio-Rad). Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 min a las membranas con buffer T-TBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 h a temperatura ambiente. Después, se lavaron nuevamente las membranas con buffer T-TBS, se secaron y finalmente, se incubaron con el reactivo sustrato quimio luminiscente mejorado (ECL) durante 5 o 20 min, para luego, detectar la señal

mediante un escáner de quimioluminiscencia C-Digit (LI-COR, EEUU) o mediante la luz captada por una película de rayos X y revelada en un cuarto oscuro mediante el sistema Fuji Film.

Ensayo de inmunofluorescencia

Se cultivaron células SH-SY5Y en cubreobjetos de 10 mm de diámetro dentro de platos de 24 pocillos tratados con Poly-D-Lysine (Cat. No. A3890401, Gibco) para favorecer su adhesión. Las células se diferenciaron durante 12 días y se fijaron con paraformaldehído al 2% en buffer PBS durante 20 min, y posteriormente, se permeabilizaron con Triton-X100 al 0.25%. Luego, se bloquearon las células con albumina de suero bovina (BSA) al 2% en PBS durante 20 min y se tiñeron durante 24 h con los anticuerpos primario anti- β -III-Tubulina (β IIITUB) (Cat. No. T8660, Sigma) y Tirosina hidroxilasa (TH) (Cat. No. T2928, Sigma). Seguido, las células se incubaron con el anticuerpo secundario generado en cabra anti-ratón conjugado a Alexa Flour-568 (Cat. No. A-11004, Invitrogen) durante 1 h y en la oscuridad. Finalmente, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con la solución de montaje Prolong con DAPI (Cat. No. P36962, Invitrogen) para teñir los núcleos celulares y se observaron en un microscopio confocal FV1000 (Olympus America, Inc., Center Valley, PA, EEUU).

Análisis de la expresión de ARNm por RT-qPCR

Se utilizó la técnica de Transcriptasa Inversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real o cuantitativa (RT-qPCR) para la detección de la expresión genes celulares. Se extrajo el ARN total de las células usando un kit RNeasy (QIAGEN, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN complementario se sintetizó a partir de 1 μ g de ARN usando un kit de Transcripción Inversa cDNA de alta capacidad y la RT-PCR cuantitativa se completó usando el kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) en un termociclador QuantiStudio 5, utilizando cebadores específicos para los genes de respuesta inmune: interferón alfa (IFN α), interferón beta (IFN β), gen 15 estimulante de interferón (ISG15), proteína de unión a GTP inducida por

interferón (MX1), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y el gen de la interleucina 1 beta (IL-1 β). La expresión del ARNm se determinó usando β -actina para normalizar de acuerdo con el método de delta CT. Estos cebadores ya fueron probados por nuestro grupo en trabajos anteriores (Sugasti-Salazar, Llamas-González, Campos, y González-Santamaría, 2021; Valdés-Torres et al., 2022).

Tabla 1. Lista de cebadores usados en este estudio.

<i>en</i>	Secuencia de primers (5'-3')	Referencia
<i>IFNα</i>	Forward: GCCTCGCCCTTTGCTTACT Reverse: CTGTGGGTCTCAGGGAGATCA	(Devhare, Chatterjee, Arankalle, y Lole, 2013)
<i>IFNβ</i>	Forward: ATGACCAACAAGTGTCTCCTCC Reverse: GCTCATGGAAAGAGCTGTAGTG	(Devhare et al., 2013)
<i>TNFα</i>	Forward: CAGAGGGAAGAGTTCCCCAGGGACC Reverse: CCTTGGTCTGGTAGGAGACGG	(Devhare et al., 2013)
<i>IL-1β</i>	Forward: AACCTCTTCGAGGCACAAGG Reverse: GTCCTGGAAGGAGCACTTCAT	(Hamel et al., 2015)
<i>MX-1</i>	Forward: GGTGGTGGTCCCCAGTAATG Reverse: ACCACGTCCACAACCTTGTCT	(Stevenson et al., 2011)
<i>ISG15</i>	Forward: GAGAGGCAGCGAACTCATCT Reverse: CTTGAGCTCTGACACCGACA	(Bektas et al., 2008)
β - <i>Actina</i>	Forward: AGAGCTACGAGCTGCCTGAC Reverse: AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	(Chen et al., 2016)

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron a través del programa de análisis estadístico *Graphpad Prism*, los análisis se definieron tomando en cuenta los resultados, mediante pruebas de comparación de dos o más componentes. Un valor de $p < 0.05$, fue considerado como significativo.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

1. Análisis de la viabilidad de las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y y evaluación de la replicación viral de MAYV y UNAV.

Aunque el MAYV es considerado un patógeno emergente, aún se desconocen muchos aspectos fundamentales sobre su biología, las posibles secuelas, las vías de transmisión y los factores de riesgo asociados. Se ha descrito que otros virus similares, como CHIKV, son capaces de provocar complicaciones neurológicas, incluida la apoptosis neuronal (Dhanwani et al., 2012). Sin embargo, la información sobre la capacidad del MAYV para infectar el cerebro es limitada.

Teniendo en cuenta esto, se decidió infectar células SH-SY5Y, un modelo celular con un fenotipo neuronal, durante distintos tiempos y dos multiplicidades de infección (MOI de 1 y 10) del MAYV y se documentaron diariamente, mediante microscopía óptica, los cambios morfológicos o ECP inducidos por el virus en las células. Se observó que las células infectadas mostraban ECP a partir de las 48 h de infección, y este efecto aumentaba en el tiempo, en particular en la MOI de 10, de manera que, a las 96 h de infección, casi no quedaban células adheridas a la placa en ninguna de las MOI evaluadas (Figura 7A). Estos resultados demuestran que el virus induce un fuerte ECP en las células SH-SY5Y.

Luego se evaluó la viabilidad celular de las células infectadas mediante el ensayo de MTT y se obtuvo un resultado similar al ECP. Se notó que la viabilidad celular se reducía de manera significativa a partir de las 24 h de infección con una MOI de 10 y después de las 48 h con una MOI de 1. Después de las 72 h de infección, la viabilidad disminuyó de manera muy significativa para ambas MOI (Figura 7B). A continuación, se evaluó si el virus era capaz de replicar en la línea celular SH-SY5Y. Para esto, se infectaron células hasta 96 h post infección (hpi) como se hizo previamente, se colectaron los sobrenadantes celulares y se llevaron a cabo ensayos de titulación de placas virales. Estos resultados indican que el MAYV se replica muy eficientemente en estas células, de manera dependiente del tiempo y en ambas MOI evaluadas (Figura 7D). En su conjunto, estos hallazgos indican que las células SH-SY5Y son susceptibles a la infección con el MAYV.

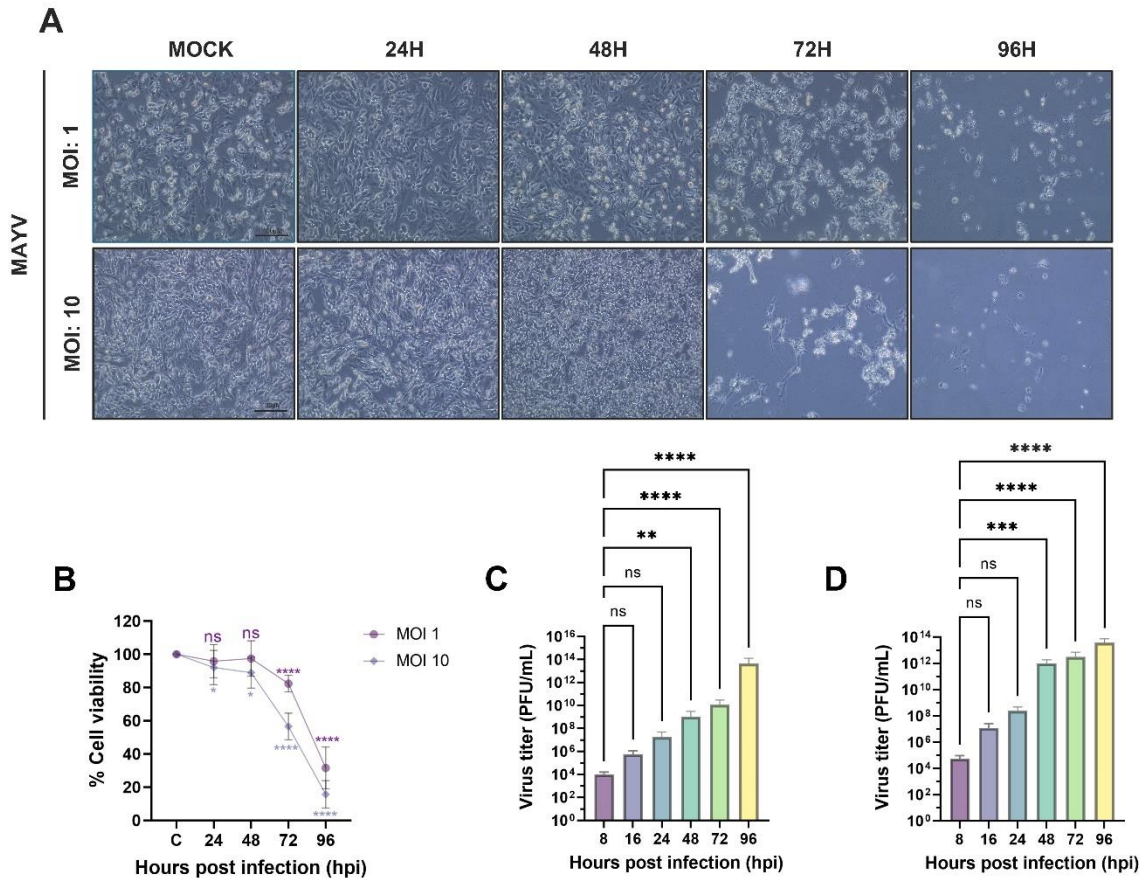


Figura 7. Las células SH-SY5Y son susceptibles a la infección con el MAYV. (A) ECP inducido por el MAYV en células SH-SY5Y. **(B)** Porcentaje de viabilidad de las células SH-SY5Y infectadas con el MAYV. Título viral de células SH-SY5Y infectadas con el MAYV a una MOI de 1 **(C)** y 10 **(D)**. Los datos fueron analizados con la prueba de Kruskal Wallis, seguido de la prueba de Dunnett: (ns: no significativo, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$).

Posteriormente, se probó la capacidad del virus UNAV para infectar las células SH-SY5Y. UNAV es otro miembro de los Alfavirus y está estrechamente relacionado con el MAYV y casi no hay información sobre el tropismo celular de este virus. En estos experimentos, se obtuvieron resultados similares a los observados con el MAYV. El UNAV provocó un ECP a partir de las 48 hpi en ambas MOI, que iba acompañado de una disminución de la viabilidad celular de manera significativa después de las 72 hpi. Finalmente, se observó un aumento en los títulos virales de

manera dependiente del tiempo y de la MOI (Figura 8 A-D). Estos resultados indican que el UNAV también se replica eficientemente en las células SH-SY5Y.

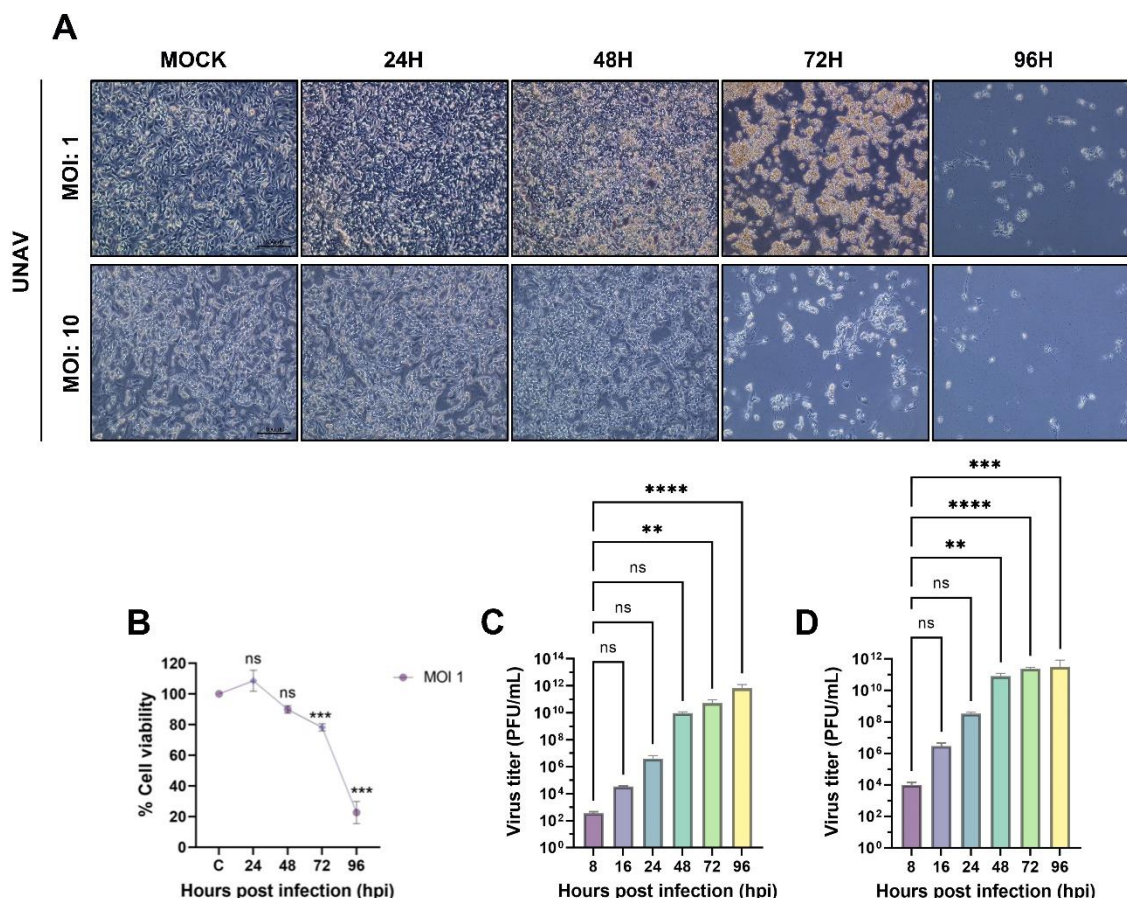


Figura 8. UNAV también infecta las células SH-SY5Y de manera dependiente del tiempo y de la MOI utilizada. (A) Imágenes mostrando el ECP inducido por el UNAV en células SH-SY5Y. **(B)** Porcentaje de células viables SH-SY5Y infectadas con el UNAV. Títulos virales en sobrenadantes de células SH-SY5Y infectadas con UNAV a MOI de 1 **(C)** y 10 **(D)**. Los datos fueron analizados con la prueba estadística de Kruskal Wallis, seguido de la prueba de Dunnett: (ns: no significativo, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$).

2. Las células infectadas por el MAYV y el UNAV expresan las proteínas virales E1 y nsP1.

Una vez demostrado que el MAYV y el UNAV se replicaban eficientemente en la línea celular SH-SY5Y, se analizó la expresión de las proteínas virales estructural E1 y no estructural nsP1 en estas células. Para esto, se infectaron las células en una cinética desde 0 hasta las 72 hpi, se recolectaron los extractos de

proteínas y se analizaron los niveles de E1 y nsP1 mediante Western-Blot. Los resultados de estos experimentos mostraron la expresión de ambas proteínas virales E1 y nsP1 del MAYV a partir de las 48 hpi (Figura 9A) y del UNAV a partir de las 24 hpi (Figura 9B).

