

Identificación y estudio de nuevas moléculas antivirales para Chikungunya

Tesis para optar por el título de Licenciatura en Biotecnología

Tesista: Lorenzo Vittone

Directora: Eliana Castro

Codirector: Diego Alvarez

Lugar de Trabajo: Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (Universidad Nacional de San Martín).

Agradecimientos:

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me acompañaron durante esta etapa de mi vida.

A todo el equipo del Laboratorio de Virología Molecular de la UNSAM, gracias por su constante apoyo y disposición a lo largo de mi Tesina. En especial, a Eliana y Diego, quienes con su paciencia, dedicación y guía invaluable hicieron de este proceso una experiencia enriquecedora.

A mis compañeros de camada, con quienes compartí clases, desafíos y aprendizajes durante la carrera. Gracias por ser un grupo extraordinario. En particular, quiero destacar a Lara, Gastón, Sofía y Candela, por haber estado siempre a mi lado, brindándome su amistad y apoyo incondicional.

.

Resumen:

La fiebre chikungunya es una enfermedad causada por el virus Chikungunya (CHIKV) que genera síntomas inflamatorios y debilitantes (artralgia, artritis y mialgia). Esta enfermedad es transmitida por los mosquitos *Aedes albopictus* y *Aedes aegypti*, y desde el brote epidémico en la isla La Reunión en 2005-2006, genera casos en áreas tropicales y subtropicales de Asia, África y las Américas, llegando al norte de Argentina. En la actualidad, no existen antivirales contra este virus, por lo que los tratamientos de la enfermedad son de apoyo y alivio de los síntomas.

En otras investigaciones se ha reportado que un grupo de compuestos químicos derivados del anillo de quinazolina funcionan como antivirales inhibidores de la polimerasa de distintos virus que, al igual que chikungunya, tienen un genoma de ARN. En base a la conservación estructural entre las polimerasas de estos virus, se hipotetiza que las 4-amino-quinazolininas presentan actividad antiviral contra CHIKV, probablemente con la polimerasa viral como blanco. Para abordar esta hipótesis se propone realizar un screening de actividad de ocho 4-amino-quinazolininas para identificar moléculas activas frente a CHIKV y caracterizar de forma preliminar su modo de acción antiviral.

Se evaluó el efecto antiviral de los compuestos *in vitro* utilizando un virus recombinante derivado de un clon infeccioso de CHIKV que expresa la proteína fluorescente Zs-Green como gen reportero y permite cuantificar la infección a partir del conteo de unidades formadoras de focos fluorescentes. La toxicidad de los compuestos se evaluó mediante ensayos de tinción con Violeta Genciana y MTS/PMS. Como resultado se identificaron dos compuestos activos (QMED2 y QMED3) que presentaron una concentración efectiva del 50% (CE_{50}) en el orden de micromolar y un índice de selectividad mayor a 50. Esta actividad se confirmó contra un aislamiento de CHIKV wild type mediante ensayos de rendimiento viral.

Dada su menor citotoxicidad, se seleccionó QMED2 para estudiar su modo de acción. Como una aproximación a la validación del blanco de acción de este compuesto se realizaron ensayos de tiempo de agregado de compuesto y de replicación en trans de una ARN subgenómico. Los resultados sugieren que QMED2 actuaría luego de la entrada y traducción del genoma viral, de manera similar a Favipiravir, un inhibidor de la polimerasa viral. De acuerdo a la hipótesis planteada, los resultados preliminares del ensayo de trans-replicación sugieren que QMED2 tendría como blanco alguna de las proteínas no estructurales que conforman al complejo de replicación viral.

En conclusión, se identificaron quinazolininas como potenciales antivirales para CHIKV. La caracterización biológica preliminar de su blanco será complementada en un futuro con la selección de virus resistentes que permitan definir su mecanismo y blanco de acción con mayor certeza. Finalmente, se realizarán modificaciones químicas sobre la molécula con el objetivo de optimizar la potencia antiviral frente a CHIKV de esta familia de compuestos.

Índice

Índice.....	1
Lista de Abreviaturas.....	3
Introducción.....	5
1. Fiebre de Chikungunya:.....	5
2. Epidemiología:.....	7
3. Prevención y Tratamientos:.....	9
4. Clasificación, Genoma y Morfología:.....	10
5. Ciclo de Replicación :.....	11
6. Polimerasas de ARN dependiente de ARN:.....	13
7. Antivirales:.....	14
8. Quinazolininas:.....	16
Hipótesis y Objetivos.....	17
Hipótesis:.....	17
Objetivos:.....	17
1. Identificar hits moleculares:.....	17
2. Estudiar el modo de acción antiviral:.....	17
Materiales y Metodología.....	19
1. Compuestos:.....	19
2. Células y virus:.....	19
4. Evaluación de la actividad antiviral de las 4-amino-quinazolininas frente a CHIKV-ZsGreen:.....	21
5. Evaluación de la citotoxicidad de las 4-amino-quinazolininas:.....	22
5.1. Estimación de la citotoxicidad utilizando Violeta de Genciana:.....	22
5.2. Determinación de la citotoxicidad utilizando MTS:.....	23
6. Obtención del stock Viral de CHIKV del linaje “La Reunión”:.....	23
7. Confirmación de la actividad antiviral de compuestos sobresalientes en CHIKV “La Reunión”:.....	25
7.1. Actividad antiviral contra CHIKV LR de QMED2 y QMED3 en células Vero:.....	25
7.2. Actividad antiviral contra CHIKV LR y citotoxicidad de QMED2 en células BHK:.....	26
8. Determinación del modo de acción de el/los compuestos seleccionados:.....	26
9. Determinación de la actividad sobre la replicasa viral:.....	28
9.1. Amplificación de los plásmidos para replicones:.....	29
9.2. Ensayo de Trans-Replicación:.....	30
10. Análisis Estadístico:.....	31
Resultados y Análisis.....	32
A. Identificación de 4-aminoquinazolininas con actividad antiviral contra CHIKV:.....	32
1. Obtención de stocks Virales y Titulación:.....	32
2. Evaluación de la actividad antiviral y citotoxicidad de las 4-amino-quinazolininas:.....	32
3. Confirmación de la actividad antiviral de compuestos sobresalientes frente a un aislamiento de CHIKV “La Reunión”:.....	36
3.1. Confirmación en células Vero:.....	36

3.2. Confirmación en células BHK:.....	37
B. Caracterización del modo de acción:.....	38
1. QMED2 actúa inhibiendo el ciclo de CHIKV en tiempos similares a Favipiravir, un inhibidor de la polimerasa viral:.....	38
2. Ensayo de replicación en trans de un ARN subgenómico reportero:.....	40
2.1. Obtención de plásmidos Rep, Rep-GAA y HSPoll-FG :.....	42
2.2. QMED2 tiene como blanco el complejo de replicación viral:.....	43
Discusión.....	45
Conclusión.....	47
Referencias:.....	48

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
AAD	Antivirales de acción directa
Abs	Absorbancia
Ads	Adsorción
CC	Control de células
CC ₅₀	Concentración citotóxica del 50%
CE ₅₀	Concentración efectiva del 50%
CHIKV	Virus de Chikungunya
CHIKV LR	Virus de Chikungunya del linaje “La Reunión”
CHIKV-ZsGreen	Virus de Chikungunya reportero
CIBION	Laboratorio de Química Medicinal del Centro de Investigaciones en Bionanociencias
CMV	Cytomegalovirus
CV	Control de virus
ECP	Efecto citopático
FDA	Administración de comida y drogas (Food and Drugs Administration)
Fluc	Luciferasa de Luciérnaga
Gluc	Luciferasa de Gaussia
IOL	Linaje del océano Índico
IS	Índice de selectividad
Linaje ECSA	Linaje de las regiones centrales, orientales y sur del continente Africano.
Linaje WA	Linaje del oeste del continente Africano.
MOI	Multiplicidad de infección
MTS	Tetrazolio[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sul fofenil)-2H-tetrazolio
Nsp	Proteína no estructural

PEI	Polietilenimina
PFA	Paraformaldehido
PMS	Metosulfato de fenazina
RdRp	Polimerasa de ARN dependiente de ARN
RLU	Unidades relativas de luminiscencia
SE	Semana epidemiológica
SG	Sub-genómico
T	Tratamiento
UFF	Unidad formadora de foco
UFP	Unidad formadora de placa

Introducción

1. *Fiebre de Chikungunya:*

La fiebre Chikungunya es una enfermedad causada por el virus Chikungunya (CHIKV). Tiene un inicio rápido y se caracteriza por astenia, artralgia, mialgia, dolor de cabeza y erupciones cutáneas [1]. En general, el inicio de los síntomas y su severidad está asociado a la viremia. El dolor articular es el síntoma característico de la infección con CHIKV, ocurre en la mayoría de los pacientes (95%), es simétrico y afecta las grandes articulaciones distales como piernas y brazos. A diferencia de otras enfermedades febriles causadas por virus transmitidos por mosquitos como el dengue, la mayoría de las personas infectadas con CHIKV presenta síntomas, con menos de un 15% de individuos asintomáticos [2].

La infección por CHIKV comienza cuando un mosquito *Aedes* infectado pica a un huésped humano. Durante la picadura, el virus se libera en la dermis y los capilares subcutáneos. Algunos estudios sugieren que la replicación inicial se da en fibroblastos, monocitos, macrófagos y células endoteliales. En 2 a 4 días, el virus llega al torrente sanguíneo y se disemina a otras partes del cuerpo. Los órganos blanco del CHIKV incluyen articulaciones, músculos, piel y, con menor frecuencia, hígado, riñones, ojos y el sistema nervioso central [3] (Figura 1 A). La fase aguda de la enfermedad se resuelve en el término de una semana, con la caída de la viremia asociada a la aparición de anticuerpos IgM como se muestra en la Figura 1B [4]. Adicionalmente, la infección con CHIKV induce una respuesta inmune de memoria que protege contra la reinfección.

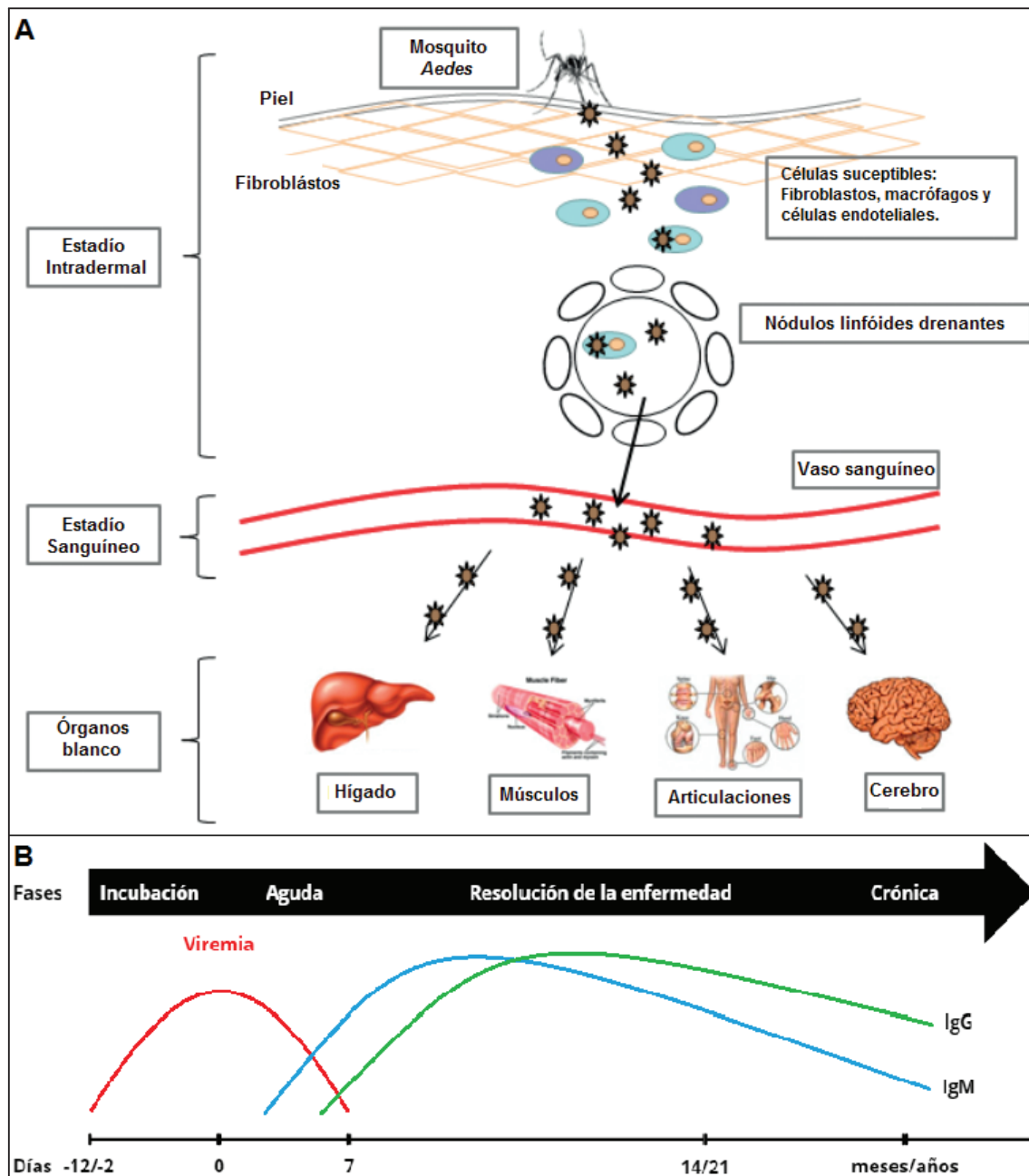


Figura 1: Esquema del desarrollo y resolución de la infección por el virus de Chikungunya. Extraído de [5]. En (A) infección del virus en diferentes tejidos. En (B), desarrollo de la enfermedad y respuesta inmune humoral en función del tiempo.

Los casos de infección con CHIKV que requieren hospitalización son raros y, en general, ocurren en personas con comorbilidades, en ancianos o en niños [1]. Dentro de las manifestaciones clínicas severas, CHIKV puede causar encefalopatías, miocarditis, hepatitis y falla multiorgánica. El reporte de

encefalopatías causadas por CHIKV ha aumentado en los últimos años, principalmente asociados a los brotes epidémicos de gran escala [6]. En este contexto, los neonatos representan un grupo de riesgo especial. Si bien CHIKV no infecta células trofoblásticas de la placenta como otros virus del mismo género, la transmisión del virus de la madre al hijo es frecuente en el contexto de la viremia materna durante el parto y, a menudo, resulta en la infección neonatal grave [7]. Por otro lado, en individuos sanos, la infección con CHIKV está asociada a dolor articular crónico que puede persistir por meses o años después de la infección en aproximadamente el 50% de los pacientes [8]. El dolor articular es severo y puede resultar discapacitante, lo que conlleva un elevado impacto socioeconómico [9]. En la actualidad, se desconoce si el dolor articular crónico es producto de la infección viral persistente o se debe a la respuesta inflamatoria asociada a la falta de eliminación de antígenos virales.

2. Epidemiología:

El virus CHIKV es originario del continente Africano, donde circula principalmente en un ciclo de transmisión selvático, transmitido por el mosquito *Aedes aegypti* y está asociado a brotes esporádicos en la población humana [10]. A partir del análisis genómico, se identificaron dos linajes en dicho continente asociados a distintas regiones geográficas: el linaje Africano occidental (WA, Western Africa) y el linaje Africano oriental y central (ECSA Eastern, Central and South Africa) [11].

A partir del siglo XVIII, CHIKV fue introducido en distintas ocasiones en el subcontinente Indio, donde fue responsable de brotes epidémicos de gran escala seguidos de largos períodos inter epidémicos [12]. Uno de estos eventos dio lugar a la diferenciación de un tercer linaje, el linaje Asiático, que divergió del linaje ECSA y fue responsable de la infección de miles de personas en la década de 1960 en India y el sudeste asiático [11]. A diferencia de brotes anteriores, el linaje Asiático se estableció en la región y continúa en circulación en la actualidad [13].

Después de estar circunscrito a las regiones tropicales de África y Asia, en las últimas dos décadas CHIKV se propagó a escala global. En el año 2004, luego de un brote en Kenya causado por un virus del linaje ECSA, CHIKV se expandió a

numerosas islas del Océano Índico, dentro de las cuales se encuentra la Isla La Reunión [14]. En los años subsiguientes, el virus continuó expandiéndose y causó brotes epidémicos en distintos países del sudeste asiático y, por primera vez, se observó circulación autóctona de CHIKV en Europa [15]. Las cepas de CHIKV asociadas con este brote epidémico forman un clado monofilético derivado del linaje ECSA, que se denomina linaje IOL (Indian Ocean Linage) [16]. Este linaje se propagó principalmente mediante el mosquito *Aedes alpotictus*.

En el año 2013, se registró el primer caso de transmisión local de CHIKV en el continente Americano [17]. El caso fue reportado en la isla caribeña de Saint Martin y fue causado por la introducción de un virus del linaje Asiático (Figura 2). Desde entonces, cerca de 50 países del continente han reportado circulación autóctona de CHIKV y el virus ha infectado a más de tres millones de personas [18, 19]. En la actualidad, el cono sur es uno de los principales focos de circulación de CHIKV. Desde el 2019, Brasil registra más de 100.000 casos por año. En América, en el 2024 y hasta la SE 14, se notificaron 186.274 casos, incluyendo 60 defunciones por chikungunya, con el 97% de los casos notificados en Brasil (n=180.600) [20]. En Argentina, desde la SE 31 del 2023 y hasta la la SE 14 del 2024, se notificaron un total de 389 casos confirmados y probables. Del total de casos, 262 no tuvieron antecedentes de viaje, 33 fueron importados y 94 se encontraban en investigación. Los casos autóctonos se registraron, en su mayoría, en las provincias de Salta (n=63), Chaco (n=59), Santa Fe (n=50), Buenos Aires (n=45) y Misiones (n=20) [20]. En América, la circulación de CHIKV está asociada a dos variantes epidémicas, una variante derivada del linaje Asiático y otra derivada del linaje ECSA, distinta de la variante IOL, que circula principalmente en Brasil [21-23].