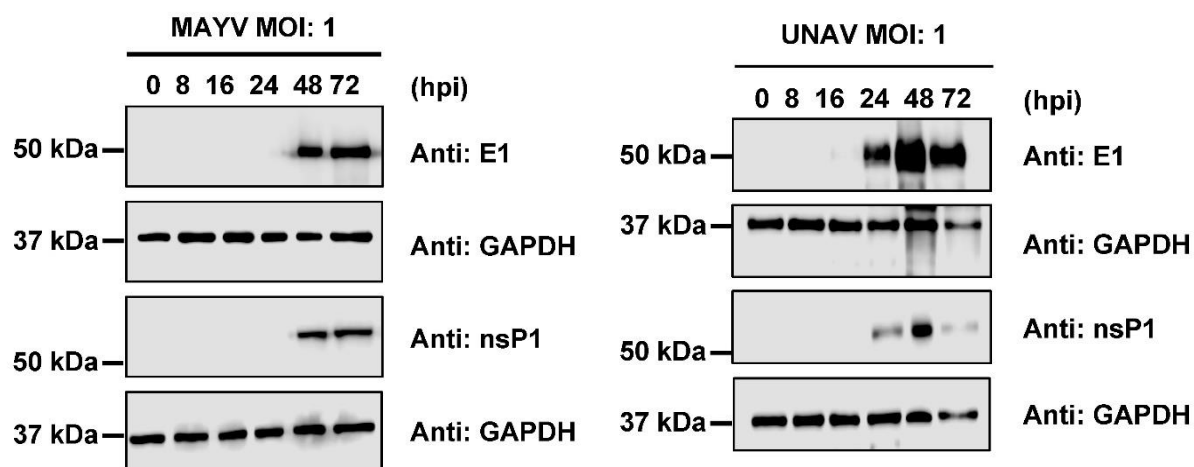


Figura 9. Las células SH-SY5Y infectadas con los virus MAYV y UNAV expresan proteínas virales E1 y nsP1. kDa: kilodaltons; hpi: horas post infección; GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato

3. Las células diferenciadas con ácido retinoico y factor neurotrófico derivado del cerebro muestran características morfológicas de neuronas maduras y expresan marcadores neuronales.

La diferenciación de las células SH-SY5Y es un paso necesario para producir una población de células con comportamientos morfológicos y funcionales similares a los de las neuronas maduras. Se ha descrito que el tratamiento con ácido retinoico (AR), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y suplemento B-27, inducen la diferenciación de las células SH-SY5Y en neuronas maduras (Dravid et al., 2021; Martin, Gandawijaya, y Oguro-Ando, 2022). Las células SH-SY5Y indiferenciadas suelen crecer en grupos con proyecciones cortas y poco desarrolladas, mientras que las células diferenciadas se caracterizan por un crecimiento significativo de neuritas, esenciales para la transmisión de señales entre neuronas. Durante este proceso de diferenciación, la transformación de las células en neuronas implica la remodelación y redistribución de proteínas del citoesqueleto, especialmente actina, tubulina y filamentos intermedios (Hromadkova et al., 2020). Esta organización especializada del citoesqueleto cumple funciones claves en la estabilidad de los

microtúbulos y en la integridad axonal, controladas por la fosforilación de residuos específicos en estas proteínas. Esta fosforilación es especialmente importante para las funciones axonales y para la transmisión a larga distancia de señales electroquímicas importantes para el funcionamiento del sistema nervioso (Hromadkova et al., 2020).

Para inducir la diferenciación de las células SH-SY5Y en un modelo neuronal maduro, las células se cultivaron durante 4 días con medio de diferenciación de etapa I y luego, durante 8 días más, con medio de diferenciación de etapa II, también se cultivaron células crecidas con solo medio EMEM al 2% de FBS como control. El cultivo de las células SH-SY5Y se monitoreó diariamente para verificar el proceso de diferenciación a un modelo neuronal. Se pudo observar que las células tratadas con AR+BDNF mostraron un leve alargamiento a partir del primer día de tratamiento con medio de etapa I, para el quinto día, ya con medio de etapa II, las células mostraban proyecciones más extensas que aumentaron con los días produciendo así una amplia red de neuritas características de neuronas maduras (Figura 10).

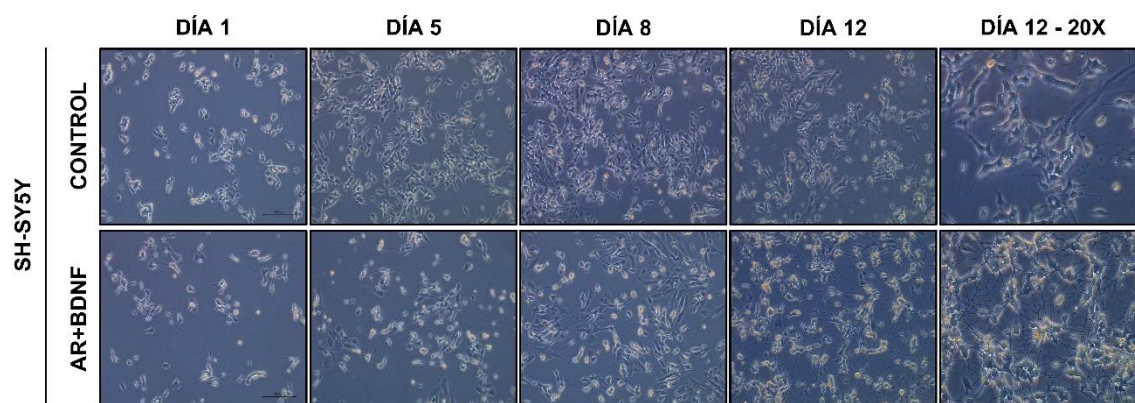


Figura 10. Proceso de diferenciación neuronal de las células SH-SY5Y.

Se conoce también que las células diferenciadas expresan marcadores neuronales. De manera que, para comprobar que nuestras células se diferenciaron adecuadamente, se evaluó la presencia de dos de los marcadores neuronales previamente reportados, β -III-Tubulina (β IIITUB) y Tirosina Hidroxilasa (TH) mediante ensayos de Western Blot e inmunofluorescencia (Khwanraj, Phruksaniyom, Madlah, y Dharmasaroja, 2015; Mohamad Nasir, Mohd Hazli, Shamsuddin, y Zainuddin, 2024). En ambos casos se pudo observar la expresión

de estos marcadores en las células diferenciadas con AR+BDNF, comprobando así la diferenciación de nuestras células a un modelo neuronal (Figura 11).

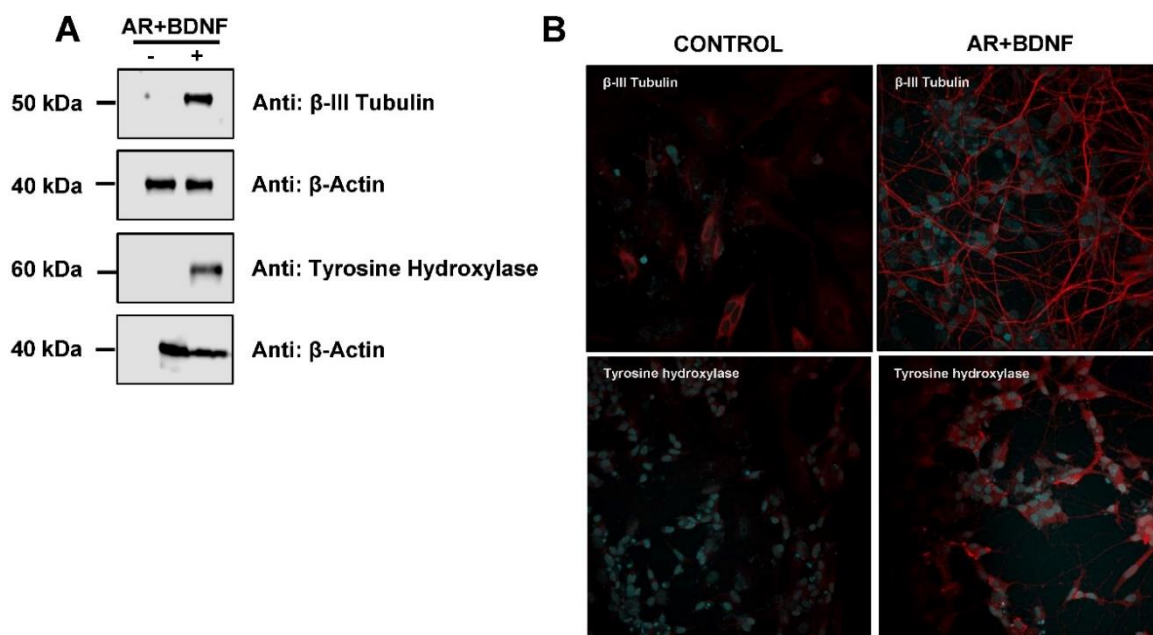


Figura 11. Expresión de marcadores neuronales por células SH-SY5Y diferenciadas. (A) Imágenes de Western Blot mostrando la expresión de marcadores neuronales. **(B)** Presencia de marcadores neuronales mediante inmunofluorescencia.

4. Las células SH-SY5Y diferenciadas a un modelo neuronal maduro e infectadas con MAYV, muestran títulos virales altos y expresan niveles de proteínas virales similares a las células no diferenciadas.

Luego de comprobar que las células se diferenciaron efectivamente en un modelo neuronal maduro, se evaluó si el MAYV era capaz de replicarse en este modelo neuronal. Para esto, se cuantificó la producción de partículas virales en sobrenadantes de células infectadas con el MAYV diferenciadas y no diferenciadas a 24 o 48 h de incubación, utilizando el método de titulación de placas y tinción con violeta cristal. Los resultados de estos ensayos revelaron que tanto las células no diferenciadas como las células diferenciadas son permisivas a la infección con igual eficiencia independientemente del tiempo de infección (Figura 12A-B).

Seguidamente, se quiso comprobar si ocurría el mismo efecto en la expresión de las proteínas E1 y nsP1 en las células diferenciadas. Para realizar esto, se

recolectaron proteínas de células diferenciadas y no diferenciadas infectadas con el MAYV a 48 h y se analizaron mediante Western Blot. Como se puede observar, hay niveles similares de la proteína nsP1 tanto en las células diferenciadas, como en las no diferenciadas (Figura 12C), no obstante, se observó niveles superiores de la proteína E1 en las células diferenciadas. Estos resultados indican que el MAYV infecta eficientemente las células SH-SY5Y independientemente de su estado de diferenciación.

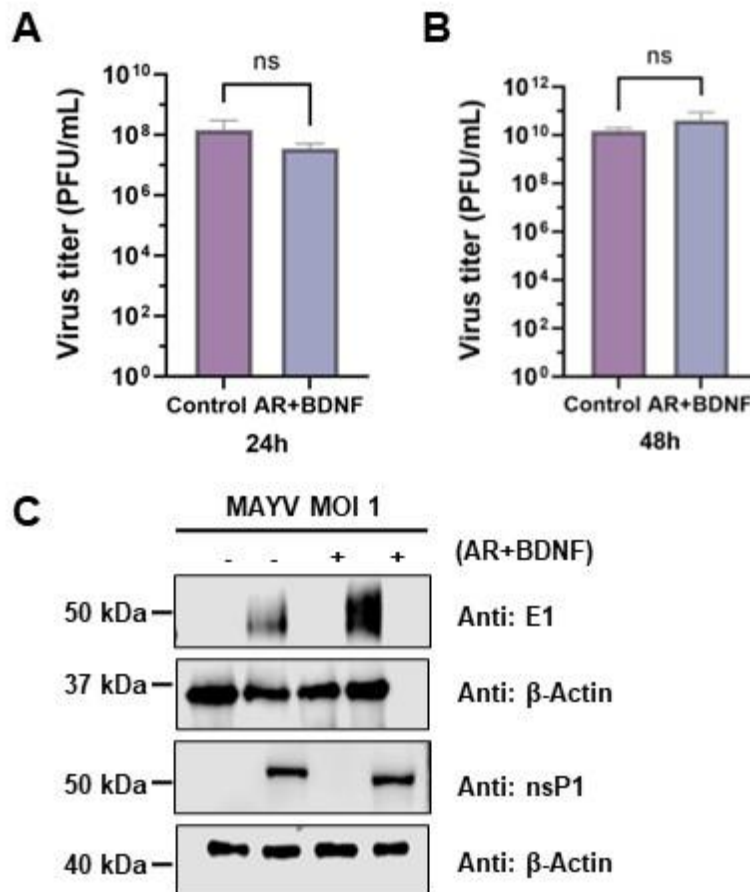


Figura 12. El MAYV replica eficientemente en células diferenciadas como en no diferenciadas. ns: no significativo, AR+BDNF: células diferenciadas. T-test con corrección de Welch ns: no significativo, * $p < 0.1$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$.

5. Evaluación de genes de respuesta inmune mediante RT-qPCR en células diferenciadas y no diferenciadas infectadas con MAYV.

Para evaluar cómo respondían las células SH-SY5Y ante la infección por el MAYV, se analizó la expresión de los siguientes genes de respuesta inmune mediante RT-qPCR: interferón alfa ($\text{IFN}\alpha$), interferón beta ($\text{IFN}\beta$), gen 15 estimulante de interferón (ISG15), proteína de unión a GTP inducida por interferón (MX1), factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$) y el gen de la interleucina 1 beta ($\text{IL-1}\beta$) en células diferenciadas y no diferenciadas, e infectadas o no infectadas. Como se puede observar en la Figura 13, las células infectadas tanto diferenciadas como no diferenciadas muestran un aumento significativo de la expresión de los genes de interferón: $\text{IFN}\alpha$ e $\text{IFN}\beta$ (Figuras 13A y 13B), indicando una activación de la vía de interferón tipo I, esenciales en la respuesta antiviral inicial (Schoggins, 2019). También, encontramos una inducción significativa de los genes inducidos por interferón ISG15 y MX1 (Figuras 13C y 13D), independientemente del estado de diferenciación de las células SH-SY5Y.

En estudios anteriores se ha descrito que la infección del MAYV aumenta las citocinas proinflamatorias, que son mediadores importantes involucrados en la progresión de patologías causadas por alfavirus artritogénicos como el MAYV (Ferraz et al., 2021). Por lo tanto, se decidió evaluar la expresión de los genes de las citocinas proinflamatorias $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$. Estos resultados en las células no diferenciadas muestran un aumento en la expresión de $\text{TNF}\alpha$ y una supresión de $\text{IL-1}\beta$, mientras que en las células diferenciadas ambos genes aumentan, aunque $\text{TNF}\alpha$ muestra una expresión más modesta, aunque significativa (Figuras 13E y 13F).

Por otra parte, se compararon las células infectadas no diferenciadas con las células infectadas diferenciadas mediante una prueba Mann-Whitney y se pudo observar que la expresión de MX1 y $\text{TNF}\alpha$ es mayor en las células no diferenciadas; mientras que $\text{IFN}\alpha$, $\text{IFN}\beta$ e ISG15 no muestran diferencias significativas entre estos grupos; y, además, $\text{IL-1}\beta$ aumenta su expresión de manera muy significativa en las células diferenciadas (Figura 13).

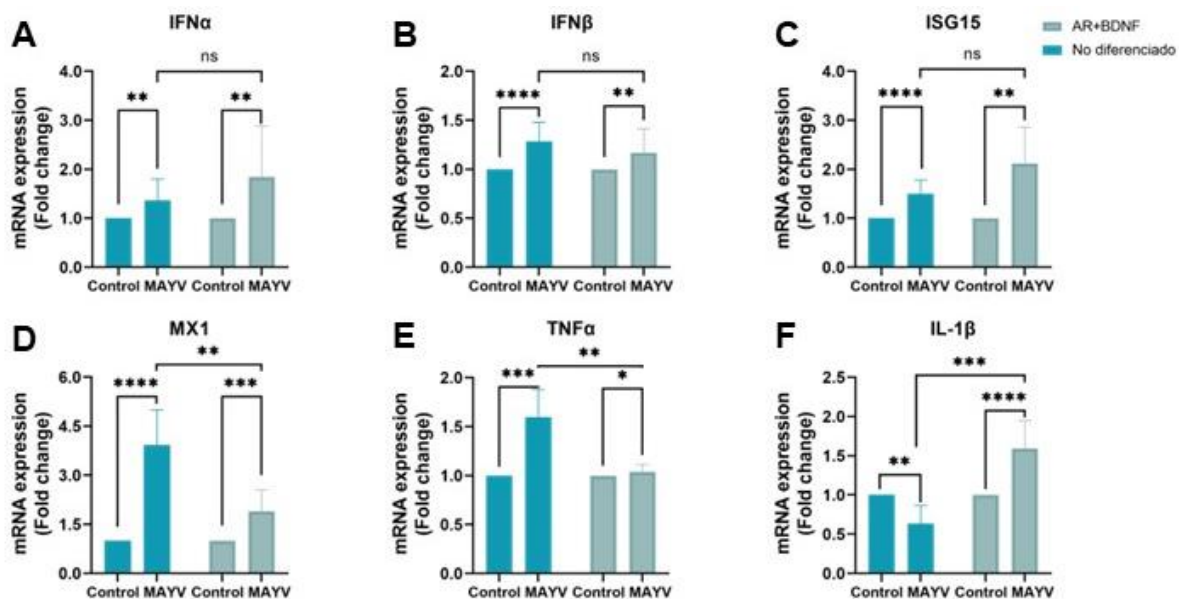


Figura 13. Análisis de los genes de respuesta inmune en células diferenciadas y no diferenciadas. Se usó β -actina como housekeeping gen. Mann Whitney test: ns: no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

6. Análisis de la citotoxicidad celular de los compuestos derivados de rocaglatos en distintas líneas celulares humanas y determinación de las concentraciones a evaluar.

En la segunda parte de este trabajo, se decidió evaluar compuestos derivados de rocaglatos para probar si estos compuestos tenían actividad antiviral contra el MAYV. Así, lo primero que hicimos fue evaluar la toxicidad de los compuestos en células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), células de microglía humana (HMC3) y fibroblastos de piel humana (HDF's) con dosis crecientes de los compuestos de la siguiente manera: Roc-A y CR-1-31-B de 0 a 25 nM, mientras que Zotatifin de 0 a 75 nM, mediante ensayos de MTT durante 24 y 48 h.

Como se muestra en la Figura 15, los resultados muestran que tanto CR-1-31-B, como Roc-A, resultaron ser significativamente tóxicos en concentraciones mayores a 5 nM, siendo la viabilidad celular mayor o igual al 80% en concentraciones de 3 nM en todas las líneas celulares probadas (Figuras 14A, 14B, 14D, 14E, 14G y 14H). Por su parte, Zotatifin mostró una viabilidad mayor o igual al 80% a una concentración de 50 nM a las 24 h, y disminuyó un poco a las 48h

(Figuras 14C, 14F y 14I). De manera que se decidió utilizar una concentración máxima de 3 nM para Roc-A y CR-1-31-B, y una concentración máxima de 50 nM para Zotatfin, teniendo en cuenta que los ensayos de infección tendrían una duración de 24 h.

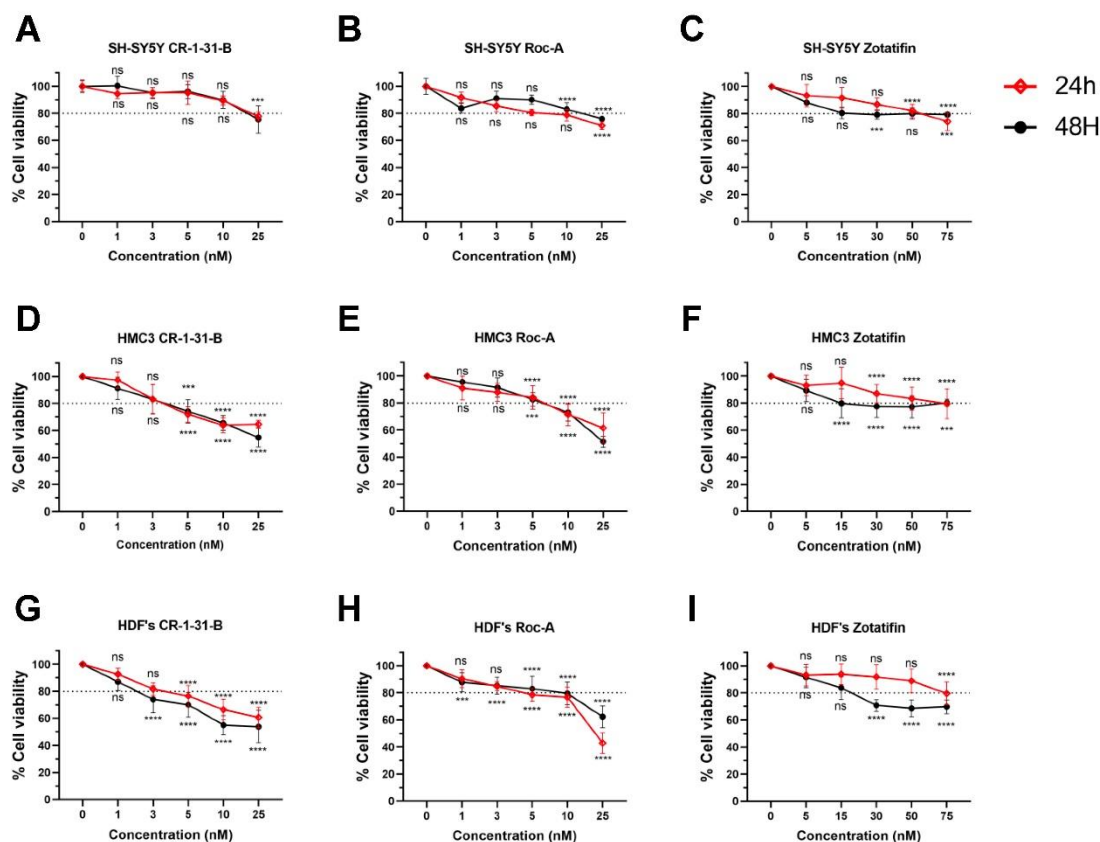


Figura 14. Citotoxicidad de los compuestos de rocaglatos evaluados. Células SH-SY5Y (A, B, C), HMC3 (D, E, F) y HDF's (G, H, I) fueron tratadas con las concentraciones indicadas de los rocaglatos o DMSO al 0.1 % como control, durante 24 o 48 h y se midió la viabilidad celular mediante el método de MTT. Los resultados se expresan en porcentaje de células viables, asumiendo que las células no tratadas tienen un 100% de viabilidad. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba Kruskal Wallis, seguido de una prueba de Dunnett. Las diferencias estadísticas se denotan como: ns: no significativo, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$. La línea puntuada indica una viabilidad celular del 80%.

Luego de seleccionar las concentraciones a probar, se evaluó si los compuestos eran capaces de proteger los HDF's del ECP inducido por el MAYV. Para ello, pretratamos las células con los compuestos durante 2 h, y luego, se

infectaron las células con el MAYV, y después de la h de absorción del virus, se trataron las células con DMSO o con los rocaglatos. Después de 48 h de infección, se observó la morfología de las células con la ayuda de un microscopio invertido. En las células infectadas con el MAYV y tratadas con DMSO se observó un fuerte ECP (Figura 15). Por otra parte, Roc-A y CR-1-31-B no parecen proteger las células del ECP, mientras que con Zotatfin se observó una clara protección del daño inducido por el virus, lo que nos sugiere que este compuesto podría tener un efecto antiviral.

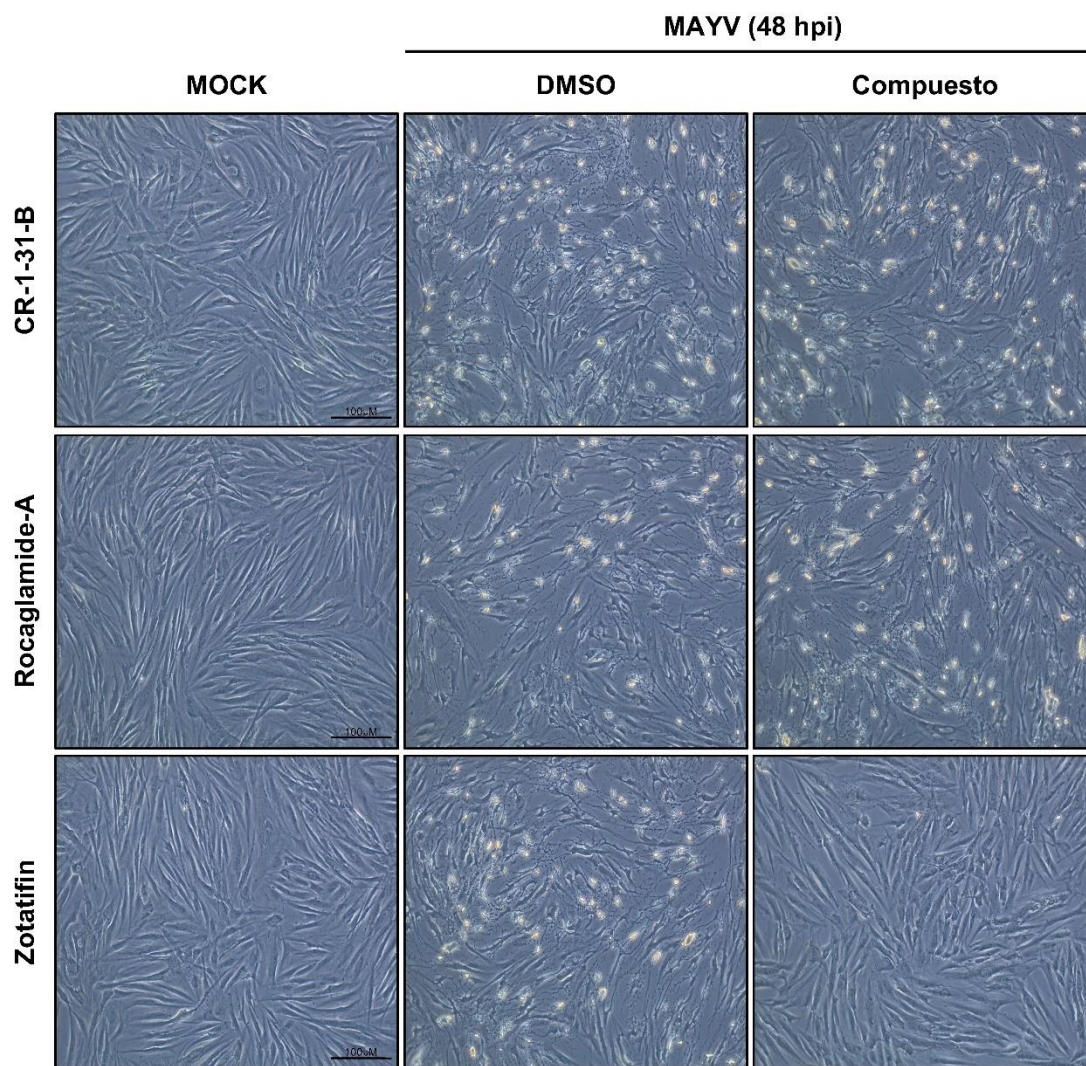


Figura 15. Zotatfin protege las células de cultivo primario de fibroblastos de piel humana (HDF's) del efecto citopático inducido por el MAYV.

7. Los rocaglatos Zotatifin y CR1-31B reducen la producción de progenie viral de MAYV en distintas líneas celulares humanas de manera dependiente de la dosis probada.

A continuación, para verificar si la protección mediada por Zotatifin observada en los ensayos de efecto citopático estaba asociada con un efecto antiviral, cuantificamos la producción de partículas virales en células infectadas y tratadas o no con cada uno de los rocaglatos seleccionados. Para ello, primero se pretrataron las células HDF's con las concentraciones mencionadas anteriormente durante 2 h, luego se infectaron las células con el MAYV (cepa AVR0565, Perú) durante 1 h y se trataron nuevamente con los compuestos, se utilizaron células tratadas con DMSO como control. Después de 24 h de incubación, se recolectaron los sobrenadantes para medir la producción de partículas virales, como explicamos previamente. De estos ensayos, se observó una clara reducción de los títulos virales de manera dependiente de la concentración con los compuestos Zotatifin (Figura 16A) y CR-1-31-B (Figura 16B), mientras que los títulos de los sobrenadantes de Roc-A no mostraron diferencias con el control (Figura 16C).

Luego, se decidió corroborar los resultados anteriores en células de microglía humana HMC3. Los resultados de estos experimentos mostraron que Zotatifin redujo significativamente los títulos del virus de manera dosis dependiente (Figura 16D), con una disminución que oscilaba entre 4 y 5 log; por su parte, CR-1-31-B también mostró una inhibición del virus de alrededor de 3 log, pero solo en la máxima dosis probada (Figura 16E). Estos resultados indican que tanto Zotatifin como CR-1-31-B reducen la producción de partículas virales del MAYV, sin embargo, Zotatifin mostró una mayor inhibición dependiente de la concentración. Por lo tanto, se optó por seguir evaluando el efecto de este compuesto sobre el MAYV y descartar a CR-1-31-B y Rocaglamide-A en los siguientes ensayos.

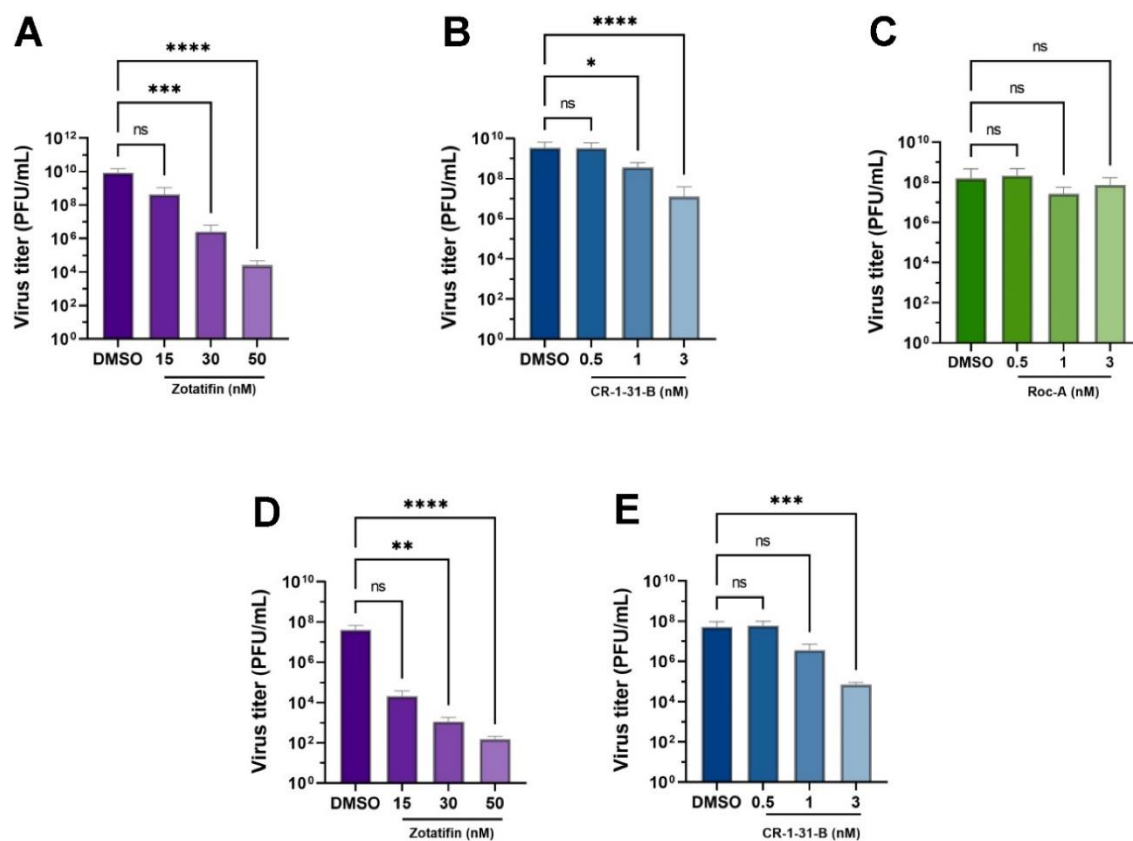


Figura 16. Zotatfin y CR-1-31-B inhiben la replicación de MAYV en células HDF's y HMC3. Se pretrataron células HDF's (**A, B, C**) y HMC3 (**D, E**) con las concentraciones indicadas de cada compuesto. Luego, las células se infectaron con el MAYV a una MOI de 1, después de 1 h de incubación del virus, se volvieron a tratar las células hasta completar las 24 h de infección. A continuación, se evaluó la producción de partículas virales en cada condición experimental mediante la técnica de formación de placas. Los títulos virales se expresaron como UFP por mililitro (UFP/mL). Los datos representan el promedio $\pm$ la desviación estándar de al menos dos o tres experimentos independientes con tres réplicas cada uno. Los datos se analizaron mediante la prueba estadística Kruskal-Wallis, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. ns: no significativo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$; **** $p < 0.0001$.