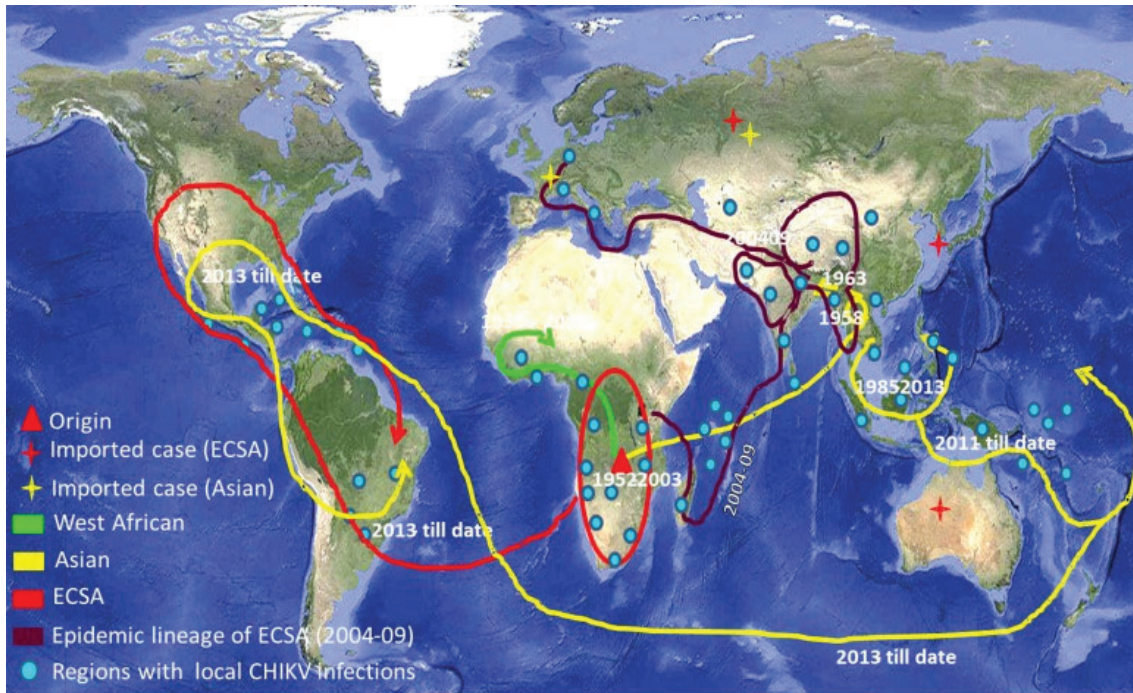


Figura 2: Epidemiología de CHIKV y sus distintos linajes en el mundo y a lo largo del tiempo. Extraído de [24].

3. Prevención y Tratamientos:

En la actualidad, la manera de prevenir la infección por CHIKV es mediante el control de la población de los vectores, *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*.

A finales de 2023 la FDA aprobó Ixchiq (Valneva), una vacuna de virus atenuado contra CHIKV para personas mayores de 18 años, y con un alto riesgo de exposición al virus [25, 26]. Sin embargo se requiere realizar más pruebas para evaluar el riesgo de efectos adversos similares a la infección por CHIKV, y la vacuna sólo está aprobada en la Unión Europea, Canadá y Estados Unidos [27], por lo cual aún no está disponible en países con alta circulación viral.

En la actualidad no existen antivirales efectivos para el tratamiento de las infecciones por CHIKV, por lo que los tratamientos de la enfermedad son de acompañamiento y alivio sintomático, pero no resuelven la infección de manera directa ni evitan el desarrollo de la artritis crónica [28].

4. Clasificación, Genoma y Morfología:

CHIKV es un Alfavirus de la familia *Togaviridae*, con un genoma de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 12 Kb, delimitado por dos regiones no codificantes. El ARN genómico codifica 4 proteínas no estructurales (nsp1-4) en el primer marco de lectura abierto (ORF) y 5 proteínas estructurales (C, E3, E2, 6K y E1) en el segundo ORF, como se observa en la Figura 3A. Mientras que el primer ORF se traduce directamente a partir del genoma de ARN del virus, el segundo ORF se traduce a partir de un ARNm que se sintetiza luego de la replicación del ARN de polaridad negativa, bajo un promotor específico (promotor subgenómico), y solo representa una fracción del genoma completo del virus.

La partícula viral es envuelta, con 80 heterotrímeros de las glicoproteínas transmembrana E2 y E1 en su superficie (Figura 3B) [3].

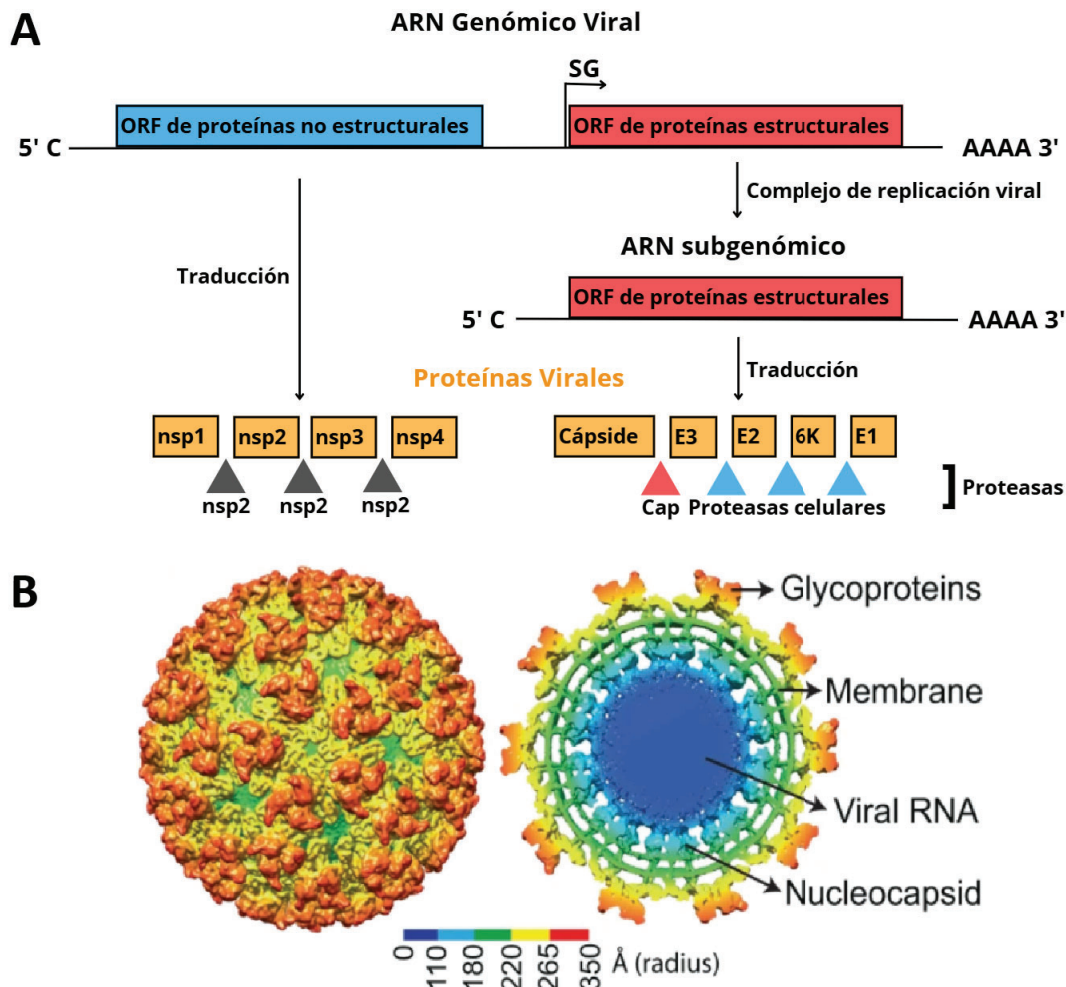


Figura 3: Genoma de CHIKV y morfología de un alfavirus. En (A), representación esquemática del genoma de CHIKV y el procesamiento de las proteínas que codifica. SG: promotor subgenómico. En (B) modelo de partícula viral de CHIKV, con escala de colores en función del radio, de azul en el centro, a rojo en la superficie. Extraído de [29]

5. Ciclo de Replicación :

A nivel celular, en mamíferos, la infección comienza con la adsorción (Figura 4), cuando E2 reconoce un receptor específico, aún no descrito, en la superficie celular, lo que desencadena una endocitosis mediada por clatrina, aunque en células musculares también se ha descrito la entrada del virus por pinocitosis y macropinocitosis [30]. Luego, la vesícula de clatrina con la partícula viral se fusiona a un endosoma temprano, donde la disminución del pH produce cambios conformacionales en E1, lo que lleva a una desestabilización de los heterotrímeros E2/E1, separando estas proteínas. Luego E1 expone e inserta en la membrana endosomal un loop de fusión, y homotrimeriza, resultando en la fusión entre la membrana endosomal y la envoltura viral, de manera que la cápside se libera al citoplasma, donde se desensambla y libera el genoma viral.

Una vez liberado el genoma viral en el citoplasma, este se traduce directamente por los ribosomas de la célula, generando las poliproteínas no estructurales P123 y P1234. Ambas poliproteínas se producen a partir del mismo ORF, el cual contiene un codón de terminación de la traducción entre nsp3 y nsp4 que a veces se saltea, dando lugar a la formación de estas poliproteínas. La proteína nsp2 contenida en estas poliproteínas tiene actividad proteasa en cis, y produce las proteínas no estructurales nsp1, nsp2, nsp3 y nsp4 (Figura 3A). La proteína nsp1 madura tiene actividad N7-guanina metiltransferasa y guanililtransferasa, por lo que coloca el CAP a los ARN que se generarán más adelante en el ciclo de replicación viral. Nsp2, además de actividad proteasa, tiene actividad NTPasa, ARN trifosfatasa y ARN helicasa, y también desempeña un papel en la inhibición de la respuesta antiviral celular apagando la transcripción mediante la degradación de la ARN polimerasa II y la inhibición de la vía de señalización JAK/STAT [31, 32]. Nsp3 tiene dominios de

interacción con ARN y proteínas celulares, y nsp4 es la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). Todas estas proteínas forman en conjunto un complejo de replicación o replicasa que se aloja en unas estructuras llamadas esférulas, que son el producto de la evaginación de la membrana plasmática. Dentro de estas estructuras se produce la replicación del ARN viral, y los intermediarios de ARN doble cadena quedan protegidos de receptores de patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) como RIG-I [33].

Durante la replicación del ARN, se produce ARN de polaridad negativa, y a partir de este se produce tanto el ARN genómico, de polaridad positiva, como el ARN subgenómico, el cual está controlado por un promotor subgenómico y codifica la poliproteína que contiene a las 5 proteínas estructurales que más adelante conformarán la cápside y las proteínas transmembrana de la envoltura viral (Figura 4). Luego las esférulas se internalizan y forman estructuras llamadas vacuolas citopáticas de tipo 1 (CVP-I), y luego de la síntesis de la proteína de cápside (C), se forman vacuolas citopáticas de tipo 2 (CVP-II) [33].

La poliproteína estructural se auto procesa en cápside y pE26KE1 a medida que se traduce. La proteína cápside se une al ARN viral y facilita la formación de la nucleocápside. La proteína pE26KE1 es clivada por proteasas celulares en pE2, 6K y E1 en el retículo endoplásmico. La pE2 y E1 forman heterotrímeros que se transportan al Golgi, donde son postraduccionalmente modificados y pE2 es clivado en E2 y E3. Luego estas glicoproteínas modificadas son insertadas en la membrana plasmática [34].

Las partículas virales inmaduras pasan por la vía del retículo endoplásmico y Golgi, y adquieren su envoltura lipídica durante la brotación. Las proteínas E1 y E2 ya se encuentran en la membrana plasmática, y se cree que la interacción entre el dominio citosólico de E2 y las proteínas de la cápside inducen la brotación de las partículas virales [33].

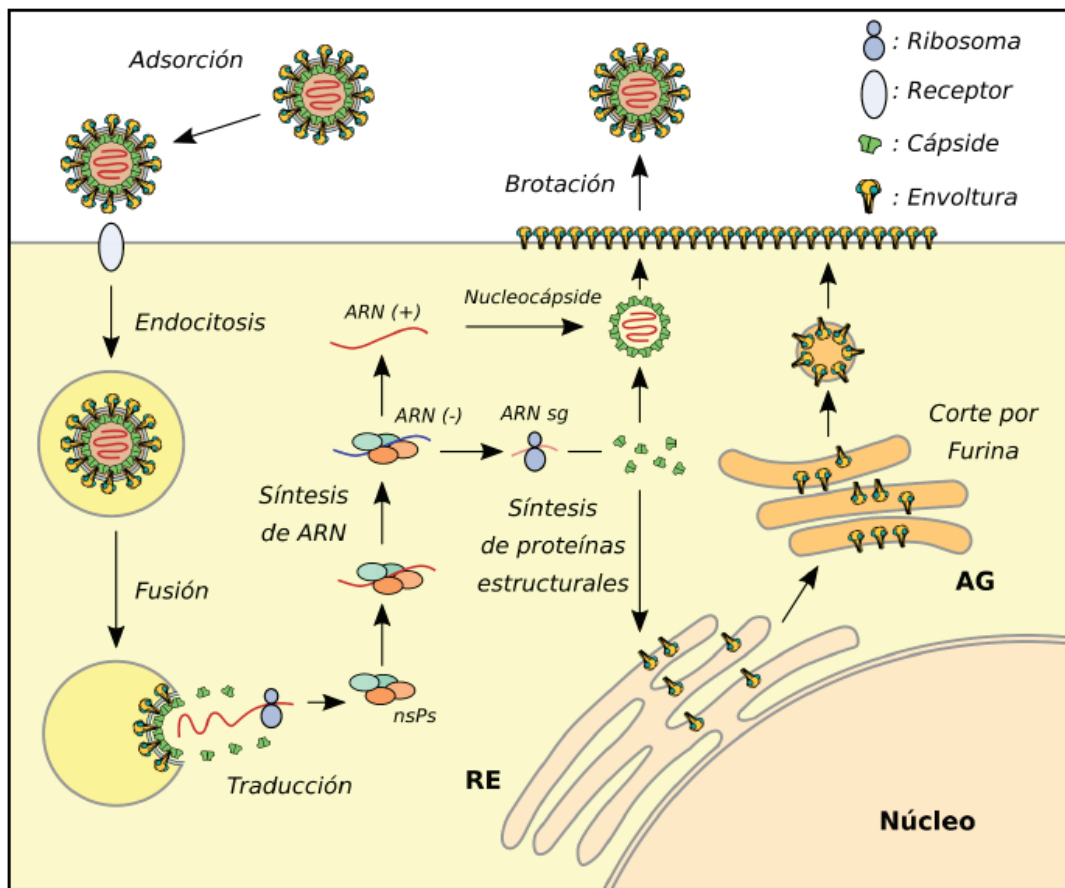


Figura 4: Esquema del ciclo de replicación de CHIKV.

6. Polimerasas de ARN dependiente de ARN:

Las polimerasas de ARN dependiente de ARN (RdRp) son enzimas características de los virus de ARN, ya que se encargan tanto de la replicación del genoma como de la transcripción del mismo. Estas proteínas utilizan un molde de ARN para sintetizar tanto el ARN de sentido negativo como el ARN genómico, de sentido positivo [35]. Las RdRp están formadas por tres dominios: dedos, palma y pulgar (Figura 5A). En los dedos, los subdominios son los motivos F y G; mientras que en la palma, los subdominios son los motivos A, B, C, D y E. Se ha observado que estos motivos se encuentran presentes en las polimerasas de distintas familias de virus de ARN positivo como *Picornaviridae*, *Caliciviridae*, *Flaviviridae* y *Togaviridae* con baja identidad de secuencia, pero una alta identidad estructural [36, 37].

Dentro del género de los Alfavirus, perteneciente a la familia *Togaviridae*, el porcentaje de identidad de secuencia de las RdRps es mayor al 50% para los ejemplares más divergentes [38-40] como se puede observar en la Figura 5B. Estas características de la enzima la convierten en un blanco atractivo para el desarrollo de antivirales.