Después de escoger Zotatfin para los siguientes experimentos, se quiso probar si este compuesto también era efectivo en las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, el modelo neuronal descrito en la primera etapa de este trabajo. Para ello, se realizó la misma metodología descrita anteriormente: se pretrataron las células, se infectaron y se volvieron a tratar con el compuesto hasta completar

las 24 h de incubación, sin embargo, solo se evaluó una única concentración de 50 nM.

Los resultados obtenidos muestran que Zotatifin es capaz de inhibir la infección del MAYV en las células SH-SY5Y de manera significativa con una disminución de aproximadamente 4 log (Figura 17A). Además, al probar en células diferenciadas a neuronas maduras, se pudo observar que Zotatifin también inhibía la replicación del MAYV de manera similar a las células no diferenciadas (Figura 17B).

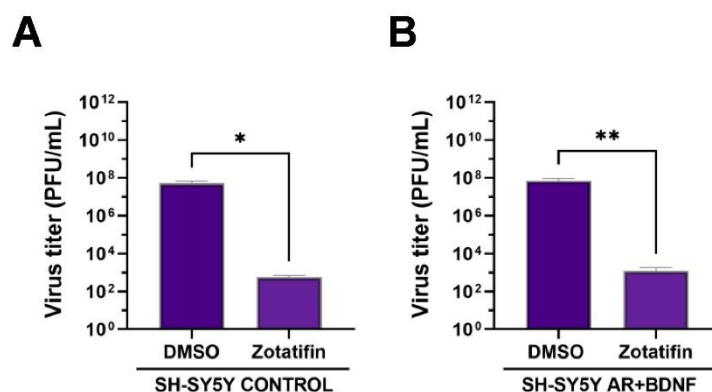


Figura 17. Zotatifin inhibe la replicación de MAYV en células SH-SY5Y no diferenciadas y diferenciadas. Se evaluó la producción de partículas virales mediante la técnica de formación de placas. Los títulos virales se expresaron como UFP por mililitro (UFP/mL). Los datos representan el promedio $\pm$ la desviación estándar de al menos 2 experimentos independientes con 3 réplicas cada uno. Los datos se analizaron mediante la prueba estadística t-Student con corrección de Welch. ns: no significativo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Todos estos datos demuestran que Zotatifin inhibe eficientemente la infección por el MAYV en células HDF's, HMC3 y SH-SY5Y.

8. El efecto antiviral de Zotatifin es independiente de la cepa del MAYV evaluada.

Hasta este punto, los ensayos de infecciones fueron todos realizados utilizando la cepa del MAYV AVR0565, aislada en San Martín, Perú. Teniendo esto en cuenta, para determinar si el efecto antiviral observado ocurre con otras cepas del virus aisladas de otras regiones geográficas, analizamos el efecto de Zotatifin en las cepas BeH256 (Brasil), D218 (Suriname) y TRVL 4875 (Trinidad y Tobago);

las células se trataron con la dosis máxima de Zotatifin (50 nM) hasta las 24 h de incubación y se cuantificó la progenie viral mediante ensayos de formación de placas. Los resultados obtenidos muestran que Zotatifin reduce la producción de progenie de MAYV en todas las cepas evaluadas de manera muy significativa, oscilando entre 3 y 4 log de reducción en cada cepa (Figura 18).

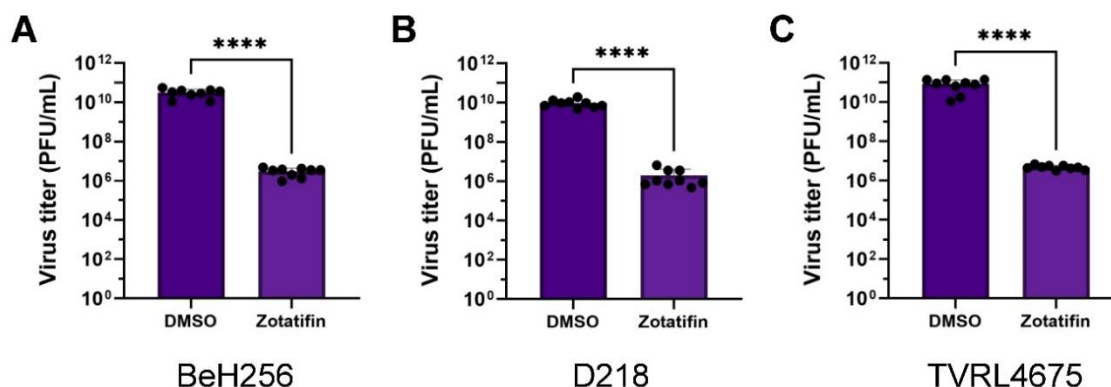


Figura 18. El efecto antiviral de Zotatifin en células HDF's es independiente de la cepa de MAYV probada. Células HDF's pretratadas con Zotatifin fueron infectadas con las cepas de MAYV BeH256 (A), D218 (B) y TRVL4875 (C), y tratadas con la concentración máxima de Zotatifin (50 nM) durante 24 h. Después, 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 Mann-Whitney. La significancia estadística se muestra como: **** $p < 0.0001$.

9. Zotatifin reduce la expresión de la proteína estructural de MAYV E1 y la proteína no estructural nsP1.

Con el objetivo de explorar un posible mecanismo por el cual Zotatifin reduce la replicación del MAYV, decidimos evaluar la expresión de las proteínas virales E1 y nsP1 en células HDF's pretratadas con Zotatifin, infectadas con el MAYV y tratadas con el compuesto posteriormente. Después de 24 h de incubación, se recolectaron los extractos de proteínas y se analizaron los niveles de E1 y nsP1 mediante Western Blot. Como se muestra en la Figura 19, Zotatifin inhibe la expresión de las proteínas E1 y nsP1 de MAYV en la concentración máxima probada.

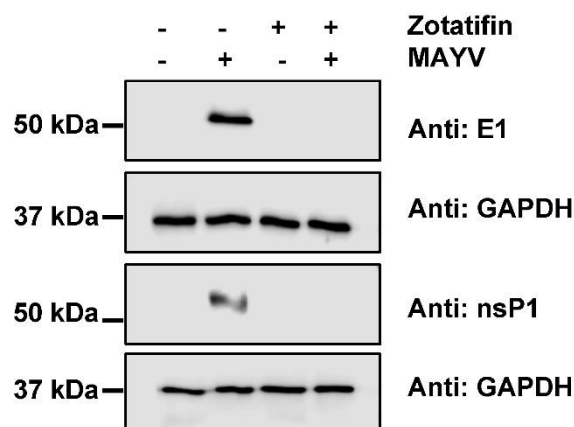


Figura 19. Zotatiffin inhibe la expresión de proteínas virales E1 y nsP1 en células HDF's. Células HDF's fueron infectadas y tratadas con concentraciones de 50 nM de Zotatiffin durante 24h. Los extractos de proteínas fueron analizados mediante Western Blot para determinar los niveles de proteínas E1 y nsP1. Se utilizó como control de carga la proteína GAPDH. kDa: kilodaltons, -: ausencia, +: presencia

10. El tratamiento con Zotatiffin inhibe la infección del MAYV en diferentes etapas del ciclo viral.

Con el fin de explorar en qué etapa del ciclo viral actúa Zotatiffin, se trataron las células HDF's con la concentración máxima del compuesto durante diferentes etapas de la infección viral.

Primero se pretrataron las células con Zotatiffin durante 2 h a 37 °C, posteriormente se infectaron con el MAYV durante 1 h y luego, se eliminó el inóculo y se colocó medio sin tratamiento hasta completar las 24 hpi, se colectaron los sobrenadantes y se cuantificaron mediante titulación de placas. Como se muestra en la Figura 20A, en las células pretratadas, el título del virus disminuye un aproximado de 4 logs con respecto al control.

Se conoce que el primer paso de la infección por el MAYV consiste en la unión de las partículas virales a un receptor en la membrana celular de un hospedero susceptible. Por lo tanto, se realizó un ensayo de unión en el cual se infectaron las HDF's con el MAYV en presencia de Zotatiffin a 4 °C durante 1 h. A esta temperatura, el virus puede unirse a los receptores de la membrana celular, pero no ingresar a las células. Pasada la hora de absorción, las células se incubaron a 37 °C en un medio sin los compuestos durante 24 h pi y se cuantificaron los títulos

virales como se describió con anterioridad. Estos experimentos revelaron que Zotatfin no afectó la unión del MAYV a la dosis probada (Figura 20B).

El paso siguiente después de la unión a las células diana es la entrada del virus a las células, por lo tanto, a continuación, se evaluó si Zotatfin era capaz de afectar este proceso. Para ello, se infectaron las HDF's con el MAYV a 4 °C durante 1 h; después se eliminó el inóculo y se trasladaron las células a 37 °C y se incubaron con Zotatfin durante 2 h. Después, se retiró el compuesto y, tras 24 hpi, se evaluó la producción de progenie viral. Los resultados obtenidos indican que Zotatfin no parece afectar esta fase del ciclo viral (Figura 20C).

Finalmente, se realizó un ensayo posterior a la entrada en el cual las células fueron infectadas siguiendo el mismo procedimiento del ensayo de entrada, donde, después de la adsorción viral, se retiró el inóculo y se incubaron las células sin tratamiento a 37 °C durante 2 h. Posteriormente, se añadió Zotatfin y las células se incubaron hasta 24 hpi, se colectaron los sobrenadantes y se cuantificaron los títulos virales. Como resultado de estos experimentos se obtuvo una reducción de alrededor de 2 logs (Figura 20D). Estos ensayos indican que el pretratamiento de las células o la adición del compuesto en etapas tardías, afectan la replicación del MAYV.

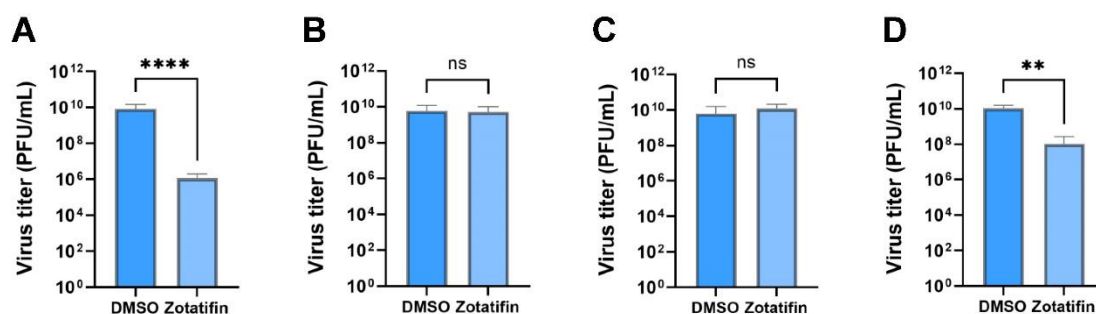


Figura 20. Zotatfin inhibe la replicación a distintas etapas del ciclo viral de MAYV. Se infectaron HDF's con MAYV a una MOI de 1 para evaluar distintas etapas, pretratamiento (A), unión (B), entrada (C) y post entrada (D). Los títulos virales se cuantificaron mediante titulación de placas y tinción con violeta cristal. 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 dos experimentos independientes con tres réplicas cada uno. Los datos se analizaron con la prueba estadística de Mann-Whitney. La significancia estadística se muestra como: ns: no significativo, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

11. El Zotatifin también disminuye la producción de progenie viral de los arbovirus UNAV y CHIKV dependiente de la dosis.

Después de que Zotatifin mostrara un claro efecto antiviral contra MAYV, se decidió evaluar el efecto del compuesto contra otros arbovirus emergentes o reemergentes. Para esto pretratamos e infectamos células HDF's con los alfavirus UNAV y CHIKV, y se trataron con concentraciones desde 15 a 50 nM hasta completar 24 hpi. Luego, se colectaron los sobrenadantes y se cuantificaron los títulos virales, como se indicó previamente. Estos resultados demuestran que el tratamiento con Zotatifin inhibe la replicación de ambos virus de manera dependiente de la concentración (Figura 21).

Estos resultados indican que el efecto antiviral de Zotatifin no es específico de MAYV, sino que podría actuar sobre otros alfavirus.

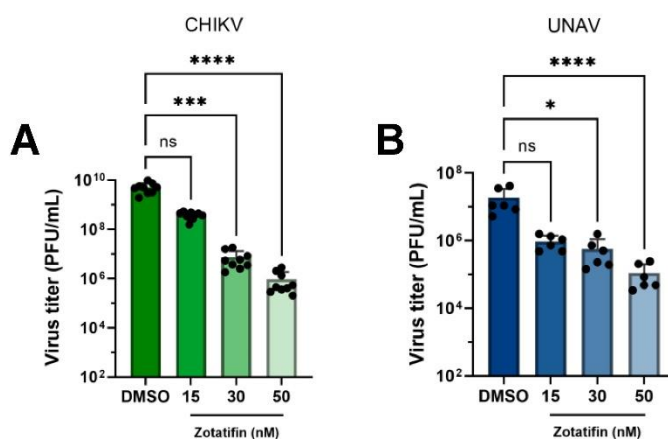


Figura 21. Zotatifin inhibe la replicación de CHIKV y UNAV. Células HDF's fueron infectadas con CHIKV (A) y UNAV (B) a una MOI de 1 y tratadas con Zotatifin hasta las 24 hpi. Se cuantificaron los títulos virales mediante titulación de placas y se expresaron como unidades formadoras de placa por mililitro (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 mediante la prueba estadística Kruskal-Wallis, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. La significancia estadística se muestra como: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

12. Zotatifin también muestra un efecto antiviral contra otros virus de ARN como Influenza A (IAV) y el virus de estomatitis vesicular (VSV).

Luego de comprobar el efecto antiviral de Zotatifin en varios arbovirus, se planteó evaluar si este rocaglató tenía efecto antiviral contra otro tipo de virus de

ARN como el virus de la Influenza A (IAV) y el virus de la estomatitis vesicular (VSV), miembros de las familias *Orthomixoviridae* y *Rhabdoviridae*, respectivamente. Primero, se evaluó la citotoxicidad de Zotatfin sobre las células A549 usando concentraciones desde 30 a 100 nM y se midió la viabilidad celular mediante la técnica de MTT. Las células toleraron Zotatfin hasta una concentración de 100 nM después de 6 días de tratamiento, pero se optó por probar concentraciones de 50 nM, debido a que en ensayos anteriores fue la máxima concentración utilizada (Figura 22A). Posteriormente, para evaluar la replicación viral se utilizó citometría de flujo, ya que se utilizaron virus que expresan proteína verde fluorescente (GFP) y el porcentaje e intensidad del GFP puede brindar una idea del número de células infectadas y la cantidad de virus que hay en las células. Además, se usó la titulación de placas para cuantificar los títulos virales. Para esto, se pretrataron las células A549 con Zotatfin, se infectaron con una MOI > 1 (MOI alta) o MOI < 1 (MOI baja) de IAV durante 2 h. Luego, se trataron con Zotatfin a dosis de 50 nM y después de 24 hpi, se recolectaron las células para citometría y los sobrenadantes para los ensayos de titulación de placas.

Los ensayos de titulación de placas mostraron una clara inhibición del virus de Influenza A en las células tratadas con Zotatfin, tanto en una MOI alta (Figura 22B) como en una MOI baja (Figura 22C). Los ensayos de citometría revelaron que el porcentaje de células positivas para GFP fue similar en las células tratadas con el compuesto respecto al control, indicando que Zotatfin no previene la infección de las células (Figura 22D), sin embargo, sí redujeron la intensidad de GFP expresado en las células en ambas MOI, indicando que el compuesto afecta la replicación del virus (Figura 22E, Figura 22F).

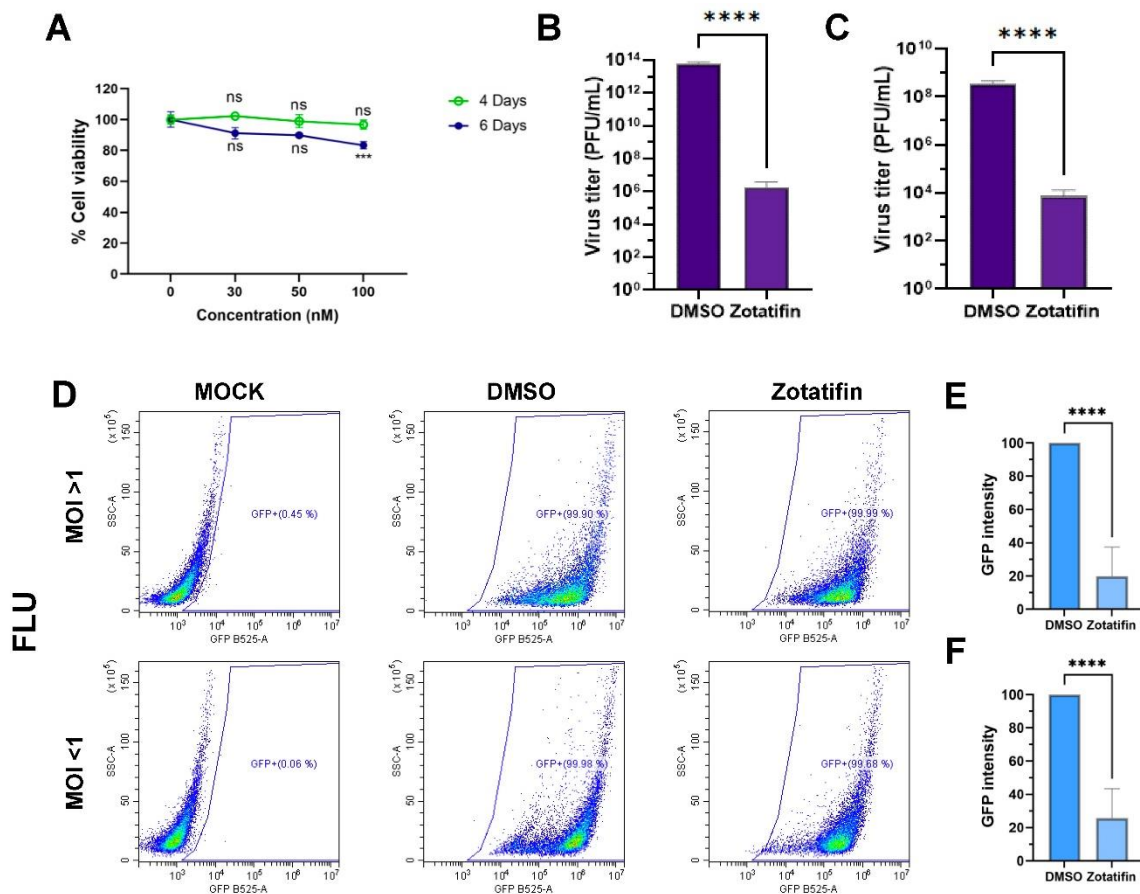


Figura 22. Zotatiffin disminuye el título viral y la intensidad de GFP de IAV en células A549. Viabilidad de las células A549 tratadas con Zotatiffin usando el método de MTT (**A**). Títulos virales de IAV a MOI > 1 (**B**) y MOI < 1 (**C**). Evaluación de la replicación viral mediante citometría de flujo (**D**). Intensidad de GFP MOI > 1 (**E**), Intensidad de GFP MOI < 1 (**F**). Los títulos virales se expresaron como unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL). Los datos representan el promedio $\pm$ la desviación estándar de al menos dos experimentos independientes con tres réplicas cada uno. Los datos se analizaron mediante la prueba estadística de t-student con corrección de Welch. ns: no significativo. **** $p < 0.0001$. Mock: no infectado, SSC: Side Scatter (Complejidad).

Por otra parte, con VSV los ensayos de citometría mostraron que el porcentaje de células positivas para GFP en las células tratadas con el compuesto fue similar al control en las dos MOI probadas (Figura 23A), sin embargo, sí se redujo la intensidad de GFP expresado en las células de manera muy significativa tanto a MOI alta (Figura 23B) como a MOI baja (Figura 23C), al igual que con IAV. Además, se cuantificó la progenie viral en células infectadas con MOI alta y se pudo

observar que las células tratadas con Zotatifin mostraron un título menor que el observado en las células control (Figura 23D). Todos estos resultados indican que Zotatifin es capaz de inhibir la replicación de otros virus de ARN, tales como IAV y VSV.

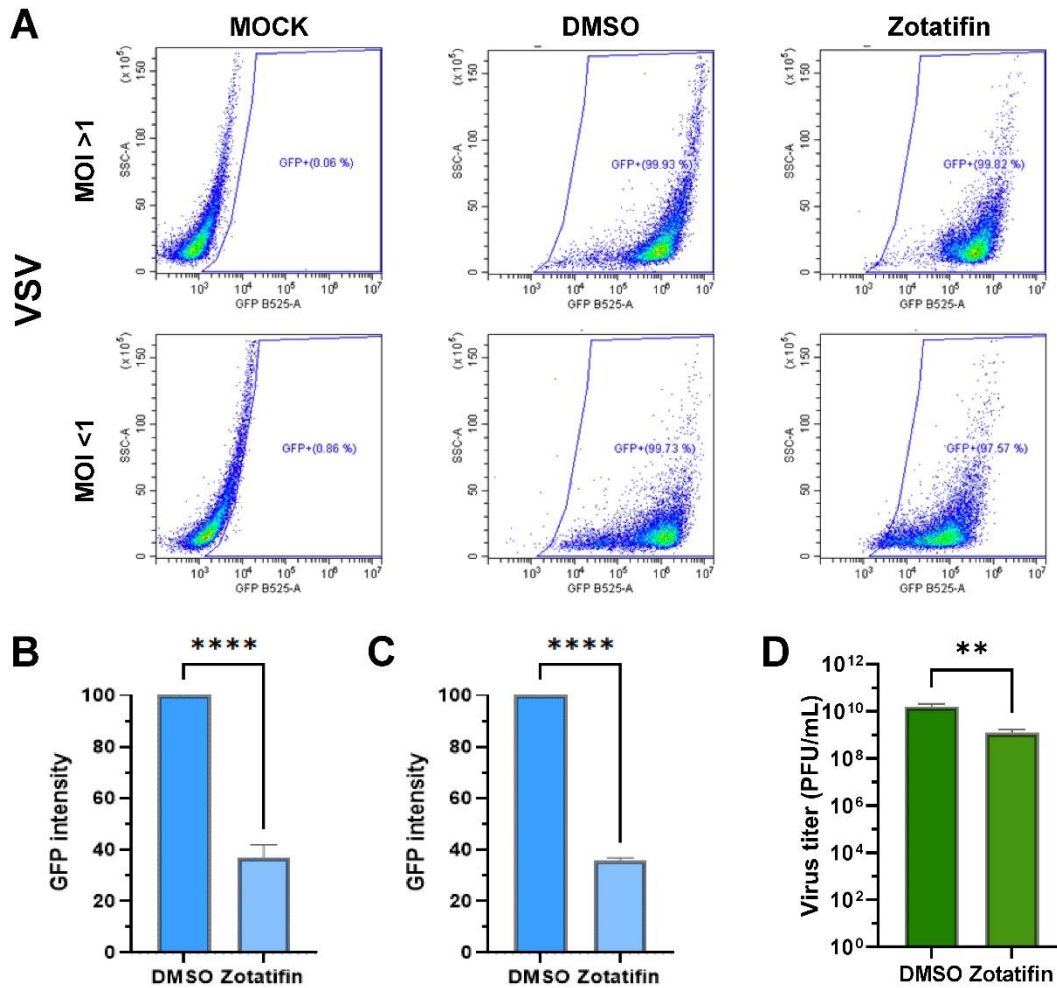


Figura 23. Zotatifin disminuye el título viral y la intensidad de GFP de VSV en células A549. Evaluación de la replicación viral mediante citometría de flujo (A). Intensidad de GFP a MOI > 1 (B). intensidad de GFP a MOI < 1 (C). Evaluación de los títulos virales mediante titulación de placas a MOI > 1 (D). Los títulos virales se expresaron como unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL). Los datos representan el promedio $\pm$ la desviación estándar de al menos dos experimentos independientes con tres réplicas cada uno. Los datos se analizaron mediante la prueba estadística de t-student con corrección de Welch. ns: no significativo, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. SSC: Side Scatter, Mock: no infectado

13. Zotatifin reduce los niveles de las proteínas nucleocápside (NP) de IAV, GFP de VSV y E3L del virus Vaccinia.

Posteriormente, se decidió evaluar si Zotatifin afectaba la expresión de las proteínas NP de IAV-GFP, GFP de VSV-GFP y la proteína E3L del virus Vaccinia. Para esto, se pretrataron células A549 con 50 nM de Zotatifin, se infectaron con IAV, VSV o VACV y se trataron nuevamente con el compuesto hasta completar las 24 hpi. Después, se recolectaron los extractos de proteínas y se analizaron mediante Western Blot.

Los resultados obtenidos muestran que Zotatifin inhibe la expresión de las proteínas NP de IAV tanto a una MOI alta (Figura 24A), como a una MOI baja (Figura 25C). De igual manera, se obtuvo que el compuesto también inhibe la expresión de GFP de VSV en ambas MOIs analizadas (Figuras 24B y 24D).

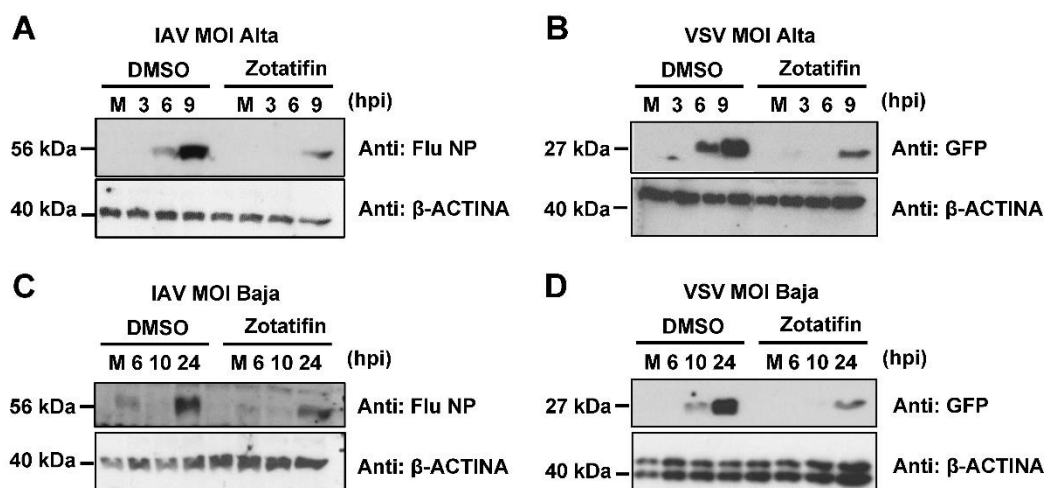


Figura 24. Zotatifin inhibe la expresión de las proteínas de NP de IAV y GFP de VSV. IAV (A, C), VSV (B, D). kDa: kilodaltons, M: mock.

Por último, luego de comprobar el efecto antiviral de amplio espectro de Zotatifin en virus de ARN de distintas familias, se quiso evaluar si este efecto antiviral también ocurría en virus de ADN como el virus Vaccinia (VACV). Así, evaluamos la expresión de la proteína E3L de VACV en células A549 tratadas o no con Zotatifin, mediante Western Blot. De estos experimentos se obtuvo una disminución leve en la expresión de la proteína E3L del virus Vaccinia en células

tratadas con Zotatfin a MOI alta (Figura 25A), y una disminución muy clara de la expresión de proteínas a MOI baja (Figura 25B).

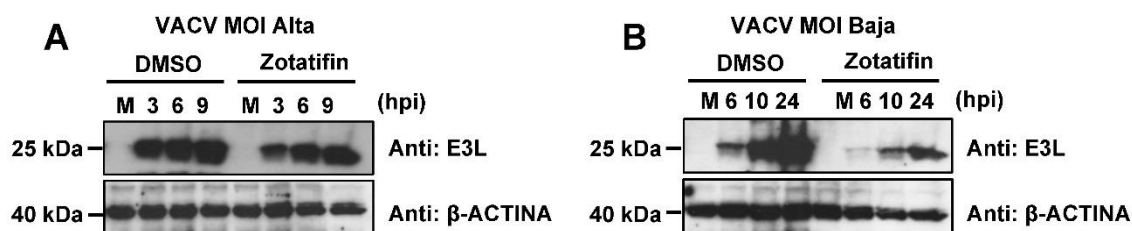


Figura 25. Zotatfin inhibe la expresión de las proteínas E3L de VACV. MOI alta (A), MOI baja (B). kDa: kilodaltons, M: Mock.

Todos estos resultados indican que el rocaglato Zotatfin es capaz de inhibir la replicación viral y la síntesis de proteínas de virus de ARN de distintas familias y, además, también es capaz de inhibir la síntesis de proteínas del virus de ADN Vaccinia. Esto sugiere que este rocaglato podría tener un efecto antiviral de amplio espectro.

DISCUSIÓN

Los arbovirus representan una amenaza para la salud pública a nivel global debido a su capacidad para causar brotes masivos de enfermedades en humanos y animales (García-Romero, Carrillo Bilbao, Navarro, Martín-Solano, y Saegerman, 2023). En la actualidad, los brotes y propagación de arbovirus ocurren de manera más rápida y abarcan regiones geográficas más extensas debido a factores como el aumento de los sistemas de transporte global, la urbanización acelerada, las desigualdades socioeconómicas, la deforestación y la falta de estrategias en el control de vectores (Gould et al., 2017; Power et al., 2022). Además, el cambio climático es otro factor muy importante en la expansión de arbovirus, ya que ocasiona cambios en la temperatura, la humedad y los patrones de precipitaciones. Estas condiciones favorecen la proliferación de las poblaciones de vectores y prolongan su temporada de actividad y mejoran las tasas de transmisión viral, lo que incrementa significativamente el riesgo de brotes en regiones que antes no eran endémicas (Robert, Stewart-Ibarra, y Estallo, 2020).