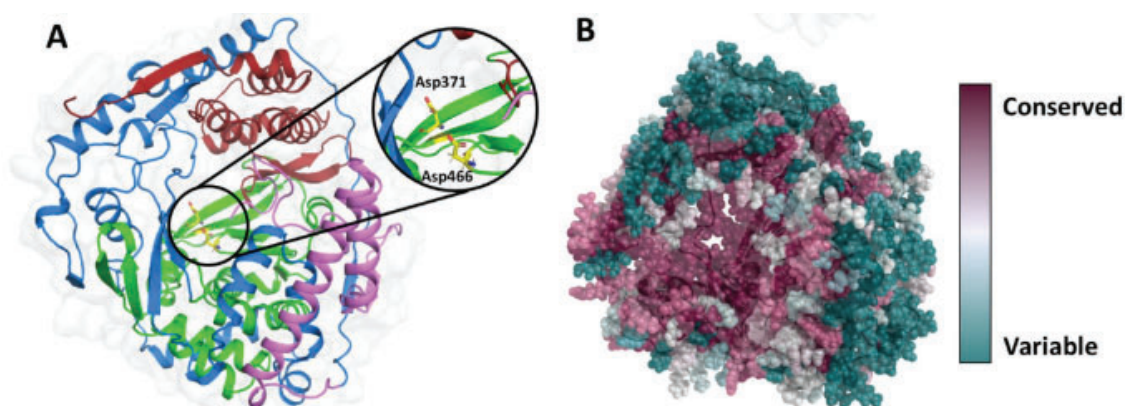


Figura 5: Modelo de AlphaFold de la RdRp de CHIKV. En (A), se muestra la RdRp de CHIKV coloreada según dominios, con un acercamiento en el sitio catalítico. Las hélices N-terminales, y los dominios de dedo, palma y pulgar están coloreados en violeta, azul, verde y rojo, respectivamente. En (B), RdRp de CHIKV, con aminoácidos coloreados según el grado de conservación. Extraído de [38]

7. **Antivirales:**

La manera más eficiente de evitar enfermedades infecciosas es tomando medidas de prevención, sin embargo una vez que un individuo es infectado, este depende de su sistema inmune para combatir dicha infección.

Desde la fundación de las primeras grandes ciudades en la historia de la humanidad, se viene generando un entorno cada vez más idóneo para el desarrollo de patógenos infecciosos, y la globalización permite la rápida diseminación de enfermedades infecciosas, generando epidemias y pandemias, lo que genera pérdidas humanas y económicas. En este contexto surge la necesidad de moléculas antivirales, que tienen como objetivo acelerar la resolución de las infecciones virales sin producir toxicidad en el paciente.

Los antivirales suelen ser moléculas pequeñas, de origen natural o sintético, específicos o de amplio espectro, y su mecanismo de acción es variado.

La identificación de antivirales se realiza principalmente mediante el screening *in vitro* de compuestos estructuralmente variados o de series concretas de moléculas pertenecientes a la misma familia química con el fin de seleccionar un hit activo, el cual eventualmente puede ser racionalmente modificado para obtener un compuesto líder con mayor actividad y/o selectividad. Bajo esta estrategia, se pueden seleccionar compuestos activos con variados mecanismos de acción antiviral. Alternativamente, el screening *in silico* consiste en explorar el docking molecular de distintas moléculas sobre una determinada proteína target mediante simulaciones computacionales. Los compuestos seleccionados mediante screening *in silico* luego son confirmados mediante ensayos *in vitro*. Esta metodología es más económica, ya que se evalúan menos compuestos *in vitro* pero la identificación de antivirales se limita a aquellos potencialmente activos contra el target seleccionado.

Para CHIKV, existen diversos compuestos con actividad antiviral reportada *in vitro*, algunos de los cuales actúan sobre blancos celulares [41-51] y otros sobre el ciclo de replicación viral como antivirales de acción directa (AAD). Dentro de los AAD, se han identificado inhibidores de entrada [52-59], inhibidores de la morfogénesis o ensamblado [60]; inhibidores de la proteasa Nsp2 [61, 62] e inhibidores de la replicación del genoma viral [63-70].

Dado que las proteínas no estructurales son las responsables de la replicación del genoma, resultan un blanco muy atractivo para el desarrollo de antivirales, especialmente la RdRp por ser una enzima muy conservada entre los virus con genoma de ARN [62]. Se han reportado varios compuestos que inhiben la replicación del genoma viral de CHIKV. Alguno de ellos funcionan como análogos de nucleósidos, inhibiendo a la RdRp por competitividad por el sustrato [63-67], pero también se han reportado inhibidores no nucleosídicos que inhiben la RdRp por otros mecanismos que pueden involucrar o no el sitio activo de la enzima [68-70].

8. **Quinazolin:**

Las quinazolininas son un grupo diverso de compuestos aromáticos heterocíclicos nitrogenados con actividad biológica variada, con la siguiente estructura núcleo:

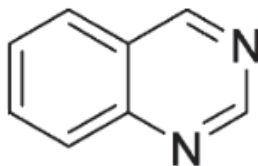


Figura 6: Estructura núcleo de una quinazolina.

La mayoría de estos compuestos y sus derivados exhiben actividades biológicas significativas, tales como antitumorales, antimalárica, antiparasitarias e insecticidas, antibacterianas y antifúngicas, cardioprotectoras, antivirales, antiinflamatorias, antioxidantes y otros efectos [71, 72]. Muchos de los derivados se utilizan hoy en día como productos farmacéuticos [73].

Algunas quinazolininas han mostrado actividad frente a virus con genoma ARN [74-79], algunas de ellas como inhibidores de la polimerasa viral [74, 75]. Particularmente, se ha reportado la actividad de quinazolininas 2,4-disustituídas conjugadas con cumarina frente a CHIKV *in vitro* [80-82].

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis:

Se ha reportado que las quinazolininas funcionan como antivirales inhibidores de la polimerasa de distintos virus de ARN. En base a la conservación entre estas enzimas, este plan de trabajo plantea como hipótesis que las 4-amino-quinazolininas presentan actividad antiviral para CHIKV, probablemente con la polimerasa viral como blanco.

Objetivos:

El objetivo general de este trabajo es identificar moléculas activas frente a CHIKV a partir de la evaluación de la actividad antiviral de una serie de 4-amino-quinazolininas y caracterizar su modo de acción antiviral.

Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar hits moleculares:

- a. Evaluación de la actividad antiviral y determinación de la CE_{50} mediante ensayos de reducción de focos infecciosos.
- b. Evaluación de la citotoxicidad y determinación del índice de selectividad (IS).
- c. Confirmación de la actividad antiviral mediante ensayos de rendimiento viral.

Se seleccionará el o los hits moleculares con mejor perfil de actividad en base a su CE_{50} e IS.

2. Estudiar el modo de acción antiviral:

- a. Evaluación del tiempo de acción del hit seleccionado mediante ensayos de tiempo de agregado.

- b. Evaluación de la actividad del hit seleccionado sobre la replicasa viral mediante ensayos de replicación en trans de un ARN subgenómico.

Materiales y Metodología

Todo el trabajo descrito a continuación se llevó a cabo en el IIB, UNSAM, en sala de cultivo específica para patógenos y siguiendo todos los protocolos de seguridad, higiene y esterilidad para garantizar experimentos limpios y repetibles, así como una seguridad hacia el operador y el personal del instituto.

1. **Compuestos:**

Los compuestos a evaluar pertenecen a una serie de 4-amino-quinazolininas (Figura 7) sintetizadas en el Laboratorio de Química Medicinal del Centro de Investigaciones en Bionanociencias (CIBION-CONICET). Los compuestos fueron disueltos en dimetilsulfóxido en soluciones madre de 100 y 10 mM.

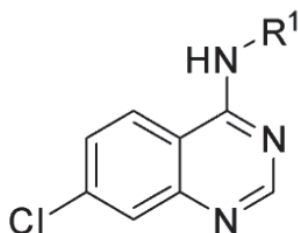


Figura 7: Estructura base de las 4-amino-quinazolininas estudiadas en este trabajo, donde R¹ representa un grupo químico variable.

2. **Células y virus:**

Las líneas celulares utilizadas fueron líneas derivadas de células epiteliales de riñón de mono (Vero CCL81) y de hámster (*Baby hamster kidney*, BHK), cultivadas en medio DMEM o α MEM, respectivamente, suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB, Internegocios, Mercedes, Buenos Aires, Argentina), 100 IU/mL penicilina, y 100 mg/mL estreptomycin (Gibco).

Para las infecciones se utilizó el virus CHIKV del linaje “La Reunión” (CHIKV LR), y CHIKV-ZsGreen, una versión modificada del CHIKV LR. Este virus modificado es un

reportero que expresa de manera recombinante la proteína fluorescente ZsGreen bajo el promotor subgenómico del virus (Figura 8) y reproduce el ciclo viral completo en cultivo celular, permitiendo identificar moléculas que puedan interferir con cualquier etapa del ciclo de replicación viral [58]. Para la infección, ambos virus se prepararon en un medio de infección compuesto por DMEM o α MEM (según el tipo celular a infectar), suplementado con 2% SFB, 100 IU/mL penicilina y 100 mg/mL estreptomicina.

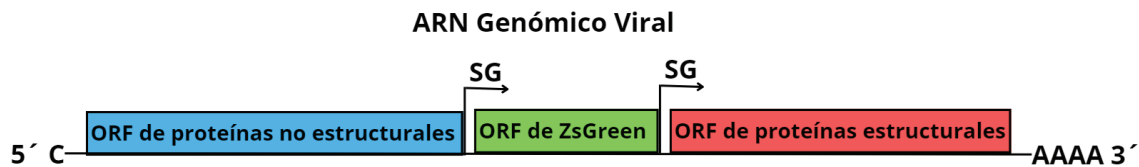


Figura 8: Genoma del virus reportero CHIKV-ZsGreen. SG: promotor subgenómico.

3. Obtención del stock Viral de CHIKV-ZsGreen y Titulación:

Se utilizó un stock semilla del virus CHIKV-ZsGreen, de título $3,3 \times 10^7$ UFF/ml, generado en el laboratorio de Virología Molecular del IIB. Dicho stock semilla fue empleado para infectar una monocapa confluyente de células Vero CCL81 en placa p100 con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,003 UFF/célula. Luego de una incubación de 72 hs a 37°C y 5%CO₂ se cosecharon los sobrenadantes y se centrifugaron a 4°C por 10 minutos a 1000 g, para clarificarlos. El stock obtenido fue fraccionado y almacenado a -80°C para su uso posterior.

Para la titulación del stock obtenido, se realizaron diluciones 1/10 hasta 1/10⁷ en medio de infección y se sembraron 50µl de inóculo por triplicado (junto a un control de células, CC, sin infectar) en monocapas de células Vero CCL81 confluentes en placa de 96 pocillos, y se incubó por 20 hs a 37°C y 5%CO₂. Pasado este tiempo se fijaron las monocapas con paraformaldehído 4% (PFA 4%) y se revelaron los resultados mediante el uso del equipo EliSpot y el software InmunoSpot 7.0.30.2, que permite cuantificar de manera automatizada las unidades formadoras de focos (UFF), que corresponden a células que emiten fluorescencia debido a la expresión de la proteína Zs-Green producto de la infección (Figura 9). Cada UFF es el

resultado de la infección por una partícula viral infectiva del medio titulado, por lo que conociendo el volumen de inóculo y la dilución del stock utilizada para el recuento de focos, se puede determinar las UFF/ml.

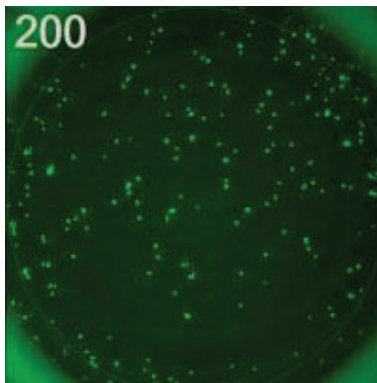


Figura 9: Ejemplo de la cuantificación de focos fluorescentes en una monocapa de células Vero infectada con CHIKV-ZsGreen utilizando el equipo EliSpot y el software InmunoSpot 7.0.30.2. Cada punto fluorescente es una unidad formadora de foco (UFF), resultado de la infección con una partícula viral infectiva.

4. Evaluación de la actividad antiviral de las 4-amino-quinazolinas frente a CHIKV-ZsGreen:

Para evaluar la actividad antiviral de las 4-amino-quinazolinas se realizaron ensayos de reducción de UFF con distintas concentraciones de compuesto. Este ensayo se realizó en placas de 96 pocillos con células Vero CCL81, las cuales se infectaron con aproximadamente 1000 UFF/well (MOI = 0,03 UFF/célula), y se sembraron los compuestos a testear por triplicado en las concentraciones 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,12 μ M, al tiempo en que se infectó con el virus. Se incluyeron wells con células infectadas pero sin compuesto (control de virus, CV), y células no infectadas sin compuesto (control de células, CC). Luego de una incubación de 20 hs a 37°C y 5%CO₂ se fijaron los cultivos con PFA 4% y se cuantificaron las UFF de manera automatizada utilizando el equipo EliSpot y el software InmunoSpot 7.0.30.2. Los datos de cuantificación de focos se utilizaron para calcular el porcentaje de reducción de focos infecciosos en cada concentración relativo al CV. Para estimar la potencia antiviral de los compuestos, se realizaron curvas de porcentaje de

reducción de UFF en función del Log de la concentración, con el objetivo de determinar la concentración efectiva 50 (CE_{50}), que indica la concentración de compuesto necesaria para generar un 50% de reducción del número de UFF respecto al control sin tratar (CV).

Dichas curvas se graficaron y se ajustaron por regresión no lineal utilizando el software GraphPad Prism 8.

5. *Evaluación de la citotoxicidad de las 4-amino-quinazolinas:*

Durante la evaluación de la actividad antiviral de los candidatos, la reducción en el número de UFF resultante puede no solo deberse a un efecto antiviral del compuesto, si no también a un efecto tóxico sobre las células, reduciendo la replicación viral y por lo tanto generando una reducción en el número de UFF. Por eso, resulta relevante evaluar la citotoxicidad de los compuestos, por un lado para descartar aquellas concentraciones que resulten citotóxicas para el análisis de la actividad antiviral y por otro lado para determinar la concentración citotóxica 50 (CC_{50}), que indica la concentración de compuesto que reduce en un 50% la viabilidad celular respecto al control de células. Dicho parámetro de citotoxicidad permite estimar junto con la CE_{50} la selectividad de un compuesto mediante el cálculo del índice de selectividad ($IS = CC_{50}/CE_{50}$).

5.1. Estimación de la citotoxicidad utilizando Violeta de Genciana:

Teniendo en cuenta que durante los ensayos de actividad antiviral frente a CHIKV-ZsGreen no se produce efecto citopático viral, las placas fijadas en los ensayos del apartado anterior se tiñeron con violeta de genciana luego de la cuantificación de los focos fluorescentes. El violeta genciana es un colorante que se une a las proteínas y al ADN de las células viables y, por lo tanto, las células adheridas se tiñen, lo que permite estimar la viabilidad celular en el cultivo. La cantidad de células viables se estimó midiendo la absorbancia media del Violeta Genciana a 595 nm en la monocapa celular utilizando el equipo SPARK (TECAN,

Tecan Austria GmbH). El porcentaje de citotoxicidad de cada concentración de cada compuesto se determinó usando como referencia la absorbancia promedio de los controles de células sin tratar.

Este método económico es estimativo y se utilizó para descartar/identificar compuestos que puedan resultar evidentemente citotóxicos.

5.2. Determinación de la citotoxicidad utilizando MTS:

Para determinar la citotoxicidad de los compuestos que resultaron activos frente a CHIKV-ZsGreen, se trataron células Vero CCL81 en placa de 96 pocillos con distintas concentraciones de los compuestos (1000, 500, 250, 125, 62,5, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,12 μ M) por triplicado, y sin virus. Luego de 24 hs de cultivo a 37°C, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTS/PMS (Promega) según las instrucciones del fabricante y midiendo la absorbancia a 490 nm en el equipo SPARK-TECAN. El ensayo de MTS/PMS emplea soluciones de: un compuesto de tetrazolio [3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 5 - (3-carboximetoxifenil) - 2 - (4-sulfofenil) - 2H -tetrazolio; MTS] y un reactivo de acoplamiento electrónico (metosulfato de fenazina, PMS). El MTS es bio reducido por enzimas deshidrogenasas que se encuentran en las células metabólicamente activas, produciendo formazán que es soluble en el medio de cultivo. La cantidad de formazán, medida por la absorbancia a 490 nm, es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo [83]. A partir de los valores de absorbancia obtenidos, se calculó el porcentaje de citotoxicidad de cada concentración de compuesto en relación a la absorbancia promedio de los controles de células sin tratar, lo que permitió construir curvas dosis-respuesta para estimar la concentración de citotoxicidad del 50% (CC₅₀).

Finalmente se calculó un índice de selectividad (IS) para cada compuesto.

6. Obtención del stock Viral de CHIKV del linaje “La Reunión”:

Para obtener el stock de CHIKV LR, se partió de un stock semilla del mismo, generado en el laboratorio de Virología Molecular. Dicho stock semilla fue empleado

para infectar una monocapa confluyente de células Vero CCL81 en placa p100. Luego de una incubación de 72 hs a 37°C y 5%CO₂ se cosecharon los sobrenadantes y se centrifugaron a 4°C por 10 minutos a 1000 g, para clarificarlos. El stock obtenido fue fraccionado y almacenado a -80°C para su uso posterior.

El stock de CHIKV LR obtenido se tituló mediante un ensayo de formación de placas. Este ensayo consistió en infectar células Vero CCL81 en placas de 24 pocillos con una serie de diluciones al décimo hasta 1/10⁷ (por triplicado) del stock viral obtenido, e incubar 72 hs a 37°C en 500 µl de medio de infección con 0,8% metil celulosa. La metil celulosa genera un medio semisólido que restringe la difusión de las partículas virales que produce cada célula infectada, de manera que solo se infectan células vecinas. Dado que la infección de CHIKV en células Vero es citopática, esto dio como resultado la formación de zonas delimitadas en la monocapa que presentaron efecto citopático, reconocibles como placas de lisis viral. Cada una de estas placas corresponde a la infección inicial de una partícula viral, llamada unidad formadora de placa (UFP). Estas UFP se cuantificaron a simple vista luego de una tinción con Violeta Genciana (Figura 10), lo que permitió determinar el título del stock obtenido.