Las infecciones por arbovirus además de afectar la salud pública, también generan costos económicos y sociales considerables, por lo que existe la necesidad de una colaboración multidisciplinaria y un enfoque integral para proteger la salud humana, animal y ambiental en el contexto de las enfermedades zoonóticas y las epidemias (Tajudeen et al., 2022). El MAYV es un arbovirus emergente desatendido que ha incrementado su distribución en las Américas y, aunque se han reportado la mayoría de los casos en zonas boscosas o rurales, se ha demostrado mediante estudios experimentales que mosquitos del género *Aedes* spp. pueden ser vectores competentes para este virus, lo que, debido a la naturaleza de estos vectores, aumenta su amenaza de diseminación a zonas urbanas y a su vez, puede aumentar su incidencia en la población humana (Ganjian and y Riviere-Cinamond, 2020; Pereira et al., 2020).

Es evidente que el MAYV representa un potencial problema para la salud pública, sin embargo, sigue siendo un virus desatendido con recursos insuficientes destinados a su investigación y control, lo que da como resultado un tema de preocupación creciente debido al aumento de brotes de infecciones por este virus en distintas regiones de Latinoamérica en los últimos años (Ganjian and y Riviere-

Cinnamond, 2020). Actualmente, existe una falta de conocimiento profundo sobre la patogénesis del virus, es decir, los mecanismos mediante los cuales el MAYV infecta, se replica y causa daño en el organismo humano y, además, no existen vacunas ni antivirales aprobados para combatir este patógeno (Diagne et al., 2020).

Comprender la patogénesis del MAYV es fundamental para predecir su impacto en la salud humana, en vista de esto, caracterizar la infección de este virus en el cerebro es crucial para entender cómo podría afectar el virus al sistema nervioso, evaluar su capacidad para causar daño neuronal y explorar posibles tratamientos, además de ampliar la información disponible, permite entender los mecanismos biológicos utilizados por el virus. Hasta el momento, se han llevado a cabo investigaciones que demuestran que ciertas células del cerebro, como los astrocitos, pericitos, microglía, células progenitoras neuronales y células del endotelio microvascular, son susceptibles a la infección por el MAYV (Bengue et al., 2021; Campos et al., 2024). También, se ha reportado que el MAYV puede infectar el cerebro de ratones jóvenes de tipo salvaje y deficientes en el receptor del interferón tipo I (IFN I) (C. M. Figueiredo et al., 2019).

A pesar del avance que suponen las recientes investigaciones, aún se desconoce cómo puede afectar el MAYV a las células neuronales humanas, así que, en este trabajo, se evaluó y caracterizó la susceptibilidad de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y a la infección por el MAYV. Estos resultados indican que tanto el MAYV como el UNAV promovieron ECP fuertes en las células SH-SY5Y de una manera dependiente del tiempo. También, se observó una reducción significativa de la viabilidad de las células SH-SY5Y infectadas con estos virus. Estos resultados concuerdan con estudios previos que demuestran que el MAYV es capaz de inducir un potente ECP en otras células humanas (Camini et al., 2018; Sugasti-Salazar, Campos, Valdés-Torres, Galán-Jurado, y González-Santamaría, 2022).

Con el fin de comprobar si las células SH-SY5Y podrían ser susceptibles a la infección por el MAYV y el UNAV, se realizaron experimentos de cinéticas de infección, en los cuales se cuantificaron la producción de progenie viral en los sobrenadantes colectados a tiempos específicos. De estos ensayos, se obtuvo que

las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y fueron susceptibles a la infección por el MAYV y el UNAV a ambas MOI evaluadas. Esto coincide con el estudio realizado por C. M. Figueiredo et al. (2019) en un modelo de ratón in vivo, en el que describen que el MAYV es capaz de infectar cerebros de ratones. Además, se pudo observar una marcada expresión de las proteínas virales E1 y nsP1 en células infectadas con el MAYV o el UNAV a las 24 o 48 hpi, coincidiendo con nuestros resultados anteriores.

Posteriormente, se utilizaron las células SH-SY5Y como un modelo neuronal humano, diferenciándolas mediante el uso de ácido retinoico y factor neurotrófico derivado de cerebro (AR+BDNF). En primer lugar, se comprobó la diferenciación de estas células mediante el crecimiento de neuritas y la expresión de marcadores neuronales. Estos resultados indican que el tratamiento con AR+BDNF induce la formación de neuritas y la expresión de dos marcadores neuronales, las proteínas β -III-Tubulina (β III-TUB) y Tirosina Hidroxilasa (TH). Además, se pudo observar que el MAYV infecta eficientemente las células SH-SY5Y, independientemente de su estado de diferenciación. Estudios anteriores han descrito también la infección de células SH-SY5Y diferenciadas a un modelo neuronal con otros arbovirus como ZIKV y CHIKV (Dhanwani et al., 2012; Luplertlop et al., 2017). Los resultados previos coinciden con el hecho de que se observó una clara expresión de las proteínas virales E1 y nsP1 en las células diferenciadas y no diferenciadas.

Luego, para conocer mejor el efecto de la infección por el MAYV en las células SH-SY5Y diferenciadas, se evaluó la expresión de genes de respuesta inmune usando RT-qPCR. Los datos indican que la infección por el MAYV indujo la expresión de genes de interferón y genes estimulados por IFN independientemente del estado de diferenciación de las células SH-SY5Y, la inducción y secreción de IFN es característica de la respuesta inmune innata y la expresión de genes estimulados por IFN contribuyen conjuntamente a inhibir la replicación y la diseminación viral, esenciales en la respuesta antiviral inicial (Schoggins, 2019; Wardlaw and y Petrini, 2023).

Además de la respuesta mediada por interferones, también la activación de la producción de citocinas inflamatorias, quimiocinas y factores de crecimiento,

desempeñan un papel esencial en la respuesta inmune del huésped frente a las infecciones causadas por alfavirus (de Oliveira Souza et al., 2024). Estos resultados muestran un aumento en la expresión de TNF α e IL-1 β . En estudios anteriores se ha descrito que la infección del MAYV induce la expresión de citocinas proinflamatorias como TNF α e IL-1 β , que son mediadores importantes involucrados en la progresión de patologías causadas por alfavirus artríticos como el MAYV, y durante la infección, pueden activar y agravar aún más el ECP inducido por el virus, el estrés oxidativo y, por tanto, la apoptosis (Dhanwani et al., 2012; Ferraz et al., 2021; Santiago et al., 2015).

Por otra parte, la supresión de IL-1 β , en células no diferenciadas, podría implicar una inflamación limitada en estas células, sin embargo, también se debe tomar en cuenta que las respuestas de interferón suelen ser en etapas más tempranas de la infección, mientras que IL-1 β se puede activar en etapas más avanzadas.

También se ha observado que IL-1 β , junto con IFN tipo I, colaboran para suprimir la replicación viral en algunos virus como el virus del West Nile (WNV) y el virus de la Rubeola (RuV) en las neuronas (Hernández-Sarmiento, Tamayo-Molina, Valdés-López, y Urcuqui-Inchima, 2024; Sakuragi, Liao, Yajima, Fujiwara, y Nakamura, 2022), esto podría explicar el aumento de la expresión de IL-1 β en las células diferenciadas a neuronas maduras al infectarse con el MAYV.

Por otro lado, otros estudios realizados en células SH-SY5Y diferenciadas infectadas con los virus CHIKV, ZIKV y HSV-1 han mostrado una inducción de genes como ISG15, IL-1 β , TNF α y el sensor antiviral (Dhanwani et al., 2012; Sánchez-San Martín et al., 2018; Shipley, Mangold, Kuny, y Szpara, 2017). En resumen, estos resultados indican que la respuesta observada sugiere que se está promoviendo un estado antiviral general.

Aunque las complicaciones neurológicas no son manifestaciones comunes en la infección por el MAYV, existe la posibilidad de que puedan suceder y hay un caso clínico asociado a meningoencefalitis causada por el MAYV que refuerza esta hipótesis (Mutricy et al., 2022; Srichawla et al., 2024). Estos hallazgos indican que el MAYV es capaz de infectar *in vitro*, un modelo neuronal maduro y estos resultados

coinciden con investigaciones que demuestran que el MAYV puede infectar células del cerebro humano (Bengue et al., 2021; Campos et al., 2024). Por lo tanto, resulta de relevancia seguir efectuando estudios que ayuden a comprender mejor cómo afecta el MAYV al sistema nervioso y los múltiples mecanismos involucrados en el potencial neurotropismo de este virus.

A pesar de que el MAYV representa una amenaza para la salud pública, es un virus desatendido y, actualmente, no existen vacunas aprobadas o antivirales específicos disponibles para uso humano. En la segunda parte de este trabajo, se decidió evaluar tres compuestos derivados de rocaglatos para probar si estos poseían actividad antiviral contra el MAYV. Los resultados de la toxicidad celular mostraron que los compuestos Roc-A y CR-1-31-B eran bien tolerados a una concentración máxima de 3 nM y Zotatifin a una concentración máxima de 50 nM en las líneas celulares SH-SY5Y, HMC3 y HDF's.

Anteriormente, se ha reportado que el MAYV induce un fuerte ECP en distintas líneas celulares. Así que, se decidió investigar si los compuestos Roc-A, CR-1-31-B y Zotatifin protegían las células HDF's del daño inducido por el virus. Estos experimentos revelaron que Zotatifin previene el ECP inducido por el MAYV. Por ende, se evaluó la producción de progenie viral del MAYV en células HDF's con dosis crecientes de estos compuestos. Se obtuvo como resultado, una disminución significativa de los títulos virales del MAYV dependiente de la dosis en las células tratadas con CR1-31B y Zotatifin. Estos resultados se corroboraron en células HMC3, aunque los resultados indican que tanto Zotatifin como CR-1-31-B reducen la producción de partículas virales del MAYV y Zotatifin mostró una mayor inhibición dependiente de la concentración. Por lo tanto, se optó por seguir evaluando el efecto de este compuesto sobre el MAYV y descartar a CR-1-31-B y Rocaglamide-A en los ensayos posteriores. Luego, se probó Zotatifin en células SH-SY5Y y los resultados demuestran que el compuesto también reduce la producción de partículas virales en esta línea celular, independientemente de su estado de diferenciación.

De manera que, Zotatifin inhibe eficientemente la infección por el MAYV en células HDF's, HMC3 y SH-SY5Y. Luego, se comprobó que el efecto antiviral del compuesto era independiente de la cepa del MAYV utilizada y que Zotatifin también

reduce la expresión de las proteínas virales E1 y nsP1. Zotatifin también ha demostrado efecto antiviral contra el virus del SARS-CoV-2 y está siendo evaluado clínicamente para su uso en el tratamiento de COVID-19 (Ernst et al., 2020; Obermann et al., 2022). Estos hallazgos demuestran que Zotatifin posee actividad antiviral contra el MAYV.

Los rocaglatos son compuestos naturales extraídos de plantas del género *Aglaia*, y se ha descrito que estos compuestos, además de tener estructuras químicas complejas, inhiben la síntesis de proteínas virales al unirse a la helicasa de eIF4A, lo que afecta la iniciación de la traducción viral (Agarwal, Chang, Soejarto, y Kinghorn, 2021). Esto fue corroborado al obtener una inhibición en la expresión de las proteínas virales evaluadas. Sin embargo, para profundizar más en qué etapa del virus estaba actuando el compuesto, se decidió evaluar distintas etapas de la replicación viral. Estos resultados indican que el pretratamiento de las células o la adición del compuesto en etapas tardías afectan la replicación del MAYV, sin embargo, la unión y entrada del virus no se ven afectadas por el compuesto.

Se ha descrito que los rocaglatos funcionan como inhibidores interfásicos, estabilizando la asociación entre eIF4A y el ARN, lo que puede llevar a la formación de barreras estéricas que bloquean la iniciación de los ribosomas (Chu et al., 2019). En este sentido, el pretratamiento de las células con Zotatifin es capaz de reducir la replicación del MAYV. Por otra parte, la reducción de título viral en los ensayos de post-entrada, pueden estar indicando que el compuesto tiene potencial terapéutico no solo como profiláctico, sino también como tratamiento post-infección.

Debido a que Zotatifin mostró un fuerte efecto antiviral contra el MAYV, se decidió evaluar el efecto de este compuesto en otros virus de ARN de diferentes familias, CHIKV, UNAV, IAV y VSV. Los resultados de estos ensayos muestran una clara inhibición de la replicación de estos virus y sus proteínas virales. Estos resultados en conjunto indican que Zotatifin inhibe eficientemente diferentes virus de ARN. Por último, luego de comprobar el efecto antiviral de Zotatifin en virus de ARN, se evaluó si este efecto antiviral también ocurría en VACV, un virus de ADN. Además, Zotatifin reduce la expresión de la proteína E3L de VACV, lo que indica un posible efecto antiviral sobre este virus.

Todos estos resultados sugieren que Zotatfin puede ser un antiviral de amplio espectro. Esta hipótesis la han sugerido distintos autores. Además, de su actividad antiviral, los rocaglatos se han descrito como posibles anticancerígenos, antiparasitarios y antitumorales (Agarwal et al., 2021; Cao et al., 2021; Chu et al., 2019; Ebada et al., 2011; Langlais et al., 2018; Müller et al., 2020; Obermann et al., 2022; Victoria et al., 2024). Más importante, estos estudios han demostrado que no se observa una disminución en la sensibilidad a los rocaglatos, lo que sugiere que es poco probable que surjan mutantes de escape viral, puesto que se está actuando sobre el hospedero y no sobre el virus (Obermann et al., 2022).

Sin embargo, a pesar del potencial antiviral de amplio espectro de Zotatfin, es importante considerar que la inhibición de eIF4A también puede tener efectos sobre el sistema inmunitario, como la reducción de la proliferación de macrófagos humanos primarios derivados de monocitos (MdMs) y células T y B, lo que podría requerir ajustes en la dosificación para evitar una supresión inmunológica excesiva en ensayos clínicos. Sin embargo, este trabajo se llevó a cabo mediante estudios *in vitro*, por lo que se requieren más estudios *in vivo* y ensayos clínicos que permitan desarrollar tratamientos antivirales efectivos y seguros.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y

RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de este estudio son:

- Las células SH-SY5Y son susceptibles a la infección con el MAYV y el UNAV.
- Las células diferenciadas con ácido retinoico y factor neurotrófico derivado del cerebro muestran características morfológicas de neuronas maduras y expresan marcadores neuronales.
- El MAYV infecta eficientemente las células SH-SY5Y independientemente de su estado de diferenciación.
- La infección por el MAYV promueve un estado antiviral general independientemente del estado de diferenciación celular.
- Los compuestos derivados de rocaglatos son bien tolerados a concentraciones nano molares en células HDF's, SY-SY5Y y HMC3.
- Los rocaglatos Zotatfin y CR1-31B reducen la producción de progenie viral del MAYV en distintas líneas celulares humanas de manera dependiente de la dosis probada.
- Zotatfin reduce los niveles de las proteínas E1 y nsP1 del MAYV.
- El rocaglato Zotatfin inhibe la replicación del MAYV independientemente de la cepa de virus probada.
- El tratamiento con Zotatfin inhibe la infección del MAYV a diferentes etapas del ciclo viral.
- El Zotatfin disminuye la producción de progenie viral de los arbovirus, UNAV y CHIKV de manera dependiente de la dosis.
- Zotatfin también muestra un efecto antiviral contra los virus IAV y VSV.
- Zotatfin reduce los niveles de las proteínas NP de IAV, GFP de VSV y E3L del virus Vaccinia.
- Zotatfin puede ser un antiviral de amplio espectro.