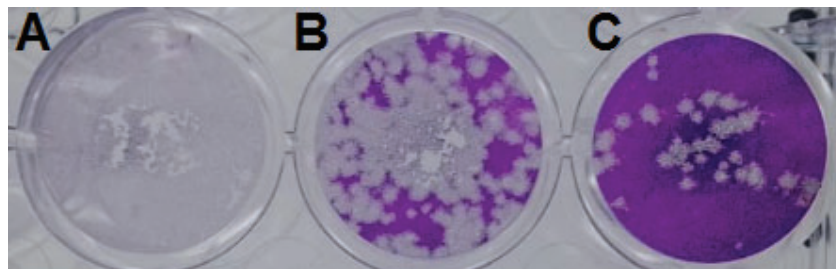


Figura 10: Ejemplo de una monocapa de células Vero infectada con CHIKV LR durante un ensayo de titulación. Cada placa sin tinción violeta es una unidad formadora de placa, formada como resultado de la infección inicial con una partícula viral infectiva. En (A) se muestra el resultado de la infección con la dilución 1/10 del sobrenadante de cultivo, donde la alta carga viral genera una lisis celular generalizada. En (B) se muestra el resultado de la infección con la dilución 1/10², donde se pueden distinguir algunas placas individuales. En (C) se muestra el resultado de la infección con la dilución 1/10³, donde se pueden identificar placas virales individuales y el número de placas es cuantificable de manera más fiable.

7. Confirmación de la actividad antiviral de compuestos sobresalientes en CHIKV “La Reunión”:

Una vez seleccionados los compuestos con actividad antiviral frente a CHIKV-ZsGreen y con baja citotoxicidad, se confirmó el efecto antiviral contra un aislamiento wild type de CHIKV del linaje La Reunión (LR), ya que el CHIKV-ZsGreen si bien deriva del CHIKV LR, al tratarse de una variante modificada de laboratorio, podría presentar características fenotípicas diferentes con respecto a la variante contra la cual se quiere desarrollar antivirales. Por ejemplo, se ha observado que el tamaño de placa de lisis de esta variante es más pequeño que el de la variante wild type.

7.1. Actividad antiviral contra CHIKV LR de QMED2 y QMED3 en células Vero:

Se realizaron ensayos de rendimiento viral, los cuales consisten en titular mediante ensayo de formación de placas el virus infeccioso producido en el sobrenadante de cultivo de células tratadas en un ensayo de actividad antiviral. Esto permite evaluar de manera directa el impacto del tratamiento antiviral sobre la progenie de virus infecciosos.

El ensayo de actividad antiviral consistió en incubar 1 h a 37°C y 5%CO₂ monocapas confluentes de células Vero CCL81 en placa de 24 pocillos con 200 µL por pocillo de una solución de medio de infección y CHIKV LR (MOI = 0,1 UFP/célula). Luego de la incubación, se retiró el medio, se lavó 2 veces con 500 µL de PBS por pocillo para eliminar las partículas virales no adsorbidas, se agregaron 500 µL de solución de medio de infección con distintas concentraciones de los compuestos ensayados (50, 25 y 12,5 µM) y se incubó por 24 hs a 37°C y 5%CO₂. Luego se tomaron los sobrenadantes de cada pocillo y se titularon por el ensayo de formación de placas.

7.2. Actividad antiviral contra CHIKV LR y citotoxicidad de QMED2 en células BHK:

Para evaluar la actividad anti-CHIKV de QMED2 en otra línea celular utilizada para la replicación de CHIKV, se evaluó la actividad antiviral y la citotoxicidad en células BHK. El ensayo consistió en infectar células BHK en placa de 24 pocillos con CHIKV LR (MOI = 0,1 UFP/célula). Se dejó un pocillo sin infectar como control de células. Se trató con distintas concentraciones de QMED2 (50, 25 y 12,5 µM) (T) y se incluyeron pocillos infectados sin tratamiento antiviral (CV). Luego de 24 hs a 37°C y 5%CO₂ se cosecharon los sobrenadantes. Las monocapas fueron fijadas con formol 10% y teñidas con Violeta Genciana para evaluar la toxicidad del compuesto.

Los sobrenadantes cosechados se diluyeron 1/1000 en medio de infección y se utilizaron para infectar células Vero CCL81 en placas de 24 pocillos. Se incluyeron controles de células sin infectar (CC). Se incubó 72 hs a 37°C y 5%CO₂, cuando se hace evidente el efecto citopático característico de CHIKV. Este efecto es proporcional a la cantidad de virus infectivo en el sobrenadante, y se puede cuantificar mediante una tinción con Violeta Genciana, y su subsecuente medida de la absorbancia a 595 nm. Con estas medidas de absorbancia se determinó un porcentaje de reducción del efecto citopático (ECP) viral, tomando como referencia de 100% de reducción a la absorbancia medida en los CC: % reducción de ECP viral = $(Abs_T - Abs_{CV}) * 100 / (Abs_{CC} - Abs_{CV})$

8. *Determinación del modo de acción de el/los compuestos seleccionados:*

Los compuestos antivirales pueden tener como blanco de acción proteínas o componentes del virus (por ejemplo, las proteínas de envoltura, polimerasa, proteasas o el genoma de ARN), o bien factores celulares involucrados en la respuesta antiviral intrínseca o factores provirales que el virus requiere para completar el ciclo de infección.

Para estimar el modo de acción durante el ciclo de replicación viral, se realizaron ensayos de tiempo de adición del antiviral. Este ensayo consistió en infectar células

Vero CCL81 en placa de 24 pocillos con CHIKV LR con una MOI de 2,25 UFP/célula. Se incubó 1 h a 4°C para permitir la adsorción de los virus a las células y favorecer la sincronización de la infección. Luego de la remoción de virus no adsorbido mediante lavados con PBS se colocaron 500 µl de medio de infección con o sin antiviral (según la condición experimental) y se incubaron a 37°C 5% CO₂. Se utilizó una concentración de QMED2 de 100 µM y como control positivo se utilizó Favipiravir, un inhibidor nucleosídico de ARN polimerasas virales [66], a una concentración de 250 µM. Dichas concentraciones no resultaron tóxicas para las células Vero y superan el 90% de reducción de la replicación viral en los ensayos de actividad antiviral. Si el compuesto QMED2 actúa en la replicación del genoma viral, se espera que se comporte de manera muy similar a Favipiravir en este ensayo.

Los compuestos se agregaron en diferentes tiempos según la condición ensayada como se muestra en la Figura 11:

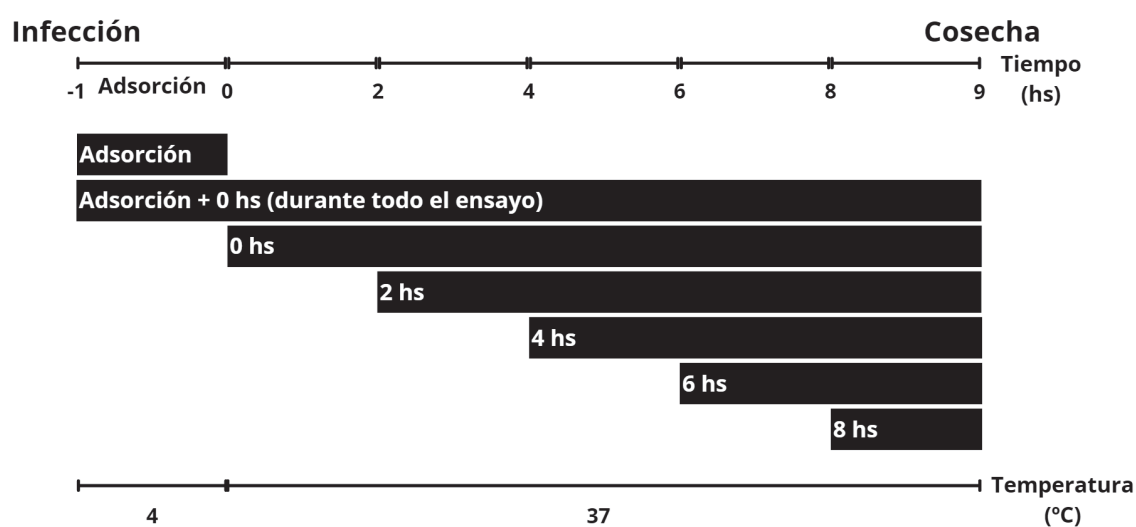


Figura 11: Esquema del ensayo de tiempo de adición. Las barras negras muestran el período de incubación del compuesto antiviral en función del tiempo de adición.

Para el tratamiento durante la adsorción, las células fueron tratadas simultáneamente con el compuesto antiviral e infectadas con CHIKV LR. Para el resto de los tratamientos, las células fueron infectadas en ausencia del compuesto. Luego de la adsorción a 4°C y el lavado de la placa, en las condiciones “Adsorción + 0 hs” y “0 hs” se agregó medio de infección con compuesto y al resto de los pocillos se les agregó medio de infección. Luego, en pocillos previamente no tratados, se

agregó el compuesto antiviral (por triplicado) en intervalos de 2 horas y a las 9 hs post-adsorción se cosecharon todos los sobrenadantes de cultivo. Se incluyeron controles de células infectadas sin tratar (CV) y células sin infectar ni tratar (CC). Finalmente, el virus infectivo en el sobrenadante se cuantificó mediante el método de UFP.

9. *Determinación de la actividad sobre la replicasa viral:*

Los ensayos con replicones constituyen una herramienta muy fiable para la determinación de blancos antivirales. En este trabajo, se utilizaron replicones subgenómicos de CHIKV que contienen la secuencia codificante de P1234 de CHIKV del genotipo ECSA, o la variante con la polimerasa no funcional P1234_{GAA} que posee la sustitución de GDD a GAA en el sitio activo de nsP4, bajo el control del promotor de las proteínas inmediatamente tempranas de cytomegalovirus (CMV) (Rep y Rep-GAA) (Figura 12). Estos plásmidos generan un ARN mensajero que codifica a las 4 proteínas no estructurales (nsp1-4) de CHIKV, que conforman el complejo de replicación. Por otro lado, se utilizó un plásmido reportero cuya transcripción ocurre bajo el promotor de la ARN polimerasa I celular, para la producción de moldes de ARN cuya replicación depende de la replicasa viral (HSPoll-FG). El plásmido reportero genera, bajo el promotor celular HSPoll, un ARN mensajero con 2 marcos de lectura abiertos. Uno de ellos es capaz de traducirse directamente a partir de este ARN mensajero, y codifica a la luciferasa de luciérnaga (Firefly luciferase, FLuc). Esta enzima tiene una expresión basal en ausencia del complejo de replicación viral debido a que su transcripción y traducción inicial no requiere dicho complejo. El segundo marco de lectura abierto se encuentra bajo el promotor subgenómico de CHIKV, y codifica a la luciferasa de Gaussia (GLuc), la cual utiliza un sustrato diferente a FLuc. Debido a que la región codificante de esta enzima se encuentra bajo un promotor subgenómico, solo se transcribe en presencia de un complejo de replicación viral funcional, por lo que la expresión de GLuc y la señal de luminiscencia de esta enzima será proporcional a la actividad del complejo.

Dichos plásmidos fueron cedidos por el Dr. Andres Merits (Institute of Technology, University of Tartu, Tartu, Estonia) y fueron descritos previamente [84, 85].

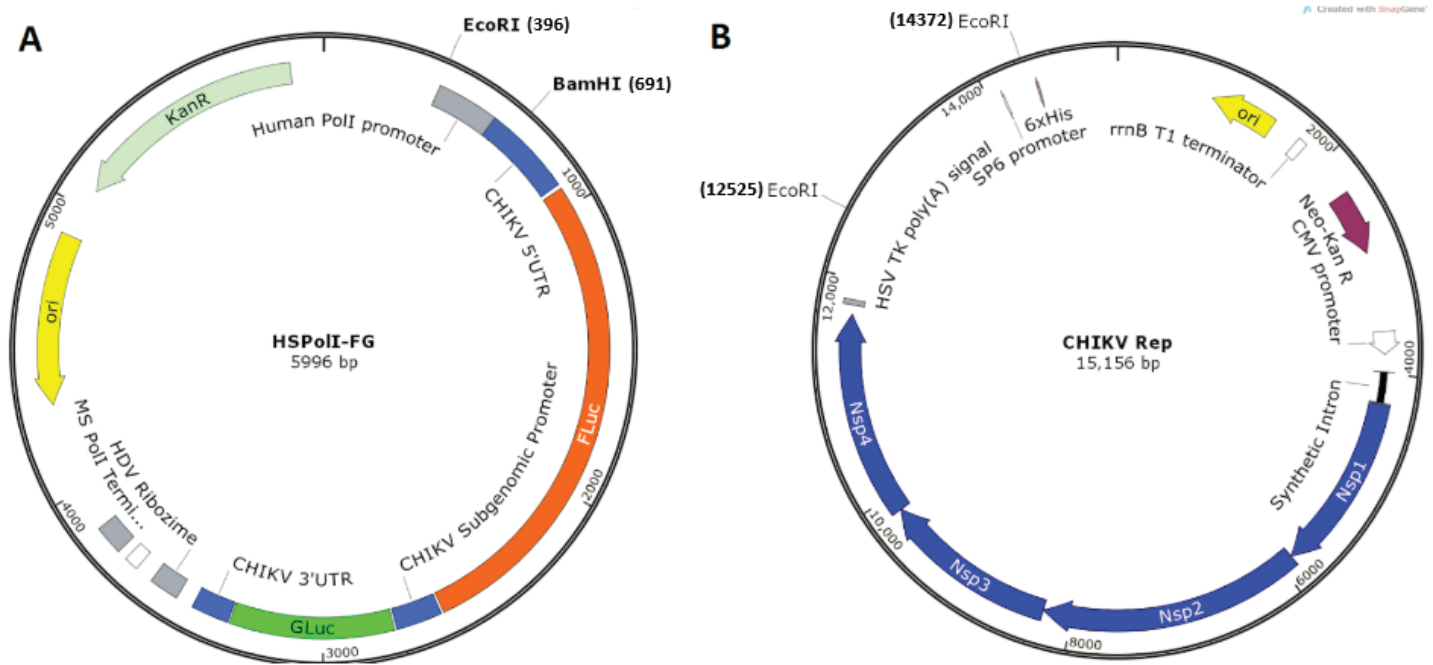


Figura 12: Esquema del plásmido reportero HSPolI-FG en (A), y los plásmidos REp (replicasa funcional) y REp-GAA (replicasa no funcional, control negativo) en (B), con sus correspondientes sitios de restricción para BamHI y EcoRI.

9.1. Amplificación de los plásmidos para replicones:

Para obtener preparaciones de ADN de los plásmidos Rep, Rep-GAA y HSPolI-FG se transformaron bacterias *E. coli* XL1-blue y se seleccionaron con kanamicina 100 µg/ml. Se picaron colonias aisladas y se realizó una amplificación en cultivo en 10 ml de LB-kanamicina. Los plásmidos se purificaron utilizando EasyPure® Plasmid MiniPrep Kit de TransGene, siguiendo las especificaciones del fabricante [86].

Se evaluó el rendimiento de la preparación de los plásmidos mediante electroforesis en un gel de agarosa 0,8% y se verificó la identidad de los mismos mediante el análisis del patrón de restricción.

El plásmido reportero HSPoll-FG se digirió con las enzimas EcoRI y BamHI. Para ello, se preparó una mezcla de 2 µl de ADN (aproximadamente 400 ng), 4 µl de buffer Tango (10X), 0,4 µl de BamHI (10U/µl, Thermo Fisher Scientific), 0,2 µl de EcoRI (10U/µl, Thermo Fisher Scientific) y 3,4 µl de agua inyectable.

Ambos plásmidos de replicasa (Rep y Rep-GAA) se digirieron con EcoRI. Para ello, se preparó una mezcla de 2 µl de ADN (aproximadamente 400 ng), 2 µl de buffer Tango (10X), 0,2 µl de EcoRI (10U/µl, Thermo Fisher Scientific) y 5,8 µl de agua inyectable.

Las 3 digestiones se incubaron por 1 h a 37 °C, y luego se sembraron 2 µl de las mismas en un gel de agarosa 0,8%, junto al marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Fisher [87].

9.2. Ensayo de Trans-Replicación:

Luego de confirmar la identidad de los plásmidos, se procedió a la transfección de los mismos en células BHK en placa de 96 pocillos. Las soluciones de transfección para cada par de plásmidos se prepararon en polietilenimina (PEI) con una relación de ADN:PEI de 1:2 en α MEM, de manera de sembrar un volumen final de 60 µl con 100 ng de cada plásmido por pocillo. Se incluyó una mezcla a modo de control de PEI, en la cual se agregó agua en lugar del ADN plasmídico. Las mezclas se prepararon inicialmente en un volumen equivalente a 20 µl por pocillo a sembrar y se incubaron 20 min a temperatura ambiente. Luego de este tiempo, se agregó α MEM para alcanzar un volumen final de 60 µl por pocillo a sembrar.

La placa de 96 pocillos se lavó con 100 µl de PBS por pocillo y se sembraron los 60 µl de cada solución de transfección por pocillo, dejando controles de células con α MEM.

Luego de una incubación de 2 h a 37 °C y 5%CO₂, se lavó la placa 3 veces con 100 µl de PBS por pocillo y se agregaron 100 µl de medio de crecimiento para BHK por pocillo, con distintas concentraciones del compuesto QMED2, y se incubó por 20-24 hs. De los pocillos transfectados con la replicasa funcional, 3 pocillos se trataron con 50 µM de QMED2, 3 se trataron con 25 µM, y 5 pocillos quedaron sin tratar como

control. Lo mismo se hizo para el control de PEI. Los pocillos transfectados con la replicasa no funcional no se trataron.

Al final de la incubación, se lavó la placa con 100 μ l PBS, se lisaron las células con buffer de lisis pasiva y se reveló la actividad de las luciferasas utilizando el kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega según las indicaciones del fabricante [88]. La actividad de las luciferasas se midió en forma de unidades relativas de luminiscencia mediante el equipo GloMax® Navigator System, Promega.

10. *Análisis Estadístico:*

Se compararon los valores obtenidos en presencia del compuesto con aquellos obtenidos en los respectivos controles y se realizó un análisis estadístico mediante la prueba T de Student utilizando el GraphPad Prism 8. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa si $p < 0,05$.

Resultados y Análisis

A. Identificación de 4-aminoquinazolinas con actividad antiviral contra CHIKV:

La actividad antiviral de una serie de ocho derivados de 4-aminoquinazolinas se evaluó en una primera instancia usando un ensayo basado en el recuento de focos infecciosos luego de la infección de células Vero con un virus recombinante que expresa la proteína fluorescente ZsGreen como reportero (CHIKV-ZsGreen) y el tratamiento con concentraciones crecientes de los compuestos candidatos. Con el fin de estimar la selectividad de los compuestos frente al virus, se determinó la citotoxicidad. Finalmente, se validó la actividad antiviral de los compuestos identificados en el ensayo de reducción de focos contra el virus del linaje de La Reunión.

1. Obtención de stocks Virales y Titulación:

Se prepararon stocks de CHIKV-ZsGreen y de CHIKV LR a partir de stocks semilla mediante el pasaje en células Vero. Para CHIKV-ZsGreen, se determinó el título del stock en un ensayo de unidades formadoras de focos obteniéndose 7 ml de stock de CHIKV-ZsGreen con un título de $4,9 \times 10^5$ UFF/ml. El stock de CHIKV LR se tituló en un ensayo de unidades formadoras de placas de lisis y se obtuvieron 7 ml de stock con un título de $5,5 \times 10^6$ UFP/ml.

2. Evaluación de la actividad antiviral y citotoxicidad de las 4-amino-quinazolinas:

Se evaluaron ocho derivados de 4-amino quinazolinas contra CHIKV-ZsGreen en al menos tres ensayos independientes de reducción de focos infecciosos. Los compuestos se emplearon en concentraciones de 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,12 μM para los ensayos de actividad antiviral. A partir de los datos obtenidos se graficaron las

curvas dosis-respuesta (Figura 13) con el software GraphPad Prism 8 para estimar las CE_{50} que se muestran en la Tabla 1.

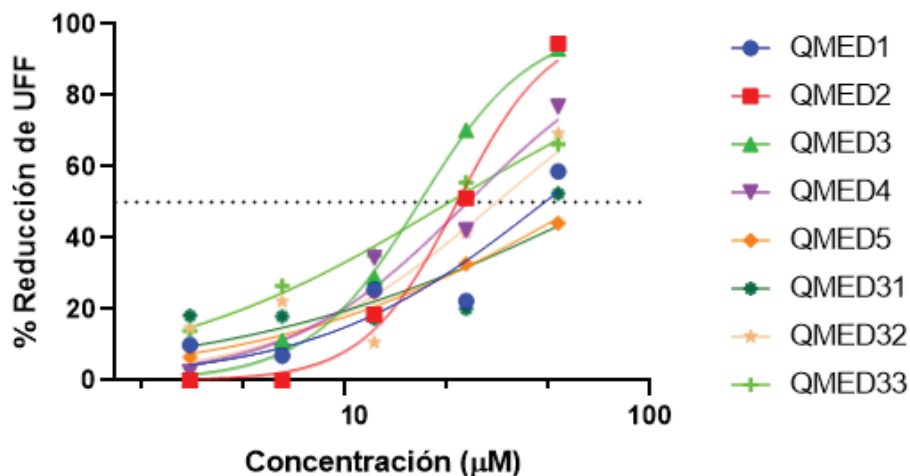


Figura 13: Curvas dosis-respuesta de todos los compuestos evaluados. Se muestra el porcentaje de reducción de UFF respecto al CV en función de la concentración de compuesto (μM) de uno de los ensayos a modo de ejemplo. La línea punteada representa el 50% de reducción de UFF, un umbral que debe ser superado por los compuestos para poder calcular la CE_{50} .

Para evaluar la citotoxicidad en las concentraciones ensayadas, las monocapas se tiñeron con violeta de genciana y se determinó la absorbancia a 585 nm. Luego, para confirmar la citotoxicidad y determinar la CC_{50} se empleó el método de MTS/PMS a un rango de concentraciones más amplio hasta 1 mM, el cual determina la actividad metabólica de las células en cultivo como una medida de viabilidad celular.

Como resultado, se identificaron 2 compuestos (QMED2 y QMED3) activos frente a CHIKV, con CE_{50} en el orden μM . El resto de los compuestos no alcanzó una reducción de UFF mayor o igual a 50% a una concentración de 50 μM , por lo que fueron descartados como potenciales antivirales. QMED2 no resultó tóxico en células Vero hasta 1 mM ($CC_{50} > 1000 \mu\text{M}$), quedando con un índice de selectividad mayor a 52,1, mientras que el tratamiento con QMED3 alcanzó un 49% de citotoxicidad a dicha concentración ($CC_{50} \sim 1000 \mu\text{M}$), estimándose un índice de selectividad de aproximadamente 61 (Figura 14, Tabla 1 y Figura 15).

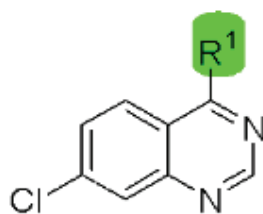
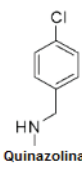
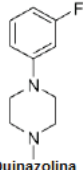
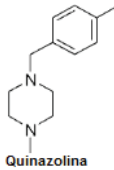
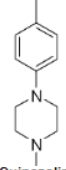
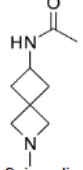
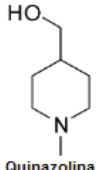
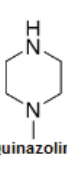
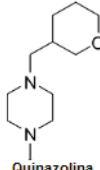


Figura 14: Esquema de la estructura núcleo de las quinazolinas analizadas. En verde se muestra el residuo R^1 que varía entre los distintos compuestos.

Tabla 1: Actividad antiviral (CE_{50}), citotoxicidad (CC_{50}) e índice de selectividad de los compuestos analizados.

Compuestos	QMED1	QMED2	QMED3	QMED4	QMED5	QMED31	QMED32	QMED33
Sustituyente R^1	 Quinazolina	 Quinazolina	 Quinazolina	 Quinazolina	 Quinazolina	 Quinazolina	 Quinazolina	 Quinazolina
CE_{50} (μM) (promedio $\pm$ sd)	>50	19,2 $\pm$ 4,2	16,4 $\pm$ 2,7	>50	>50	>50	>50	>50
CC_{50} (μM) (MTS/PMS)	-	>1000	~1000	>1000	-	-	-	~1000
Índice de selectividad (IS)	-	>>52,1	~61	-	-	-	-	-

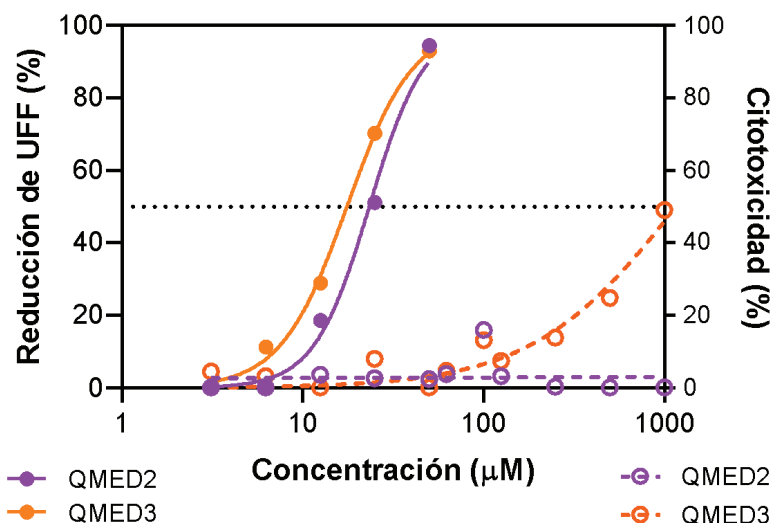


Figura 15: Curvas dosis-respuesta obtenidas mediante ajuste no lineal para porcentaje de reducción de UFF de CHIKV-ZsGreen en células Vero (círculos rellenos) y porcentaje de citotoxicidad en células Vero determinada mediante MTS/PMS (círculos vacíos), en función de la concentración de compuesto. Cada punto representa el promedio del triplicado de una concentración de compuesto de un ensayo. Se muestra QMED2 en violeta y QMED3 en naranja.

Respecto a la relación entre la estructura química de las moléculas analizadas y su actividad antiviral, los resultados sugieren que el anillo piperazina sería importante para la actividad anti-CHIKV, ya que los compuestos sin ese espaciador resultaron ser inactivos (QMED1, QMED5 y QMED31). Por otro lado, el resto fenilo en el anillo piperazina, característico de QMED2 y QMED3 (Figura 16), parece ser necesario para la actividad antiviral, ya que la ausencia de este sustituyente (QMED32) o la sustitución por grupos más polares (QMED33) resultó en la pérdida de la actividad antiviral. Si bien QMED4 también presenta estos sustituyentes, los ensayos de actividad antiviral revelaron una pérdida de la actividad del mismo de manera progresiva con cada ensayo, hasta el punto en que no se alcanza una reducción de UFF del 50% en las concentraciones ensayadas ($CE_{50} > 50 \mu M$). Esto podría deberse a una inestabilidad del compuesto, que podría estar dada por la configuración del resto fenilo.

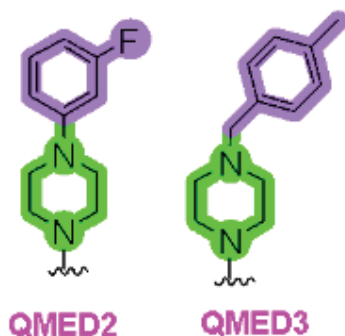


Figura 16: Sustituyentes R1 de QMED2 y QMED3. En verde se muestra el anillo piperazina, en violeta se muestra el resto fenilo.

3. Confirmación de la actividad antiviral de compuestos sobresalientes frente a un aislamiento de CHIKV “La Reunión”:

3.1. Confirmación en células Vero:

Para confirmar la actividad anti-CHIKV de los compuestos QMED2 y QMED3, se realizaron ensayos de rendimiento viral con tres concentraciones de compuesto (12,5, 25 y 50 μ M).

Como se puede ver en la Figura 17, tanto el compuesto QMED2 como QMED3 inhiben la producción de virus al sobrenadante de cultivo de manera dependiente de la concentración y alcanzan un porcentaje de reducción del título de virus infeccioso superior al 90% a una concentración de 50 μ M, lo que confirma la actividad de estos compuestos contra CHIKV LR. Aunque no hay una diferencia estadísticamente significativa entre ambos compuestos, QMED3 parece mostrar un menor efecto antiviral. Teniendo en cuenta esto y que QMED3 resultó más citotóxico que QMED2, se continuó con este último compuesto para caracterizar el modo de acción antiviral.

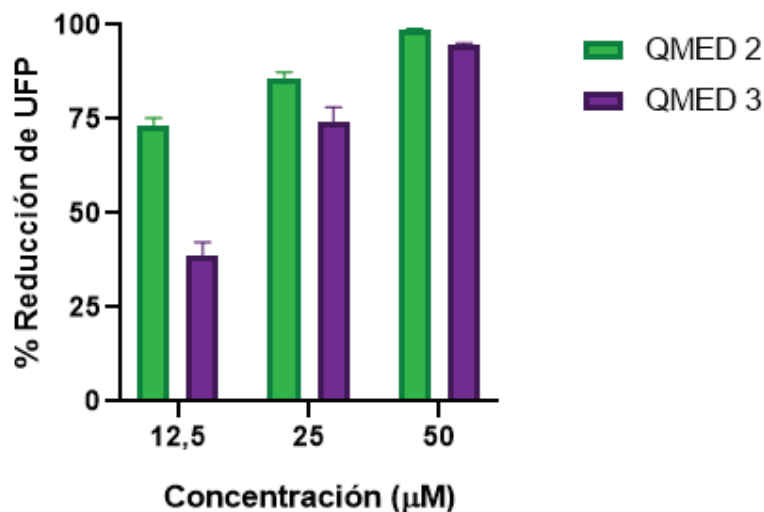


Figura 17: Actividad antiviral de QMED2 y QMED3 frente a CHIKV LR. Se realizó un experimento de rendimiento viral en células Vero CCL81 infectadas con CHIKV del linaje “La Reunión”. Se muestra el porcentaje de reducción del título viral recuperado del sobrenadante de cultivo (UFP/ml) para cada compuesto en distintas concentraciones respecto al control de células infectadas sin tratar.

3.2. Confirmación en células BHK:

Para confirmar la actividad anti-CHIKV de QMED2 en células BHK, otra línea celular muy utilizada para la replicación de CHIKV, se realizó un ensayo de rendimiento viral. Para ello se infectaron células BHK con CHIKV LR y se incubaron 24 hs con tres concentraciones de compuesto (12,5, 25 y 50 μM). Se cosecharon los sobrenadantes y las células se tiñeron con Violeta Genciana para estimar la citotoxicidad. Los sobrenadantes de las células BHK se utilizaron para infectar células Vero. La actividad antiviral, medida como reducción de la progenie viral en los sobrenadantes, se determinó por reducción de efecto citopático (ECP) en células Vero. El ECP, proporcional a la cantidad de virus infectivo, se determinó mediante la medición de la absorbancia de la tinción con Violeta Genciana.

De esta manera se determinó el porcentaje de reducción de ECP viral y de citotoxicidad respecto a los controles para cada concentración de QMED2 en células BHK.

Como se puede observar en la Figura 18, QMED2 presenta actividad antiviral contra CHIKV LR en células BHK, superando el 50% de reducción del efecto citopático a una concentración de compuesto de 25 μM , sin embargo a concentraciones más altas resulta considerablemente tóxico, alcanzando un 50 % de citotoxicidad a una concentración de 50 μM .

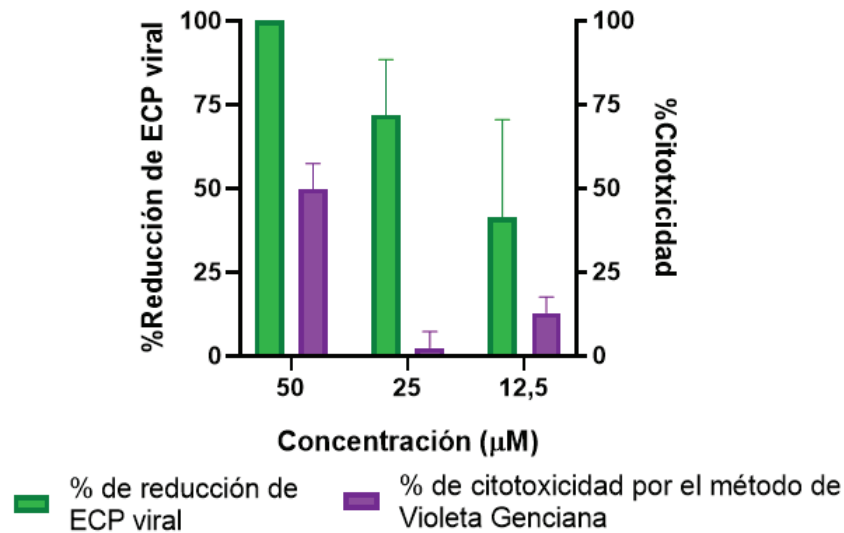


Figura 18: Actividad antiviral y citotoxicidad de QMED2 frente a CHIKV LR en células BHK. Se muestra el porcentaje de reducción del efecto citopático viral producido en células Vero a partir de los sobrenadantes de cultivo de células BHK infectadas y tratadas con QMED2 (barras verdes). La citotoxicidad (barras violetas) se determinó a partir de la absorbancia del Violeta Genciana de las monocapas de BHK tratadas con QMED2.

B. Caracterización del modo de acción:

1. QMED2 actúa inhibiendo el ciclo de CHIKV en tiempos similares a Favipiravir, un inhibidor de la polimerasa viral:

Con el fin de determinar en qué ventana de tiempo a lo largo del ciclo viral actúa QMED2, se realizó un ensayo de tiempo de adición. Para eso, se realizó una

infección sincronizada de células en cultivo con una multiplicidad de infección >1 y adsorbiendo el virus en frío para luego dejar progresar la infección durante 9 hs a 37°C. Se agregó el compuesto junto con el virus durante la etapa de adsorción, a lo largo de todo el ciclo, o retrasando el agregado a distintos tiempos luego de la adsorción. Teniendo en cuenta la hipótesis de que las 4-amino-quinazolinonas actuarían inhibiendo la polimerasa viral, se utilizó como control Favipiravir, un análogo de nucleósido previamente caracterizado como inhibidor de las ARN polimerasas virales, entre ellas la de CHIKV [65-66].