RECOMENDACIONES

- Sería interesante estudiar en organoides cerebrales y modelos animales el efecto de la infección del MAYV y comprobar si los resultados obtenidos coinciden en ambos estudios.
- Si existe la posibilidad, también sería útil visualizar las partículas virales en células diferenciadas a neuronas, mediante microscopia electrónica.
- Estudios en modelos animales y humanos son necesarios para validar la efectividad y tolerancia de Zotatfin.
- Se deben explorar otros posibles mecanismos de acción de los rocaglatos como antivirales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelnabi, R., y Delang, L. (2020). Antiviral Strategies against Arthritogenic Alphaviruses. *Microorganisms*, 8(1365), 1-18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091365>
- Acosta-Ampudia, Y., Monsalve, D. M., Rodríguez, Y., Pacheco, Y., Anaya, J. M., y Ramírez-Santana, C. (2018). Mayaro: an emerging viral threat? *Emerging Microbes & Infections*, 7(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0163-5>
- Agarwal, G., Chang, L. S., Soejarto, D. D., y Kinghorn, A. D. (2021). Update on Phytochemical and Biological Studies on Rocaglate Derivatives from Aglaia Species. *Planta medica*, 87(12-13), 937. <https://doi.org/10.1055/A-1401-9562>
- Albrecht, T., Fons, M., Boldogh, I., y Rabson, A. S. (1996). Effects on Cells. *Medical Microbiology*. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7979/>
- Anderson, C. R., Downs, W. G., Wattley, G. H., Ahin, N. W., y Reese, A. A. (1957). Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, B.W.I. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 6(6), 1012-1016. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.1957.6.1012>
- Andreolla, A. P., Borges, A. A., Bordignon, J., y Duarte dos Santos, C. N. (2022). Mayaro Virus: The State-of-the-Art for Antiviral Drug Development. *Viruses*, 14(8), 1787. <https://doi.org/10.3390/v14081787>
- Auguste, A. J., Liria, J., Forrester, N. L., Giambalvo, D., Moncada, M., Long, K. 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., y Rossi, S. L. (2020). Epidemic Alphaviruses : Ecology , Emergence and Outbreaks. *Microorganisms*, 8(8), 1167. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081167>

- Bektas, N., Noetzel, E., Veeck, J., Press, M. F., Kristiansen, G., Naami, A., ... Dahl, E. (2008). The ubiquitin-like molecule interferon-stimulated gene 15 (ISG15) is a potential prognostic marker in human breast cancer. *Breast cancer research : BCR*, 10(4). <https://doi.org/10.1186/BCR2117>
- Bengue, M., Ferraris, P., Barthelemy, J., Diagne, C. T., Hamel, R., Liégeois, F., ... Missé, D. (2021). Mayaro Virus Infects Human Brain Cells and Induces a Potent Antiviral Response in Human Astrocytes. *Viruses*, 13(3), 465. <https://doi.org/10.3390/v13030465>
- Brustolin, M., Bartholomeeusen, K., Rezende, T., Ariën, K. K., y Müller, R. (2024). Mayaro virus, a potential threat for Europe: vector competence of autochthonous vector species. *Parasites and Vectors*, 17(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/S13071-024-06293-7/FIGURES/3>
- Caicedo, E.-Y., Charniga, K., Rueda, A., Dorigatti, I., Mendez, Y., Hamlet, A., ... 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, T. F., da Silva Caetano, C. C., Almeida, L. T., Ferraz, A. C., Alves Vitoreti, V. M., ... de Brito Magalhães, C. L. (2018). Antiviral activity of silymarin against Mayaro virus and protective effect in virus-induced oxidative stress. *Antiviral Research*, 158, 8-12. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.07.023>
- Campos, D., Sugasti-Salazar, M., Valdés-Torres, P., Galán-Jurado, P. E., Zegarra, D., y González-Santamaría, J. (2024). Differential susceptibility of human microglia HMC3 cells and brain microvascular endothelial HBEC-5i cells to Mayaro and Una virus infection. *Frontiers in Virology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fviro.2023.1325282>
- Cao, Y., He, Y., Yang, L., y Luan, Z. (2021). Targeting eIF4A using rocaglate CR-1-31B sensitizes gallbladder cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis through

- the translational downregulation of c-FLIP. *Oncology Reports*, 45(1), 230.
<https://doi.org/10.3892/OR.2020.7856>
- Carrera, J.-P., Cucunubá, Z. M., Neira, K., Lambert, B., Pittí, Y., Liscano, J., ... Donnelly, C. A. (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.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-0408>
- Casals, J., y Whitman, L. (1957). Mayaro Virus: A New Human Disease Agent. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 6(6), 1004-1011.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1957.6.1004>
- Chen, F., Zhang, G., Yu, L., Feng, Y., Li, X., Zhang, Z., ... Pradhan, S. (2016). High-efficiency generation of induced pluripotent mesenchymal stem cells from human dermal fibroblasts using recombinant proteins. *Stem Cell Research and Therapy*, 7(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/S13287-016-0358-4/FIGURES/6>
- Christiaansen, A., Varga, S. M., y Spencer, J. V. (2015). Viral manipulation of the host immune response. *Current Opinion in Immunology*, 36, 54-60.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.06.012>
- Chu, J., Zhang, W., Cencic, R., Devine, W. G., Beglov, D., Henkel, T., ... Pelletier, J. (2019). Amidino-Rocaglates: A Potent Class of eIF4A Inhibitors. *Cell Chemical Biology*, 26(11), 1586-1593.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.08.008>
- de Oliveira Souza, R., Duarte Júnior, J. W. B., Della Casa, V. S., Santoro Rosa, D., Renia, L., y Claser, C. (2024). Unraveling the complex interplay: immunopathology and immune evasion strategies of alphaviruses with emphasis on neurological implications. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, 1421571.
<https://doi.org/10.3389/FCIMB.2024.1421571/BIBTEX>
- de Souza Costa, M. C., Siqueira Maia, L. M., Costa de Souza, V., Gonzaga, A. M., Correa de Azevedo, V., Ramos Martins, L., ... Dezengrini Shlessarenko, R.

- (2019). Arbovirus investigation in patients from Mato Grosso during Zika and Chikungunya virus introduction in Brazil, 2015–2016. *Acta Tropica*, 190, 395-402. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.12.019>
- Devhare, P. B., Chatterjee, S. N., Arankalle, V. A., y Lole, K. S. (2013). Analysis of Antiviral Response in Human Epithelial Cells Infected with Hepatitis E Virus. *PLOS ONE*, 8(5), e63793. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0063793>
- Dhanwani, R., Khan, M., Bhaskar, A. S. B., Singh, R., Patro, I. K., Rao, P. V. L., y Parida, M. M. (2012). Characterization of Chikungunya virus infection in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: Role of apoptosis in neuronal cell death. *Virus Research*, 163(2), 563-572. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.12.009>
- Diagne, C. T., Bengue, M., Choumet, V., Hamel, R., Pompon, J., y Missé, D. (2020). Mayaro Virus Pathogenesis and Transmission Mechanisms. *Pathogens*, 9(9), 738. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090738>
- Dos Santos, A. E., Kuster, R. M., Yamamoto, K. A., Salles, T. S., Campos, R., De Meneses, M. D. F., ... Ferreira, D. (2014). Quercetin and quercetin 3-O-glycosides from *Bauhinia longifolia* (Bong.) Steud. show anti-Mayaro virus activity. *Parasites and Vectors*, 7(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-130>
- dos Santos Souza Marinho, R., Duro, R. L. S., Bellini Caldeira, D., Galinskas, J., Oliveira Mota, M. T., Hunter, J., ... Vasconcelos Komninakis, S. (2022). Re-emergence of mayaro virus and coinfection with chikungunya during an outbreak in the state of Tocantins/Brazil. *BMC Research Notes*, 15(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/S13104-022-06153-6/TABLES/2>
- Dravid, A., Raos, B., Svirskis, D., y O'Carroll, S. J. (2021). Optimised techniques for high-throughput screening of differentiated SH-SY5Y cells and application for neurite outgrowth assays. *Scientific Reports*, 11(1), 23935. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03442-1>
- Ebada, S. S., Lajkiewicz, N., Porco, J. A., Li-Weber, M., y Proksch, P. (2011). Chemistry and Biology of Rocaglamides (= Flavaglines) and Related

- Derivatives from Aglaia Species (Meliaceae). *Progress in the chemistry of organic natural products*, 94, 1. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0748-5_1
- Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Ceña, V., ... Comella, J. X. (2000). Sequential Treatment of SH-SY5Y Cells with Retinoic Acid and Brain-Derived Neurotrophic Factor Gives Rise to Fully Differentiated, Neurotrophic Factor-Dependent, Human Neuron-Like Cells. *Journal of Neurochemistry*, 75(3), 991-1003. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.2000.0750991.X>
- Ernst, J. T., Thompson, P. A., Nilewski, C., Sprengeler, P. A., Sperry, S., Packard, G., ... Reich, S. H. (2020). Design of Development Candidate eFT226, a First in Class Inhibitor of Eukaryotic Initiation Factor 4A RNA Helicase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(11), 5879-5955. https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.0C00182/SUPPL_FILE/JM0C00182_SI_010.CSV
- Esposito, D. L. A., y Fonseca, B. A. L. da. (2017a). Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 21(5), 540-544. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.06.002>
- Esposito, D. L. A., y Fonseca, B. A. L. da. (2017b). Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 21(5), 540-544. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.06.002>
- Fan, Y., Sanyal, S., y Bruzzone, R. (2018). Breaking Bad: How Viruses Subvert the Cell Cycle. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2018.00396>
- Ferraz, A. C., Almeida, L. T., da Silva Caetano, C. C., da Silva Menegatto, M. B., Souza Lima, R. L., de Senna, J. P. N., ... Lopes de Brito Magalhães, C. (2021). Hepatoprotective, antioxidant, anti-inflammatory, and antiviral activities of silymarin against mayaro virus infection. *Antiviral Research*, 194, 105168. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2021.105168>

- Figueiredo, C. M., Neris, R. L. da S., Gavino-Leopoldino, D., da Silva, M. O. L., Almeida, J. S., dos-Santos, J. S., ... Assunção-Miranda, I. (2019). Mayaro Virus Replication Restriction and Induction of Muscular Inflammation in Mice Are Dependent on Age, Type-I Interferon Response, and Adaptive Immunity. *Frontiers in Microbiology*, 10, 477269. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02246/BIBTEX>
- Figueiredo, M. L. G. de, y 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>
- Fros, J., y Pijlman, G. (2016). Alphavirus Infection: Host Cell Shut-Off and Inhibition of Antiviral Responses. *Viruses*, 8(6), 166. <https://doi.org/10.3390/v8060166>
- Fumagalli, M. J., de Souza, W. M., de Castro-Jorge, L. A., de Carvalho, R. V. H., Castro, Í. de A., de Almeida, L. G. N., ... Figueiredo, L. T. M. (2021). Chikungunya Virus Exposure Partially Cross-Protects against Mayaro Virus Infection in Mice. *Journal of virology*, 95(23). <https://doi.org/10.1128/JVI.01122-21>
- Ganjan, N., y Riviere-Cinamond, A. (2020). Mayaro virus in Latin America and the Caribbean. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 44(14), 1-11. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.14>
- García-Romero, C., Carrillo Bilbao, G. A., Navarro, J. C., Martin-Solano, S., y Saegerman, C. (2023). Arboviruses in Mammals in the Neotropics: A Systematic Review to Strengthen Epidemiological Monitoring Strategies and Conservation Medicine. *Viruses* 2023, Vol. 15, Page 417, 15(2), 417. <https://doi.org/10.3390/V15020417>
- Gerson-Gurwitz, A., Young, N. P., Goel, V. K., Eam, B., Stumpf, C. R., Chen, J., ... Thompson, P. A. (2021). Zotatfin, an eIF4A-Selective Inhibitor, Blocks Tumor Growth in Receptor Tyrosine Kinase Driven Tumors. *Frontiers in oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FONC.2021.766298>

- Goh, V. S. L., Mok, C.-K., y Chu, J. J. H. (2020). Antiviral Natural Products for Arbovirus Infections. *Molecules*, 25(12), 2796. <https://doi.org/10.3390/molecules25122796>
- Gould, E., Pettersson, J., Higgs, S., Charrel, R., y de Lamballerie, X. (2017). Emerging arboviruses: Why today? *One Health*, 4, 1-13. <https://doi.org/10.1016/J.ONEHLT.2017.06.001>
- Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., ... Missé, D. (2015). Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *Journal of Virology*, 89(17), 8880-8896. https://doi.org/10.1128/JVI.00354-15/SUPPL_FILE/ZJV999090703SO1.PDF
- Hernández-Sarmiento, L. J., Tamayo-Molina, Y. S., Valdés-López, J. F., y Urcuqui-Inchima, S. (2024). Mayaro virus infection elicits a robust pro-inflammatory and antiviral response in human macrophages. *Acta Tropica*, 252, 107146. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2024.107146>
- Hotez, P. J., y Murray, K. O. (2017). Dengue, West Nile virus, chikungunya, Zika—and now Mayaro? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(8), 1-5. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005462>
- Hozé, N., Salje, H., Rousset, D., Fritzell, C., Vanhomwegen, J., Bailly, S., ... Cauchemez, S. (2020). Reconstructing Mayaro virus circulation in French Guiana shows frequent spillovers. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16516-x>
- Hromadkova, L., Bezdekova, D., Pala, J., Schedin-Weiss, S., Tjernberg, L. O., Hoschl, C., y Ovsepian, S. V. (2020). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes molecular polarization and differentiation of immature neuroblastoma cells into definitive neurons. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1867(9), 118737. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2020.118737>
- Huckestein, B. R., y Alcorn, J. F. (2022). Improving Mitochondrial Function in Viral Infection: Targeting Cellular Metabolism. *American Journal of Respiratory Cell*

and Molecular Biology, 66(6), 598-600. <https://doi.org/10.1165/RCMB.2022-0096ED>

Iwamura, T., Guzman-Holst, A., y Murray, K. A. (2020). Accelerating invasion potential of disease vector *Aedes aegypti* under climate change. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16010-4>

Józefiak, A., Larska, M., Pomorska-Mól, M., y Ruszkowski, J. J. (2021). The IGF-1 Signaling Pathway in Viral Infections. *Viruses*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/V13081488>

Kaufmann, S. H. E., Dorhoi, A., Hotchkiss, R. S., y Bartenschlager, R. (2017). Host-directed therapies for bacterial and viral infections. *Nature Reviews Drug Discovery* 2017 17:1, 17(1), 35-56. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.162>

Khwanraj, K., Phruksaniyom, C., Madlah, S., y Dharmasaroja, P. (2015). Differential Expression of Tyrosine Hydroxylase Protein and Apoptosis-Related Genes in Differentiated and Undifferentiated SH-SY5Y Neuroblastoma Cells Treated with MPP(.). *Neurology research international*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/734703>

Kovalevich, J., y Langford, D. (2013). Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1078, 9. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5_2

Langlais, D., Cencic, R., Moradin, N., Kennedy, J. M., Ayi, K., Brown, L. E., ... Gros, P. (2018). Rocaglates as dual-targeting agents for experimental cerebral malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(10), E2366-E2375. https://doi.org/10.1073/PNAS.1713000115/SUPPL_FILE/PNAS.201713000SI.PDF

Levi, L. I., y Vignuzzi, M. (2019). Arthritogenic Alphaviruses: A Worldwide Emerging Threat? *Microorganisms*, 7(5), 133. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050133>

- Liu, S., Wang, W., Brown, L. E., Qiu, C., Lajkiewicz, N., Zhao, T., ... Wang, T. T. (2015). A Novel Class of Small Molecule Compounds that Inhibit Hepatitis C Virus Infection by Targeting the Prohibitin-CRaf Pathway. *EBioMedicine*, 2(11), 1600-1606. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.09.018>
- Lopes Marques, C. D., Ranzolin, A., Cavalcanti, N. G., y Branco Pinto Duarte, A. L. (2020). Arboviruses related with chronic musculoskeletal symptoms. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 34(4), 101502. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2020.101502>
- Lorenz, C., Azevedo, T. S., Virginio, F., Aguiar, B. S., Chiaravalloti-Neto, F., y 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>
- Lozach, P. Y. (2020). Cell Biology of Viral Infections. *Cells*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/CELLS9112431>
- Luplertlop, N., Suwanmanee, S., Muangkaew, W., Ampawong, S., Kitisin, T., y Poovorawan, Y. (2017). The impact of Zika virus infection on human neuroblastoma (SH-SY5Y) cell line. *Journal of Vector Borne Diseases*, 54(3). <https://doi.org/10.4103/0972-9062.217611>
- Mahajan, S., Choudhary, S., Kumar, P., y Tomar, S. (2021). Antiviral strategies targeting host factors and mechanisms obliging +ssRNA viral pathogens. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 46, 116356. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2021.116356>
- Marinho, M. dos S., Ferreira, G. M., Grosche, V. R., Nicolau-Junior, N., Campos, T. de L., Santos, I. A., y Jardim, A. C. G. (2024). Evolutionary Profile of Mayaro Virus in the Americas: An Update into Genome Variability. *Viruses*, 16(5), 809. <https://doi.org/10.3390/V16050809/S1>
- Martin, E. R., Gandawijaya, J., y Oguro-Ando, A. (2022). A novel method for generating glutamatergic SH-SY5Y neuron-like cells utilizing B-27 supplement.