Como se observa en la Figura 19, el tratamiento con Favipiravir y QMED2 durante todo el tiempo del ensayo (Ads + 0) resultó en una reducción de la replicación viral promedio de 97,96% y 98,65%, respectivamente. Dado que el agregado del compuesto durante la adsorción (ads) no reduce significativamente la producción de virus infectivo respecto al control sin tratar, el compuesto no actuaría como inhibidor de la adsorción. A excepción de la condición de tratamiento durante la adsorción para ambos compuestos, y la condición de tratamiento con Favipiravir a las 8 hs, el rendimiento de virus en el resto de las condiciones fue significativamente menor al control de virus (CV). Para QMED2, si bien no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las condiciones de tratamiento con antiviral entre las 0 y 8 hs, se puede ver una tendencia al aumento del título viral a partir de las 6 hs. De manera similar, el tratamiento con Favipiravir a partir de las 4-6 h p.i. resultó en la disminución de su actividad antiviral con un aumento gradual del título viral. Dado que QMED2 y Favipiravir presentan un comportamiento similar, esto sugiere que el tiempo de acción de QMED2 es similar al del Favipiravir.

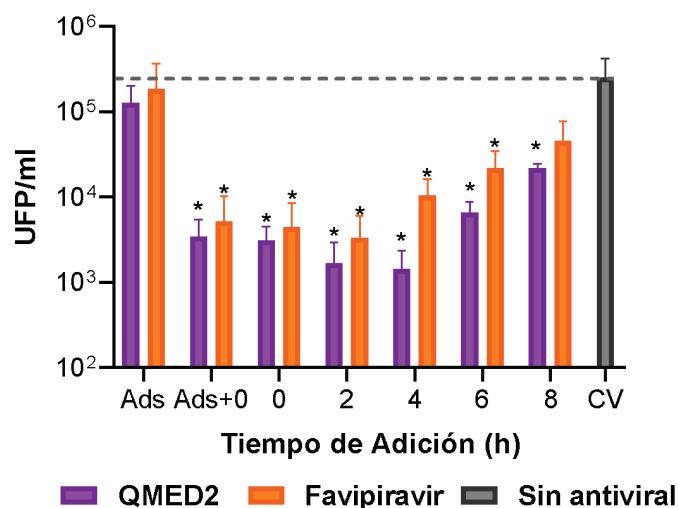


Figura 19: Ensayo de tiempo de adición de QMED2. Se infectaron células Vero CCL81 con CHIKV LR en condiciones de un paso (MOI 2,25 UFP/célula). Se realizó el tratamiento con QMED2 (100 μ M) o Favipiravir (250 μ M) a distintos tiempos: solo durante la adsorción en frío (Ads), durante la adsorción y postadsorción (Ads+0; todo el tiempo del ensayo), o se inició el tratamiento a distintos tiempos post adsorción (p.a.) (0-8 h). Se incluyeron controles de células infectadas sin tratar (CV). Luego se cosecharon los sobrenadantes a las 9 h p.a y se titularon por el método de placas (UFP/ml). Los * representan una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al CV, determinada mediante una prueba T-student.

2. Ensayo de replicación en trans de un ARN subgenómico reportero:

Para evaluar de forma directa la actividad de QMED2 sobre la actividad del complejo de replicación viral (o replicasa), formado por las proteínas no estructurales de CHIKV, se utilizó un sistema de replicación en trans. El sistema utiliza dos vectores de expresión eucariota, el primero contiene el marco de lectura que codifica para las proteínas no estructurales de CHIKV, el segundo codifica una construcción reportera que contiene las secuencias promotoras del extremo 5' del genoma de CHIKV (5' no codificante y el elemento de secuencia conservado CSE 1, 5'UTR-nsp1) seguidas del gen de la luciferasa de luciérnaga (FLuc), el promotor

subgenómico del virus, el gen de la luciferasa de Gaussia (GLuc) y el extremo 3' no codificante de CHIKV (3'UTR) (Figura 20).

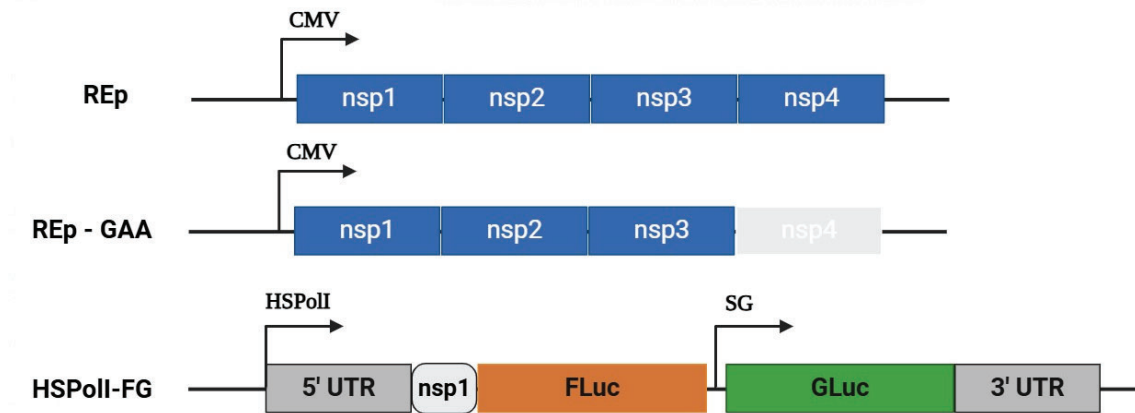


Figura 20: Esquema de los plásmidos REp (replicasa funcional) y REp-GAA (replicasa no funcional, control negativo), y el plásmido reportero HSPolI-FG.

La cotransfección de estos dos vectores en células permisivas resulta en la transcripción de los ARNm de las proteínas no estructurales de CHIKV y del ARN reportero. El complejo de proteínas no estructurales reconoce las secuencias promotoras en el 5' del ARN reportero para transcribir una copia de ARN de cadena negativa que luego sirve como molde (i) para amplificar la secuencia completa del ARN reportero que se traducirá en la expresión de la luciferasa de luciérnaga (Fluc) o (ii) para transcribir el ARN subgenómico a partir del cual se expresará la luciferasa de Gaussia (Gluc). De esta manera, la actividad de Fluc refleja la replicación del ARN reportero, y la de Gluc, la transcripción del ARN subgenómico (Figura 21). Como control del ensayo se emplea una construcción que lleva una mutación en el sitio activo de la polimerasa nsp4 de CHIKV y que, en consecuencia, no es capaz de amplificar el ARN reportero ni de transcribir el ARN subgenómico.

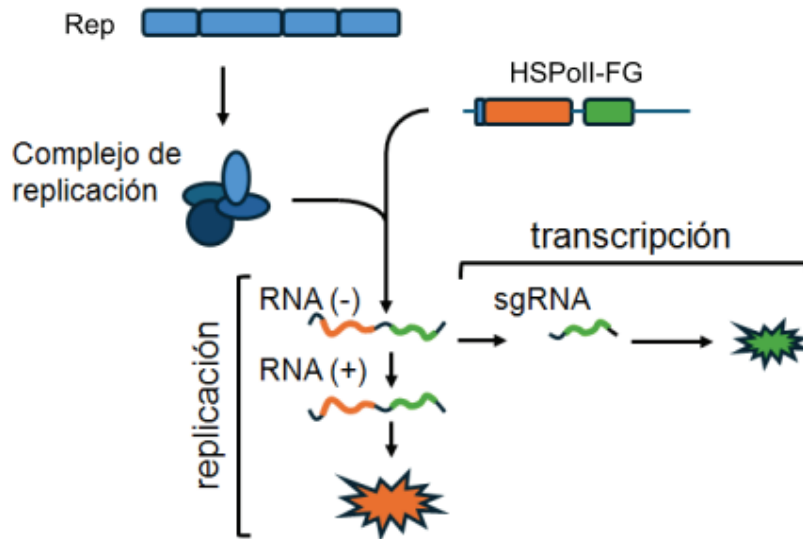


Figura 21: Esquema del sistema de replicación en trans.

Esta herramienta se puso a punto en el laboratorio por primera vez, para lo cual fue necesario la obtención de los correspondientes plásmidos.

2.1. Obtención de plásmidos Rep, Rep-GAA y HSPoll-FG :

Se realizaron preparaciones de ADN de los plásmidos del sistema de replicación en trans y se verificó su identidad mediante digestión con enzimas de restricción. Los ADN de los plásmidos Rep y Rep-GAA se digirieron con la enzima EcoRI. Por su parte, el plásmido reportero se digirió con las enzimas EcoRI y BamHI. Luego de la digestión, los productos se resolvieron en gel de agarosa 0,8% y se obtuvieron los siguientes resultados.

Como se puede observar en la Figura 22, en C y D, se observó el mismo patrón de digestión con dos bandas, una que se encuentra en torno a las 2000 pb de longitud y otra de peso molecular superior a 10000 pb. El patrón concuerda con lo esperado para la digestión con EcoRI de los plásmidos Rep y Rep-GAA. En E, se observa una única banda de algo menos de 6000 pb, que se corresponde con la banda de mayor peso molecular (5701 pb) esperada para la digestión con EcoRI y BamHI del plásmido reportero. Debido a que la segunda banda esperada para esta digestión tiene un peso de 295 pb, es de esperar que no se haya observado en estas

condiciones de corrida. Estos resultados confirman la identidad de los plásmidos obtenidos en la preparación de los mismos.

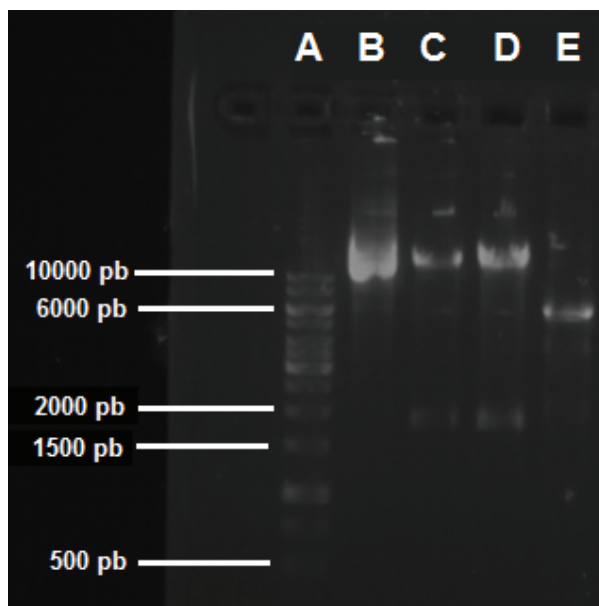


Figura 22: Corrida electroforetica del marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (A), plásmido Rep (B), plásmido Rep digerido con EcoRI (C), plásmidos Rep-GAA digerido con EcoRI (D), y plásmido reportero HSPoll-FG digerido con EcoRI y BamHI (E), en gel de agarosa 0,8%.

2.2. QMED2 tiene como blanco el complejo de replicación viral:

Finalmente, para determinar si el QMED2 actúa sobre la replicación del genoma de CHIKV, se realizó un ensayo con el sistema de replicación en trans, en el que la actividad de enzimas luciferasas reporta la capacidad de replicación-transcripción del complejo de replicación viral en ausencia y presencia del compuesto.

Para evaluar la actividad de QMED2 sobre la replicasa viral, se cotransfectaron células BHK con los plásmidos Rep + HSPoll-FG, y se trataron con QMED2. Se incluyeron controles sin tratar, y controles cotransfectados con *Rep-GAA* + HSPoll-FG.

En un ensayo piloto (Figura 23) se pudo observar una disminución de la actividad de ambas luciferasas dependiente de la concentración de QMED2. En estas

condiciones experimentales, el tratamiento con 50 μM de QMED2 no resultó citotóxico y la actividad de ambas luciferasas fue comparable a la observada en la condición de transfección con la replicasa mutante no funcional, la cual a su vez fue aproximadamente 3 órdenes de magnitud menor a la observada en la condición de transfección con la replicasa funcional sin tratamiento. En cuanto a la condición de tratamiento con 25 μM , el descenso en la actividad de las luciferasas fue de más de un orden de magnitud respecto a la condición de transfección con la replicasa funcional sin tratar. Todo esto sugiere que QMED2 tiene como blanco alguna de las proteínas no estructurales (nsp1-4) que conforman el complejo de replicación de CHIKV, de manera que afecta la replicación y transcripción de su genoma.

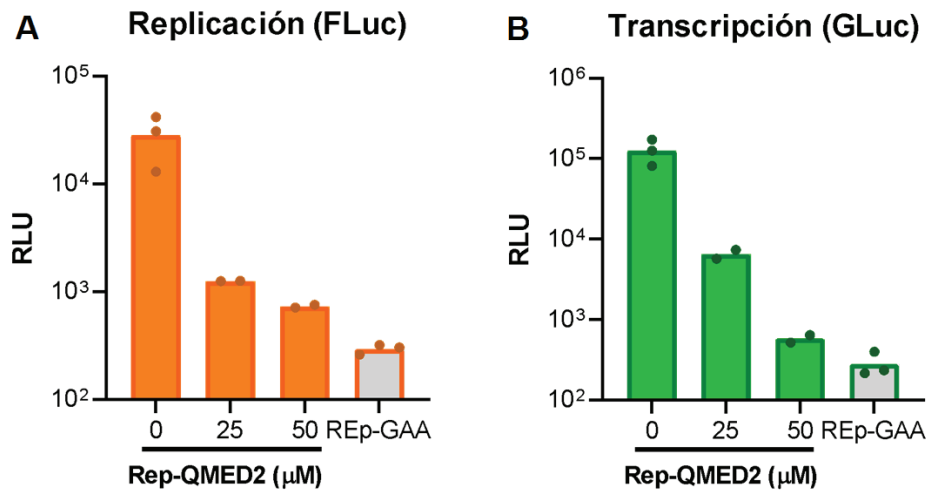


Figura 23: Actividad de QMED2 sobre la replicasa de CHIKV. Se muestran las RLU (unidades relativas de luminiscencia) para cada condición. REp-GAA corresponde a la transfección con la replicasa mutante, no funcional, y el plásmido reportero, sin tratar con compuesto. Las condiciones REp-QMED2 50 μM y REp-QMED2 25 μM corresponden a las condiciones transfectadas con la replicasa funcional, el plásmido reportero, y que fueron tratadas con 50 μM y 25 μM de QMED2 respectivamente. (A) RLU producidas por la luciferasa de luciérnaga (FLuc). (B) RLU producidas por la luciferasa de Gaussia (GLuc).

Discusión

En este trabajo de tesis se identificó un derivado de 4-amino-quinazolina (QMED2) con actividad antiviral contra CHIKV en el orden micromolar y alta selectividad. El estudio del modo de acción sugiere que este compuesto actúa sobre la etapa de replicación del genoma viral.

En la actualidad, el tratamiento de la infección por CHIKV es sintomático y no resuelve la enfermedad. Si bien se han reportado numerosas moléculas antivirales activas in vitro frente a distintos blancos virales [89], no se cuenta aún con un tratamiento específico efectivo clínicamente. Por eso, se plantea la necesidad de identificar nuevas moléculas activas contra CHIKV y la búsqueda de nuevos compuestos antivirales es un área de investigación activa. En este contexto, el presente trabajo aporta en la identificación y caracterización de QMED2 como un nuevo compuesto con actividad antiviral frente a CHIKV.

Las quinazolininas son un grupo de compuestos con diversas actividades biológicas, entre ellas antivirales. Previamente se reportó la actividad de distintos derivados de quinazolininas activas frente a virus de ARN que tendrían como blanco la ARN polimerasa viral (RdRp) [74, 75]. La RdRp son enzimas fundamentales para la replicación viral y se encuentran conservadas entre virus con genoma de ARN [38-40], por eso resulta un blanco atractivo para el desarrollo de antivirales.

Teniendo en cuenta esto, en este trabajo de tesis se planteó que las 4-amino-quinazolininas presentan actividad contra CHIKV, posiblemente con la RdRp como blanco, por lo que se evaluó la actividad anti-CHIKV de un panel de ocho 4-amino-quinazolininas y se estudió el modo de acción del compuesto con mejor perfil de actividad.

De las 4-amino-quinazolininas evaluadas, los hits QMED2 y QMED3 presentaron actividad antiviral contra CHIKV en el orden micromolar y alta selectividad, con CE_{50} comparables a las reportadas para otras quinazolininas contra este mismo virus [80-82]. La sustitución de las quinazolininas en la posición 4 con piperazina y un resto fenilo son características de estos hits, y parecen ser importantes para la actividad antiviral de estos compuestos.

De acuerdo con la hipótesis planteada en este trabajo, los ensayos de tiempo de agregado del QMED2 y Favipiravir, un inhibidor nucleosídico de la polimerasa viral [66], sugirieron que QMED2 actuaría en tiempos similares a éste, con pérdida del efecto antiviral a partir de las 4 h p.i, lo que es comparable a lo reportado por Delang y col. [65] en donde se observó que el agregado de Favipiravir entre las 4 y 6 h p.i resulta en la disminución de la actividad antiviral y como consecuencia el aumento gradual del ARN viral intracelular. Por otro lado, el ensayo de trans-replicación sugiere que QMED2 tendría como target el complejo de replicación viral, inhibiendo la replicación y transcripción del genoma de CHIKV.

Si bien QMED2 actúa a tiempos similares que Favipiravir, se espera que su mecanismo de acción sea diferente por no tratarse de un análogo de nucleósido. Se han reportado derivados de quinazolininas que actúan como inhibidores alostéricos, y tienen como blanco cavidades hidrofóbicas en motivos como el pulgar y los dedos de la polimerasa viral [74, 75 y 79], por lo que es posible que QMED2 tenga como blanco alguno de estos sitios.

Para confirmar el blanco de acción de QMED2 y conocer un posible sitio de unión, sería necesario seleccionar virus resistente a dicho compuesto, para luego determinar las mutaciones seleccionadas asociadas a dicha resistencia, como realizó Delang y col. [65], donde la resistencia a Favipiravir está dada principalmente por una mutación en el sub-dominio F1 de la RdRp de CHIKV, el cual está involucrado en la unión y posicionamiento de los nucleótidos sustrato. Las mutaciones que se seleccionen podrán ser insertadas en el clon infeccioso de CHIKV-ZsGreen o en el plásmido Rep para confirmar la asociación de dicho cambio genotípico con la resistencia fenotípica.

Finalmente, la identificación del blanco de acción antiviral permitirá, por un lado, estimar el mecanismo de acción antiviral mediante metodologías *in silico* y guiar la optimización molecular de los hits seleccionados en este trabajo para obtener nuevos derivados de 4-amino-quinazolininas con el objetivo de desarrollar moléculas líderes con propiedades farmacológicas adecuadas y mejor perfil de actividad.

Conclusión

A partir de una serie de 4-amino Quinazolininas se pudieron identificar compuestos activos frente a CHIKV, QMED2 y QMED3, con actividad antiviral en el orden del micromolar y altos índices de selectividad. Los estudios de modo de acción sugieren, de acuerdo a la hipótesis planteada, que estos compuestos inhiben la replicación-transcripción del genoma de CHIKV con alguna de las proteínas no estructurales (nsp1-4) que conforman el complejo de replicación viral como blanco.

Referencias:

1. Weaver SC, Lecuit M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *N Engl J Med*. 2015 Mar 26;372(13):1231-9. doi: 10.1056/NEJMra1406035. PMID: 25806915.
2. Brouard C, Bernillon P, Quatresous I, Pillonel J, Assal A, De Valk H, Desenclos JC; workgroup "Quantitative Estimation of the Risk of Blood Donation Contamination by Infectious Agents". Estimated risk of Chikungunya viremic blood donation during an epidemic on Reunion Island in the Indian Ocean, 2005 to 2007. *Transfusion*. 2008 Jul;48(7):1333-41. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.01646.x. Epub 2008 Feb 22. PMID: 18298600.
3. van Duijl-Richter MK, Hoornweg TE, Rodenhuis-Zybert IA, Smit JM. Early Events in Chikungunya Virus Infection-From Virus Cell Binding to Membrane Fusion. *Viruses*. 2015 Jul 7;7(7):3647-74. doi: 10.3390/v7072792. PMID: 26198242; PMCID: PMC4517121.
4. Staikowsky F, Talarmin F, Grivard P, Souab A, Schuffenecker I, Le Roux K, Lecuit M, Michault A. Prospective study of Chikungunya virus acute infection in the Island of La Réunion during the 2005-2006 outbreak. *PLoS One*. 2009 Oct 28;4(10):e7603. doi: 10.1371/journal.pone.0007603. PMID: 19893613; PMCID: PMC2764049.
5. Srivastava P, Kumar A, Hasan A, Mehta D, Kumar R, Sharma C, Sunil S. Disease Resolution in Chikungunya-What Decides the Outcome? *Front Immunol*. 2020 Apr 28;11:695. doi: 10.3389/fimmu.2020.00695. PMID: 32411133; PMCID: PMC7198842.
6. Mehta R, Gerardin P, de Brito CAA, Soares CN, Ferreira MLB, Solomon T. The neurological complications of chikungunya virus: A systematic review. *Rev Med Virol*. 2018 May;28(3):e1978. doi: 10.1002/rmv.1978. Epub 2018 Apr 19. PMID: 29671914; PMCID: PMC5969245.
7. Gérardin P, Barau G, Michault A, Bintner M, Randrianaivo H, Choker G, Lenglet Y, Touret Y, Bouveret A, Grivard P, Le Roux K, Blanc S, Schuffenecker I, Couderc T, Arenzana-Seisdedos F, Lecuit M, Robillard PY. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Réunion. *PLoS Med*. 2008 Mar 18;5(3):e60. doi: 10.1371/journal.pmed.0050060. PMID: 18351797; PMCID: PMC2267812.
8. Schilte C, Staikowsky F, Couderc T, Madec Y, Carpentier F, Kassab S, Albert ML, Lecuit M, Michault A. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(3):e2137. doi: 10.1371/journal.pntd.0002137. Epub 2013 Mar 21. Erratum in: *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 Mar;7(3). doi:10.1371/annotation/850ee20f-2641-46ac-b0c6-ef4ae79b6de6. Staikovsky, Frédérik [corrected to Staikowsky, Frederik]. PMID: 23556021; PMCID: PMC3605278.
9. Puntasecca CJ, King CH, LaBeaud AD. Measuring the global burden of chikungunya and Zika viruses: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021 Mar 4;15(3):e0009055. doi: 10.1371/journal.pntd.0009055. PMID: 33661908; PMCID: PMC7932082.

10. Morrison TE. Reemergence of chikungunya virus. *J Virol.* 2014 Oct;88(20):11644-7. doi: 10.1128/JVI.01432-14. Epub 2014 Jul 30. PMID: 25078691; PMCID: PMC4178719.
11. Powers AM, Brault AC, Tesh RB, Weaver SC. Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *J Gen Virol.* 2000 Feb;81(Pt 2):471-9. doi: 10.1099/0022-1317-81-2-471. PMID: 10644846.
12. Carey DE. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? *J Hist Med Allied Sci.* 1971 Jul;26(3):243-62. doi: 10.1093/jhmas/xxvi.3.243. PMID: 4938938.
13. Sharif N, Sarkar MK, Ferdous RN, Ahmed SN, Billah MB, Talukder AA, Zhang M, Dey SK. Molecular Epidemiology, Evolution and Reemergence of Chikungunya Virus in South Asia. *Front Microbiol.* 2021 Jun 7;12:689979. doi: 10.3389/fmicb.2021.689979. PMID: 34163459; PMCID: PMC8215147.
14. Chretien JP, Anyamba A, Bedno SA, Breiman RF, Sang R, Sergon K, Powers AM, Onyango CO, Small J, Tucker CJ, Linthicum KJ. Drought-associated chikungunya emergence along coastal East Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 Mar;76(3):405-7. PMID: 17360859.
15. Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, Cordioli P, Fortuna C, Boros S, Magurano F, Silvi G, Angelini P, Dottori M, Ciufolini MG, Majori GC, Cassone A; CHIKV study group. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet.* 2007 Dec 1;370(9602):1840-6. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61779-6. PMID: 18061059.
16. Volk SM, Chen R, Tsetsarkin KA, Adams AP, Garcia TI, Sall AA, Nasar F, Schuh AJ, Holmes EC, Higgs S, Maharaj PD, Brault AC, Weaver SC. Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. *J Virol.* 2010 Jul;84(13):6497-504. doi: 10.1128/JVI.01603-09. Epub 2010 Apr 21. Erratum in: *J Virol.* 2011 Jun;85(11):5706. PMID: 20410280; PMCID: PMC2903258.
17. Leparac-Goffart I, Nougairede A, Cassadou S, Prat C, de Lamballerie X. Chikungunya in the Americas. *Lancet.* 2014 Feb 8;383(9916):514. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60185-9. PMID: 24506907.
18. Lanciotti RS, Valadere AM. Transcontinental movement of Asian genotype chikungunya virus. *Emerg Infect Dis.* 2014 Aug;20(8):1400-2. doi: 10.3201/eid2008.140268. PMID: 25076384; PMCID: PMC4111183.
19. Mourad O, Makhani L, Chen LH. Chikungunya: An Emerging Public Health Concern. *Curr Infect Dis Rep.* 2022;24(12):217-228. doi: 10.1007/s11908-022-00789-y. Epub 2022 Nov 17. PMID: 36415286; PMCID: PMC9672624.
20. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Actualización Epidemiológica - Chikunguña en la Región de las Américas, 22 de abril de 2024 [Internet]. Washington, D.C.: OPS; 2024 [citado el 8 de diciembre de 2024]. Disponible en:

<https://www.paho.org/es/documentos/actualizacion-epidemiologica-chikunguna-region-amicas-22-abril-2024>.

21. Chen R, Puri V, Fedorova N, Lin D, Hari KL, Jain R, Rodas JD, Das SR, Shabman RS, Weaver SC. Comprehensive Genome Scale Phylogenetic Study Provides New Insights on the Global Expansion of Chikungunya Virus. *J Virol*. 2016 Nov 14;90(23):10600-10611. doi: 10.1128/JVI.01166-16. PMID: 27654297; PMCID: PMC5110187.
22. Costa-da-Silva AL, Ioshino RS, Petersen V, Lima AF, Cunha MDP, Wiley MR, Ladner JT, Prieto K, Palacios G, Costa DD, Suesdek L, Zanotto PMA, Capurro ML. First report of naturally infected *Aedes aegypti* with chikungunya virus genotype ECSA in the Americas. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Jun 14;11(6):e0005630. doi: 10.1371/journal.pntd.0005630. PMID: 28614394; PMCID: PMC5470658.
23. Cunha MS, Cruz NVG, Schnellrath LC, Medaglia MLG, Casotto ME, Albano RM, Costa LJ, Damaso CR. Autochthonous Transmission of East/Central/South African Genotype Chikungunya Virus, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2017 Oct;23(10):1737-1739. doi: 10.3201/eid2310.161855. PMID: 28930027; PMCID: PMC5621531.
24. Deeba F, Haider MSH, Ahmed A, Tazeen A, Faizan MI, Salam N, Hussain T, Alamery SF, Parveen S. Global transmission and evolutionary dynamics of the Chikungunya virus. *Epidemiol Infect*. 2020 Feb 19;148:e63. doi: 10.1017/S0950268820000497. PMID: 32070451; PMCID: PMC7118414.
25. Ng LFP, Rénia L. Live-attenuated chikungunya virus vaccine. *Cell*. 2024 Feb 15;187(4):813-813.e1. doi: 10.1016/j.cell.2024.01.033. PMID: 38364787.
26. Food and Drug Administration (FDA). La FDA aprueba la primera vacuna para prevenir la enfermedad causada por el virus del chikunguña [Internet]. Silver Spring, MD: FDA; 2024 [citado el 8 de diciembre de 2024]. Disponible en: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/la-fda-aprueba-la-primer-vacuna-para-prevenir-la-enfermedad-causada-por-el-virus-del-chikungunya>.
27. Valneva SE. Chikungunya vaccine [Internet]. Saint-Herblain: Valneva SE; 2024 [citado el 8 de diciembre de 2024]. Disponible en: <https://valneva.com/products/chikungunya-vaccine/>.
28. Vairo F, Haider N, Kock R, Ntoumi F, Ippolito G, Zumla A. Chikungunya: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features, Management, and Prevention. *Infect Dis Clin North Am*. 2019 Dec;33(4):1003-1025. doi: 10.1016/j.idc.2019.08.006. PMID: 31668189.
29. Fox JM, Pierson TC. Chikungunya virus assembly and egress. *Nat Microbiol*. 2022 Aug;7(8):1112-1113. doi: 10.1038/s41564-022-01190-0. PMID: 35918424.
30. Reis EVS, Damas BM, Mendonça DC, Abrahão JS, Bonjardim CA. In-Depth Characterization of the Chikungunya Virus Replication Cycle. *J Virol*. 2022 Feb 9;96(3):e0173221. doi: 10.1128/JVI.01732-21. Epub 2021 Nov 17. PMID: 34787452; PMCID: PMC8826905.
31. Akhrymuk I, Kulemzin SV, Frolova EI. Evasion of the innate immune response: the Old World alphavirus nsP2 protein induces rapid degradation of Rpb1, a catalytic subunit of RNA

- polymerase II. *J Virol*. 2012 Jul;86(13):7180-91. doi: 10.1128/JVI.00541-12. Epub 2012 Apr 18. PMID: 22514352; PMCID: PMC3416352.
32. Fros JJ, Liu WJ, Prow NA, Geertsema C, Ligtenberg M, Vanlandingham DL, Schnettler E, Vlak JM, Suhrbier A, Khromykh AA, Pijlman GP. Chikungunya virus nonstructural protein 2 inhibits type I/II interferon-stimulated JAK-STAT signaling. *J Virol*. 2010 Oct;84(20):10877-87. doi: 10.1128/JVI.00949-10. Epub 2010 Aug 4. PMID: 20686047; PMCID: PMC2950581.
 33. Forsell K, Griffiths G, Garoff H. Preformed cytoplasmic nucleocapsids are not necessary for alphavirus budding. *EMBO J*. 1996 Dec 2;15(23):6495-505. doi: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb01040.x. PMID: 8978676; PMCID: PMC452474.
 34. Haese N, Powers J, Streblow DN. Small Molecule Inhibitors Targeting Chikungunya Virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2022;435:107-139. doi: 10.1007/82_2020_195. PMID: 31974761.
 35. Choi KH, Rossmann MG. RNA-dependent RNA polymerases from Flaviviridae. *Curr Opin Struct Biol*. 2009 Dec;19(6):746-51. doi: 10.1016/j.sbi.2009.10.015. Epub 2009 Nov 14. PMID: 19914821.
 36. Ng KK, Arnold JJ, Cameron CE. Structure-function relationships among RNA-dependent RNA polymerases. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;320:137-56. doi: 10.1007/978-3-540-75157-1_7. PMID: 18268843; PMCID: PMC2441838.
 37. Reyes-Gastellou A, Jiménez-Alberto A, Castelán-Vega JA, Aparicio-Ozores G, Ribas-Aparicio RM. Chikungunya nsP4 homology modeling reveals a common motif with Zika and Dengue RNA polymerases as a potential therapeutic target. *J Mol Model*. 2021 Aug 13;27(9):247. doi: 10.1007/s00894-021-04868-0. PMID: 34386905.
 38. Freire MCLC, Basso LGM, Mendes LFS, Mesquita NCMR, Mottin M, Fernandes RS, Policastro LR, Godoy AS, Santos IA, Ruiz UEA, Caruso IP, Sousa BKP, Jardim ACG, Almeida FCL, Gil LHVG, Andrade CH, Oliva G. Characterization of the RNA-dependent RNA polymerase from Chikungunya virus and discovery of a novel ligand as a potential drug candidate. *Sci Rep*. 2022 Jun 22;12(1):10601. doi: 10.1038/s41598-022-14790-x. PMID: 35732685; PMCID: PMC9217121.
 39. Forrester NL, Guerbois M, Seymour RL, Spratt H, Weaver SC. Vector-borne transmission imposes a severe bottleneck on an RNA virus population. *PLoS Pathog*. 2012 Sep;8(9):e1002897. doi: 10.1371/journal.ppat.1002897. Epub 2012 Sep 13. PMID: 23028310; PMCID: PMC3441635.
 40. Weston J, Villoing S, Brémont M, Castric J, Pfeffer M, Jewhurst V, McLoughlin M, Rødseth O, Christie KE, Koumans J, Todd D. Comparison of two aquatic alphaviruses, salmon pancreas disease virus and sleeping disease virus, by using genome sequence analysis, monoclonal reactivity, and cross-infection. *J Virol*. 2002 Jun;76(12):6155-63. doi: 10.1128/jvi.76.12.6155-6163.2002. PMID: 12021349; PMCID: PMC136221.

41. Fresno M, Jiménez A, Vázquez D. Inhibition of translation in eukaryotic systems by harringtonine. *Eur J Biochem.* 1977 Jan;72(2):323-30. doi: 10.1111/j.1432-1033.1977.tb11256.x. PMID: 319998.
42. Kaur P, Thiruchelvan M, Lee RC, Chen H, Chen KC, Ng ML, Chu JJ. Inhibition of chikungunya virus replication by harringtonine, a novel antiviral that suppresses viral protein expression. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jan;57(1):155-67. doi: 10.1128/AAC.01467-12. Epub 2012 Oct 22. PMID: 23275491; PMCID: PMC3535938.
43. Hallenberger S, Bosch V, Angliker H, Shaw E, Klenk HD, Garten W. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature.* 1992 Nov 26;360(6402):358-61. doi: 10.1038/360358a0. PMID: 1360148.
44. Ozden S, Lucas-Hourani M, Ceccaldi PE, Basak A, Valentine M, Benjannet S, Hamelin J, Jacob Y, Mamchaoui K, Mouly V, Desprès P, Gessain A, Butler-Browne G, Chrétien M, Tangy F, Vidalain PO, Seidah NG. Inhibition of Chikungunya virus infection in cultured human muscle cells by furin inhibitors: impairment of the maturation of the E2 surface glycoprotein. *J Biol Chem.* 2008 Aug 8;283(32):21899-908. doi: 10.1074/jbc.M802444200. Epub 2008 Jun 17. PMID: 18559340.
45. Lucas-Hourani M, Dauzonne D, Jorda P, Cousin G, Lupan A, Helynck O, Caignard G, Janvier G, André-Leroux G, Khier S, Escriou N, Desprès P, Jacob Y, Munier-Lehmann H, Tangy F, Vidalain PO. Inhibition of pyrimidine biosynthesis pathway suppresses viral growth through innate immunity. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003678. doi: 10.1371/journal.ppat.1003678. Epub 2013 Oct 3. PMID: 24098125; PMCID: PMC3789760.
46. Khan M, Dhanwani R, Patro IK, Rao PV, Parida MM. Cellular IMPDH enzyme activity is a potential target for the inhibition of Chikungunya virus replication and virus induced apoptosis in cultured mammalian cells. *Antiviral Res.* 2011 Jan;89(1):1-8. doi: 10.1016/j.antiviral.2010.10.009. Epub 2010 Nov 9. PMID: 21070810.
47. Raveh A, Delekta PC, Dobry CJ, Peng W, Schultz PJ, Blakely PK, Tai AW, Maitainaho T, Irani DN, Sherman DH, Miller DJ. Discovery of potent broad spectrum antivirals derived from marine actinobacteria. *PLoS One.* 2013 Dec 5;8(12):e82318. doi: 10.1371/journal.pone.0082318. PMID: 24349254; PMCID: PMC3857800.
48. Broeckel R, Sarkar S, May NA, Totonchy J, Kreklywich CN, Smith P, Graves L, DeFilippis VR, Heise MT, Morrison TE, Moorman N, Streblow DN. Src Family Kinase Inhibitors Block Translation of Alphavirus Subgenomic mRNAs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019 Mar 27;63(4):e02325-18. doi: 10.1128/AAC.02325-18. PMID: 30917980; PMCID: PMC6496153.
49. Bourjot M, Delang L, Nguyen VH, Neyts J, Guéritte F, Leyssen P, Litaudon M. Prostratin and 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate are potent and selective inhibitors of Chikungunya virus replication. *J Nat Prod.* 2012 Dec 28;75(12):2183-7. doi: 10.1021/np300637t. Epub 2012 Dec 7. PMID: 23215460.