Frontiers in Pharmacology, 13, 943627.
<https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.943627/BIBTEX>

Meganck, R. M., y Baric, R. S. (2021). Developing therapeutic approaches for twenty-first-century emerging infectious viral diseases. *Nature Medicine* 2021 27:3, 27(3), 401-410. <https://doi.org/10.1038/S41591-021-01282-0>

Mohamad Nasir, N. F., Mohd Hazli, M. S. H., Shamsuddin, S., y Zainuddin, A. (2024). Alteration of mature neuronal marker of β -III tubulin expression in differentiated SH-SY5Y cells by refinement of foetal bovine serum concentration. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 13(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/S43088-024-00547-0/FIGURES/3>

Montero, H., Pérez-Gil, G., y Sampieri, C. L. (2019). Eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) during viral infections. *Virus Genes*, 55(3), 267-273. <https://doi.org/10.1007/S11262-019-01641-7/FIGURES/3>

Müller, C., Obermann, W., Karl, N., Wendel, H. G., Taroncher-Oldenburg, G., Pleschka, S., ... Ziebuhr, J. (2021). The rocaglate CR-31-B (-) inhibits SARS-CoV-2 replication at non-cytotoxic, low nanomolar concentrations in vitro and ex vivo. *Antiviral Research*, 186, 105012. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2021.105012>

Müller, C., Obermann, W., Schulte, F. W., Lange-Grünweller, K., Oestereich, L., Elgner, F., ... Grünweller, A. (2020). Comparison of broad-spectrum antiviral activities of the synthetic rocaglate CR-31-B (-) and the eIF4A-inhibitor Silvestrol. *Antiviral Research*, 175, 104706. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2020.104706>

Mutricy, R., Matheus, S., Mosnier, É., Martinez-Lorenzi, E., De Laval, F., Nacher, M., ... Epelboin, L. (2022). Mayaro virus infection in French Guiana, a cross sectional study 2003-2019. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 99. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2022.105243>

- Navarrete-Espinosa, J., y Gómez-Dantés, H. (2006). Arbovirus causales de fiebre hemorrágica en pacientes del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 44(4), 347-353.
- Nebigil, C. G., Moog, C., Vagner, S., Benkirane-Jessel, N., Smith, D. R., y Désaubry, L. (2020). Flavaglines as natural products targeting eIF4A and prohibitins: From traditional Chinese medicine to antiviral activity against coronaviruses. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 203, 112653. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2020.112653>
- O Mota, M., Avilla, C. M., y Nogueira, M. L. (2019). Mayaro virus : a neglected threat could cause the next worldwide viral epidemic. *Future Virology*, 14(6), 375-377. <https://doi.org/10.2217/fvl-2019-0051>
- Obermann, W., Friedrich, A., Madhugiri, R., Klemm, P., Mengel, J. P., Hain, T., ... Grünweller, A. (2022). Rocaglates as Antivirals: Comparing the Effects on Viral Resistance, Anti-Coronaviral Activity, RNA-Clamping on eIF4A and Immune Cell Toxicity. *Viruses*, 14(3), 519. <https://doi.org/10.3390/V14030519/S1>
- Organización Panamericana de la Salud, y Organización Mundial de la Salud. (2019). *Alerta Epidemiológica Fiebre de Mayaro*. Washington, DC. Recuperado de <https://www.paho.org/en/documents/epidemiological-alert-mayaro-fever-1-may-2019>
- Pereira, T. N., Carvalho, F. D., De Mendonça, S. F., Rocha, M. N., y Moreira, L. A. (2020). Vector competence of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes for Mayaro virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14(4), e0007518. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007518>
- Pereira, T. N., Virginio, F., Souza, J. I., y Moreira, L. A. (2021). Emergent Arboviruses: A Review About Mayaro virus and Oropouche orthobunyavirus. *Frontiers in Tropical Diseases*, 2(737436), 1-10. <https://doi.org/10.3389/fitd.2021.737436>
- Perez-Restrepo, L. S., Ciuoderis, K., Usuga, J., Moreno, I., Vargas, V., Arévalo-Arbelaiz, A. J., ... Osorio, J. E. (2024). Mayaro Virus as the cause of Acute

- Febrile Illness in the Colombian Amazon Basin. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1419637. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2024.1419637/BIBTEX>
- Power, G. M., Vaughan, A. M., Qiao, L., Clemente, N. S., Pescarini, J. M., Paixão, E. S., ... Brickley, E. B. (2022). Socioeconomic risk markers of arthropod-borne virus (arbovirus) infections: a systematic literature review and meta-analysis. *BMJ Global Health*, 7(4), e007735. <https://doi.org/10.1136/BMJGH-2021-007735>
- Proksch, P., Giaisi, M., Treiber, M. K., Palfi, K., Merling, A., Spring, H., ... Li-Weber, M. (2005). Rocaglamide derivatives are immunosuppressive phytochemicals that target NF-AT activity in T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(11), 7075-7084. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.174.11.7075>
- Robert, M. A., Stewart-Ibarra, A. M., y Estallo, E. L. (2020). Climate change and viral emergence: evidence from Aedes-borne arboviruses. *Current Opinion in Virology*, 40, 41-47. <https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2020.05.001>
- Sakuragi, S., Liao, H., Yajima, K., Fujiwara, S., y Nakamura, H. (2022). Rubella Virus Triggers Type I Interferon Antiviral Response in Cultured Human Neural Cells: Involvement in the Control of Viral Gene Expression and Infectious Progeny Production. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 9799. <https://doi.org/10.3390/IJMS23179799/S1>
- Sánchez-San Martín, C., Li, T., Bouquet, J., Streithorst, J., Yu, G., Paranjpe, A., y Chiu, C. Y. (2018). Differentiation enhances Zika virus infection of neuronal brain cells. *Scientific Reports*, 8(1), 14543. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32400-7>
- Santhi, V. P., Masilamani, P., Sriramavaratharajan, V., Murugan, R., Gurav, S. S., Sarasu, V. P., ... Ayyanar, M. (2021). Therapeutic potential of phytoconstituents of edible fruits in combating emerging viral infections. *Journal of food biochemistry*, 45(8), e13851. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13851>
- Santiago, F. W., Halsey, E. S., Siles, C., Vilcarromero, S., Guevara, C., Silvas, J. A., ... 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>
- Schoggins, J. W. (2019). Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annual Review of Virology*, 6(Volume 6, 2019), 567-584. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-VIROLOGY-092818-015756/CITE/REFWORKS>
- Shaneyfelt, M. E., Burke, A. D., Graff, J. W., Jutila, M. A., y Hardy, M. E. (2006). Natural products that reduce rotavirus infectivity identified by a cell-based moderate-throughput screening assay. *Virology Journal*, 3(1), 68. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-3-68>
- Shipley, M. M., Mangold, C. A., Kuny, C. V., y Szpara, M. L. (2017). Differentiated Human SH-SY5Y Cells Provide a Reductionist Model of Herpes Simplex Virus 1 Neurotropism. *Journal of Virology*, 91(23), 1-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00958-17>
- Shipley, M. M., Mangold, C. A., y Szpara, M. L. (2016). Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *Journal of Visualized Experiments*, 2016(108), 1-11. <https://doi.org/10.3791/53193>
- Singh, H., Koury, J., y Kaul, M. (2021). Innate Immune Sensing of Viruses and Its Consequences for the Central Nervous System. *Viruses 2021*, Vol. 13, Page 170, 13(2), 170. <https://doi.org/10.3390/V13020170>
- Skofler, C., Kleinegger, F., Krassnig, S., Birkel-Toeglhofer, A. M., Singer, G., Till, H., ... Haybaeck, J. (2021). Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A1: A Potential Novel Target in Neuroblastoma. *Cells 2021*, Vol. 10, Page 301, 10(2), 301. <https://doi.org/10.3390/CELLS10020301>
- Srichawla, B. S., Manan, M. R., Kipkorir, V., Dhali, A., Diebel, S., Sawant, T., ... Găman, M. A. (2024). Neuroinvasion of emerging and re-emerging arboviruses: A scoping review. *SAGE Open Medicine*, 12, 20503121241229850. <https://doi.org/10.1177/20503121241229847>

- Srihongse, S., Stacy, H. G., y 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.
- Stevenson, N. J., Murphy, A. G., Bourke, N. M., Keogh, C. A., Hegarty, J. E., y O'Farrelly, C. (2011). Ribavirin Enhances IFN- α Signalling and MxA Expression: A Novel Immune Modulation Mechanism during Treatment of HCV. *PLOS ONE*, 6(11), e27866. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0027866>
- Sugasti-Salazar, M., Campos, D., Valdés-Torres, P., Galán-Jurado, P. E., y González-Santamaría, J. (2022). Targeting Host PIM Protein Kinases Reduces Mayaro Virus Replication. *Viruses*, 14(2), 422. <https://doi.org/10.3390/v14020422>
- Sugasti-Salazar, M., Llamas-González, Y. Y., Campos, D., y 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>
- Tajudeen, Y. A., Oladipo, H. J., Oladunjoye, I. O., Mustapha, M. O., Mustapha, S. T., Abdullahi, A. A., ... El-Sherbini, M. S. (2022). Preventing the Next Pandemic through a Planetary Health Approach: A Focus on Key Drivers of Zoonosis. *Challenges* 2022, Vol. 13, Page 50, 13(2), 50. <https://doi.org/10.3390/CHALLE13020050>
- Thompson, P. A., Eam, B., Young, N. P., Fish, S., Chen, J., Barrera, M., ... Webster, K. R. (2021). Targeting Oncogene mRNA Translation in B-Cell Malignancies with eFT226, a Potent and Selective Inhibitor of eIF4A. *Molecular cancer therapeutics*, 20(1), 26-36. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-19-0973>
- Valdés-Torres, P., Campos, D., Bhakta, M., Galán-Jurado, P. E., Durant-Archibold, A. A., y González-Santamaría, J. (2022). Honokiol and Alpha-Mangostin Inhibit Mayaro Virus Replication through Different Mechanisms. *Molecules*, 27(21), 7362. <https://doi.org/10.3390/molecules27217362>

- Vazquez, C., y Jurado, K. A. (2022). Neurotropic RNA Virus Modulation of Immune Responses within the Central Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 4018, 23(7), 4018. <https://doi.org/10.3390/IJMS23074018>
- Victoria, C., Schulz, G., Klöhn, M., Weber, S., Holicki, C. M., Brüggemann, Y., ... Kirschning, A. (2024). Halogenated Rocaglate Derivatives: Pan-antiviral Agents against Hepatitis E Virus and Emerging Viruses. *Journal of Medicinal Chemistry*, 67(1), 289-321. https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.3C01357/SUPPL_FILE/JM3C01357_SI_001.CSV
- Wardlaw, C. P., y Petrini, J. H. J. (2023). ISG15: A Link between Innate Immune Signaling, DNA Replication and Genome Stability. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 45(7), e2300042. <https://doi.org/10.1002/BIES.202300042>
- Young, P. R. (2018). Arboviruses: A Family on the Move. *Advances in experimental medicine and biology*, 1062, 1-10. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8727-1_1
- Zhang, R., Kim, A. S., Fox, J. M., Nair, S., Basore, K., Klimstra, W. B., ... Diamond, M. S. (2018). Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. *Nature*, 557(7706), 570-574. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0121-3>
- Zhang, S., Carriere, J., Lin, X., Xie, N., y Feng, P. (2018). Interplay between Cellular Metabolism and Cytokine Responses during Viral Infection. *Viruses*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/V10100521>
- Zhou, X., Jiang, W., Liu, Z., Liu, S., y Liang, X. (2017). Virus Infection and Death Receptor-Mediated Apoptosis. *Viruses*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/V9110316>

ANEXOS

1- Congresos

Parte de estos resultados fueron presentados en los congresos: APANAC de Panamá (Panamá, 2023), PANDENGUE en Perú (Lima, 2023) y el Congreso Nacional de Virología de España (Santiago de Compostela, 2024).





7th PAN-AMERICAN DENGUE RESEARCH NETWORK MEETING



Lima, Peru November 13-16, 2023



Certificate of participation awarded to:

PATRICIA ALEJANDRA VALDÉS

Mariana Leguia, PhD

Chair, 7th PanDengue Net Meeting
Directora, Laboratorio de Genómica
Pontificia Universidad Católica del Perú

Carlos A. Sariol, MD

Secretary, PanDengue Net
Director, Unit of Comparative Medicine
Universidad de Puerto Rico



XVII

CONGRESO NACIONAL
DE VIROLOGÍA



CERTIFICADO DE COMUNICACIÓN

El trabajo titulado:

“Evaluation of Rocaglates as antiviral agents against Mayaro virus”

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

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

Jesús López Romalde
Presidente Comité Organizador

2- Pasantías

Se realizó una pasantía en el Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS), de la Universidad de Santiago de Compostela, España.

Algunos de los resultados obtenidos en esta tesis fueron llevados a cabo en los laboratorios del CIMUS en España, bajo la tutoría de la doctora Carmen Rivas, gracias al financiamiento de proyectos de movilidad de la SENACYT. Durante esta estancia también se realizó una presentación oral del proyecto a los investigadores del centro.

3- Financiamiento

Parte de este trabajo de investigación fue financiado mediante el programa de nuevos investigadores de la SENACYT (contrato 098-2023), el Ministerio de Economía y Finanzas (MEF, Proyecto 19911.012) y el Sistema Nacional de Investigación de la SENACYT (J.G.-S.).



Santiago de Compostela, 10 de Octubre de 2024

A quien pueda interesar:

Por este medio certifico que la Licda. Patricia Valdés Torres con cédula de identidad personal No. 9-754-1127, ha realizado una pasantía en el Laboratorio de Virus y Cáncer bajo mi supervisión, en el Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas, de la Universidad de Santiago de Compostela, España. Esta pasantía inició el día 13 de Mayo de 2024 y terminó el día 13 de Julio del año 2024.

Atentamente,

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

CIMUS-USC, Av. de Barcelona s/n, 15782 Santiago de Compostela
www.usc.es/cimus mcarmen.rivas@usc.es cnvas@cnb.csic.es
Tel.: +34 88 181 5485 Fax +34 8818 15403