50. Staveness D, Abdelnabi R, Near KE, Nakagawa Y, Neyts J, Delang L, Leyssen P, Wender PA. Inhibition of Chikungunya Virus-Induced Cell Death by Salicylate-Derived Bryostatin Analogues Provides Additional Evidence for a PKC-Independent Pathway. *J Nat Prod*. 2016 Apr 22;79(4):680-4. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b01017. Epub 2016 Feb 22. PMID: 26900711; PMCID: PMC4942189.
51. Gupta DK, Kaur P, Leong ST, Tan LT, Prinsep MR, Chu JJ. Anti-Chikungunya viral activities of aplysiatoxin-related compounds from the marine cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum*. *Mar Drugs*. 2014 Jan 3;12(1):115-27. doi: 10.3390/md12010115. PMID: 24394406; PMCID: PMC3917264.
52. Wintachai P, Thuaud F, Basmadjian C, Roytrakul S, Ubol S, Désaubry L, Smith DR. Assessment of flavaglines as potential chikungunya virus entry inhibitors. *Microbiol Immunol*. 2015 Mar;59(3):129-41. doi: 10.1111/1348-0421.12230. PMID: 25643977; PMCID: PMC7168458.
53. Weber C, Sliva K, von Rhein C, Kümmerer BM, Schnierle BS. The green tea catechin, epigallocatechin gallate inhibits chikungunya virus infection. *Antiviral Res*. 2015 Jan;113:1-3. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.11.001. Epub 2014 Nov 11. PMID: 25446334.
54. Khan M, Santhosh SR, Tiwari M, Lakshmana Rao PV, Parida M. Assessment of in vitro prophylactic and therapeutic efficacy of chloroquine against Chikungunya virus in vero cells. *J Med Virol*. 2010 May;82(5):817-24. doi: 10.1002/jmv.21663. PMID: 20336760; PMCID: PMC7166494.
55. Blaising J, Polyak SJ, Pécheur EI. Arbidol as a broad-spectrum antiviral: an update. *Antiviral Res*. 2014 Jul;107:84-94. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.04.006. Epub 2014 Apr 24. PMID: 24769245; PMCID: PMC7113885.
56. Ho YJ, Wang YM, Lu JW, Wu TY, Lin LI, Kuo SC, Lin CC. Suramin Inhibits Chikungunya Virus Entry and Transmission. *PLoS One*. 2015 Jul 24;10(7):e0133511. doi: 10.1371/journal.pone.0133511. PMID: 26208101; PMCID: PMC4514758.
57. Albulescu IC, van Hoolwerff M, Wolters LA, Bottaro E, Nastruzzi C, Yang SC, Tsay SC, Hwu JR, Snijder EJ, van Hemert MJ. Suramin inhibits chikungunya virus replication through multiple mechanisms. *Antiviral Res*. 2015 Sep;121:39-46. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.06.013. Epub 2015 Jun 22. PMID: 26112648.
58. Battini L, Fidalgo DM, Álvarez DE, Bollini M. Discovery of a Potent and Selective Chikungunya Virus Envelope Protein Inhibitor through Computer-Aided Drug Design. *ACS Infect Dis*. 2021 Jun 11;7(6):1503-1518. doi: 10.1021/acsinfecdis.0c00915. Epub 2021 May 28. PMID: 34048233.
59. Bernard E, Solignat M, Gay B, Chazal N, Higgs S, Devaux C, Briant L. Endocytosis of chikungunya virus into mammalian cells: role of clathrin and early endosomal compartments. *PLoS One*. 2010 Jul 8;5(7):e11479. doi: 10.1371/journal.pone.0011479. PMID: 20628602; PMCID: PMC2900206.

60. Sharma R, Fatma B, Saha A, Bajpai S, Sistla S, Dash PK, Parida M, Kumar P, Tomar S. Inhibition of chikungunya virus by picolinate that targets viral capsid protein. *Virology*. 2016 Nov;498:265-276. doi: 10.1016/j.virol.2016.08.029. Epub 2016 Sep 9. PMID: 27614702.
61. Ivanova L, Rausalu K, Žusinaite E, Tammiku-Taul J, Merits A, Karelson M. 1,3-Thiazolbenzamide Derivatives as Chikungunya Virus nsP2 Protease Inhibitors. *ACS Omega*. 2021 Feb 17;6(8):5786-5794. doi: 10.1021/acsomega.0c06191. PMID: 33681617; PMCID: PMC7931429.
62. Singh H, Mudgal R, Narwal M, Kaur R, Singh VA, Malik A, Chaudhary M, Tomar S. Chikungunya virus inhibition by peptidomimetic inhibitors targeting virus-specific cysteine protease. *Biochimie*. 2018 Jun;149:51-61. doi: 10.1016/j.biochi.2018.04.004. Epub 2018 Apr 7. PMID: 29635044.
63. Rupp JC, Sokoloski KJ, Gebhart NN, Hardy RW. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *J Gen Virol*. 2015 Sep;96(9):2483-2500. doi: 10.1099/jgv.0.000249. Epub 2015 Jul 24. PMID: 26219641; PMCID: PMC4635493.
64. Ehteshami M, Tao S, Zandi K, Hsiao HM, Jiang Y, Hammond E, Amblard F, Russell OO, Merits A, Schinazi RF. Characterization of β -d-N4-Hydroxycytidine as a Novel Inhibitor of Chikungunya Virus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Mar 24;61(4):e02395-16. doi: 10.1128/AAC.02395-16. PMID: 28137799; PMCID: PMC5365705.
65. Delang L, Segura Guerrero N, Tas A, Quérat G, Pastorino B, Froeyen M, Dallmeier K, Jochmans D, Herdewijn P, Bello F, Snijder EJ, de Lamballerie X, Martina B, Neyts J, van Hemert MJ, Leyssen P. Mutations in the chikungunya virus non-structural proteins cause resistance to favipiravir (T-705), a broad-spectrum antiviral. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Oct;69(10):2770-84. doi: 10.1093/jac/dku209. Epub 2014 Jun 20. PMID: 24951535.
66. Furuta Y, Gowen BB, Takahashi K, Shiraki K, Smee DF, Barnard DL. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res*. 2013 Nov;100(2):446-54. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.09.015. Epub 2013 Sep 29. PMID: 24084488; PMCID: PMC3880838.
67. Ferreira AC, Reis PA, de Freitas CS, Sacramento CQ, Villas Bôas Hoelz L, Bastos MM, Mattos M, Rocha N, Gomes de Azevedo Quintanilha I, da Silva Gouveia Pedrosa C, Rocha Quintino Souza L, Correia Loiola E, Trindade P, Rangel Vieira Y, Barbosa-Lima G, de Castro Faria Neto HC, Boechat N, Rehen SK, Brüning K, Bozza FA, Bozza PT, Souza TML. Beyond Members of the *Flaviviridae* Family, Sofosbuvir Also Inhibits Chikungunya Virus Replication. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Jan 29;63(2):e01389-18. doi: 10.1128/AAC.01389-18. PMID: 30455237; PMCID: PMC6355571.
68. Agrawal T, Siddiqui G, Dahiya R, Patidar A, Madan U, Das S, Asthana S, Samal S, Awasthi A. Inhibition of early RNA replication in Chikungunya and Dengue virus by lycorine: In vitro and in silico studies. *Biochem Biophys Res Commun*. 2024 Oct 20;730:150393. doi: 10.1016/j.bbrc.2024.150393. Epub 2024 Jul 11. PMID: 39003865.

69. Pareek A, Kumar R, Mudgal R, Neetu N, Sharma M, Kumar P, Tomar S. Alphavirus antivirals targeting RNA-dependent RNA polymerase domain of nsP4 divulged using surface plasmon resonance. *FEBS J.* 2022 Aug;289(16):4901-4924. doi: 10.1111/febs.16397. Epub 2022 Feb 25. PMID: 35156752.
70. Wada Y, Orba Y, Sasaki M, Kobayashi S, Carr MJ, Nobori H, Sato A, Hall WW, Sawa H. Discovery of a novel antiviral agent targeting the nonstructural protein 4 (nsP4) of chikungunya virus. *Virology.* 2017 May;505:102-112. doi: 10.1016/j.virol.2017.02.014. Epub 2017 Feb 23. PMID: 28236746.
71. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research (IJPSR). Quinoline: A diverse therapeutic agent [Internet]. IJPSR; 2024 [citado el 8 de diciembre de 2024]. Disponible en: <https://ijpsr.com/bft-article/quinoline-a-diverse-therapeutic-agent/>.
72. Corey EJ, Schmidt G. Useful procedures for the oxidation of alcohols involving pyridinium dichromate in aprotic media. *Chem Rev* [Internet]. 1979;79(2):183-200 [citado el 8 de diciembre de 2024]. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr60095a006>.
73. Shang XF, Morris-Natschke SL, Yang GZ, Liu YQ, Guo X, Xu XS, Goto M, Li JC, Zhang JY, Lee KH. Biologically active quinoline and quinazoline alkaloids part II. *Med Res Rev.* 2018 Sep;38(5):1614-1660. doi: 10.1002/med.21492. Epub 2018 Feb 27. PMID: 29485730; PMCID: PMC6105521.
74. Castro EF, Casal JJ, de Marco MJE, Battini L, Fabiani M, Fernández GA, Bruno AM, Cavallaro LV, Bollini M. Identification of potent bovine viral diarrhea virus inhibitors by a structure-based virtual screening approach. *Bioorg Med Chem Lett.* 2019 Jan 15;29(2):262-266. doi: 10.1016/j.bmcl.2018.11.041. Epub 2018 Nov 23. PMID: 30501966.
75. Fernández GA, Castro EF, Rosas RA, Fidalgo DM, Adler NS, Battini L, España de Marco MJ, Fabiani M, Bruno AM, Bollini M, Cavallaro LV. Design and Optimization of Quinazoline Derivatives: New Non-nucleoside Inhibitors of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Front Chem.* 2020 Dec 10;8:590235. doi: 10.3389/fchem.2020.590235. PMID: 33425849; PMCID: PMC7793975.
76. Saul S, Pu SY, Zuercher WJ, Einav S, Asquith CRM. Potent antiviral activity of novel multi-substituted 4-anilinoquin(az)olines. *Bioorg Med Chem Lett.* 2020 Aug 15;30(16):127284. doi: 10.1016/j.bmcl.2020.127284. Epub 2020 May 27. PMID: 32631507.
77. Xu S, Sun L, Barnett M, Zhang X, Ding D, Gattu A, Shi D, Taka JRH, Shen W, Jiang X, Cocklin S, De Clercq E, Pannecouque C, Goldstone DC, Liu X, Dick A, Zhan P. Discovery, Crystallographic Studies, and Mechanistic Investigations of Novel Phenylalanine Derivatives Bearing a Quinazolin-4-one Scaffold as Potent HIV Capsid Modulators. *J Med Chem.* 2023 Dec 14;66(23):16303-16329. doi: 10.1021/acs.jmedchem.3c01647. Epub 2023 Dec 6. PMID: 38054267; PMCID: PMC10790229.
78. Zhou S, Wang K, Hu Z, Chen T, Dong Y, Gao R, Wu M, Li Y, Ji X. Design, synthesis, and structure-activity relationships of a novel class of quinazoline derivatives as coronavirus

- inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2023 Dec 5;261:115831. doi: 10.1016/j.ejmech.2023.115831. Epub 2023 Sep 25. PMID: 37813064.
79. Nasr T, Aboshanab AM, Mpekoulis G, Drakopoulos A, Vassilaki N, Zoidis G, Abouzid KAM, Zagahary W. Novel 6-Aminoquinazolinone Derivatives as Potential Cross GT1-4 HCV NS5B Inhibitors. *Viruses.* 2022 Dec 12;14(12):2767. doi: 10.3390/v14122767. PMID: 36560772; PMCID: PMC9782603.
 80. Hwu JR, Roy A, Tsay SC, Huang WC, Lin CC, Hwang KC, Hu YC, Shieh FK, Leyssen P, Neyts J. Computer-Aided Design and Synthesis of (Functionalized quinazoline)-(α-substituted coumarin)-arylsulfonate Conjugates against Chikungunya Virus. *Int J Mol Sci.* 2022 Jul 11;23(14):7646. doi: 10.3390/ijms23147646. PMID: 35886992; PMCID: PMC9322071.
 81. Hwu JR, Kapoor M, Gupta NK, Tsay SC, Huang WC, Tan KT, Hu YC, Lyssen P, Neyts J. Synthesis and antiviral activities of quinazolinamine-coumarin conjugates toward chikungunya and hepatitis C viruses. *Eur J Med Chem.* 2022 Mar 15;232:114164. doi: 10.1016/j.ejmech.2022.114164. Epub 2022 Feb 1. PMID: 35176562.
 82. Saha A, Acharya BN, Parida M, Saxena N, Rajaiya J, Dash PK. Identification of 2,4-Diaminoquinazoline Derivative as a Potential Small-Molecule Inhibitor against Chikungunya and Ross River Viruses. *Viruses.* 2023 Oct 31;15(11):2194. doi: 10.3390/v15112194. PMID: 38005871; PMCID: PMC10674894.
 83. Promega Corporation. CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS) [Internet]. Madison, WI: Promega Corporation; 2024 [citado el 8 de diciembre de 2024]. Disponible en: <https://worldwide.promega.com/es-es/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-96-aqueous-non-radioactive-cell-proliferation-assay-mts/?catNum=G5421>.
 84. Lello LS, Utt A, Bartholomeeusen K, Wang S, Rausalu K, Kendall C, Coppens S, Frangkoudis R, Tuplin A, Alphey L, Ariën KK, Merits A. Cross-utilisation of template RNAs by alphavirus replicases. *PLoS Pathog.* 2020 Sep 4;16(9):e1008825. doi: 10.1371/journal.ppat.1008825. PMID: 32886709; PMCID: PMC7498090.
 85. Utt A, Quirin T, Saul S, Hellström K, Ahola T, Merits A. Versatile Trans-Replication Systems for Chikungunya Virus Allow Functional Analysis and Tagging of Every Replicase Protein. *PLoS One.* 2016 Mar 10;11(3):e0151616. doi: 10.1371/journal.pone.0151616. PMID: 26963103; PMCID: PMC4786200.
 86. TransGen Biotech. EasyTaq® DNA Polymerase [Internet]. Beijing: TransGen Biotech; 2019 [citado el 8 de diciembre de 2024]. Disponible en: <https://www.transgenbiotech.com/data/upload/201911/e8d6724bada9172520094eaecd68163c.pdf>.
 87. Thermo Fisher Scientific. GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use [Internet]. Waltham, MA: Thermo Fisher Scientific; 2019 [citado el 8 de diciembre de 2024]. Disponible en:

https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0013004_GeneRuler_1kb_DNALadder_250ug_UG.pdf.

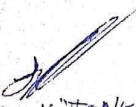
88. Promega Corporation. Dual-Luciferase® Reporter Assay System [Internet]. Madison, WI: Promega Corporation; 2024 [citado el 8 de diciembre de 2024]. Disponible en: https://worldwide.promega.com/products/luciferase-assays/reporter-assays/dual_luciferase-reporter-assay-system/?catNum=E1910.
89. Haese N, Powers J, Streblow DN. Small Molecule Inhibitors Targeting Chikungunya Virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2022;435:107-139. doi: 10.1007/82_2020_195. PMID: 31974761.

Certificado de Versión Final de Tesis

Yo, Lorenzo Vittone, DNI 42142936, en calidad de autor de la tesis titulada "**Identificación y estudio de nuevas moléculas antivirales para Chikungunya**", presentada en el marco de la carrera de Licenciatura en Biotecnología en la Universidad Nacional de San Martín, certifico que el presente documento constituye la versión final de la misma.

Declaro que esta versión incluye todas las correcciones y sugerencias indicadas por el jurado evaluador durante el proceso de revisión y defensa de la tesis, cumpliendo así con los requisitos académicos establecidos.

Fecha: 21/03/2025


LORENZO VITONE
Autor


Elena F. Castro
Directora


Juan Alvarez
Co-director