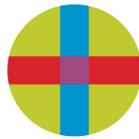


**Universidad CEU San Pablo**  
**CEINDO – CEU Escuela Internacional de Doctorado**

**PROGRAMA en CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA SALUD**



**CEU**

*Escuela Internacional  
de Doctorado*

**Desarrollo y aplicación de métodos basados  
en fluorescencia para la determinación  
rápida de la actividad de las polimerasas de  
virus ARN**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:  
Yanira Sáez Álvarez

Dirigida por:  
Carmen del Águila de la Puente  
Rubén Agudo Torres

MADRID  
2022

## Agradecimientos

## Índice

<b>Listado de abreviaturas .....</b>	<b>1</b>
<b>I. RESUMEN .....</b>	<b>5</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
<b>1. Virus: concepto e historia.....</b>	<b>10</b>
<b>2. Clasificación y orden general .....</b>	<b>11</b>
<b>3. Virus de ARN .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1 La dinámica de las cuasiespecies de los virus de ARN. ....</b>	<b>13</b>
<b>3.2 El elemento común entre todos los Virus ARN .....</b>	<b>15</b>
3.2.1 Las ARN polimerasas dependientes de ARN (RdRp) .....	16
3.2.2 Actividad de las RdRp.....	18
3.2.3 Inhibidores de las RdRp.....	20
<b>4. La familia Flaviviridae .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1 Características generales .....</b>	<b>24</b>
<b>4.2 Clasificación.....</b>	<b>25</b>
<b>4.3 Genoma y ciclo replicativo.....</b>	<b>25</b>
<b>4.4 Proteínas no estructurales.....</b>	<b>27</b>
4.4.1 Proteína NS1 .....	27
4.4.2 Proteína NS2 .....	27
4.4.3 Proteína NS3 .....	28
4.4.4 Proteína NS4 .....	28
4.4.5 Proteína NS5 .....	29
<b>5. Flavivirus de importancia clínica.....</b>	<b>30</b>
<b>5.1 Virus del Zika (ZIKV) .....</b>	<b>32</b>
5.1.1 Transmisión.....	32
5.1.2 Presentación clínica .....	33
5.1.3 Tratamiento y prevención.....	34
<b>5.2 Virus del Nilo Occidental (WNV).....</b>	<b>35</b>
5.2.1 Transmisión.....	35
5.2.2 Presentación clínica .....	36
5.2.3 Tratamiento y prevención.....	37
<b>6. Nuevos virus: SARS-CoV-2 .....</b>	<b>38</b>
<b>6.1 Transmisión .....</b>	<b>38</b>
<b>6.2 Presentación clínica .....</b>	<b>39</b>
<b>6.3 Genoma y ciclo replicativo.....</b>	<b>40</b>
6.3.1 Proteínas no estructurales.....	41
<b>6.4 Tratamiento y prevención .....</b>	<b>44</b>
<b>7. Búsqueda de nuevos compuestos antivirales.....</b>	<b>44</b>
<b>III. OBJETIVOS .....</b>	<b>47</b>
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
<b>1. Materiales.....</b>	<b>49</b>
1.1 Medios de cultivo.....	49
1.2 Reactivos generales .....	49
1.3 Enzimas.....	50
1.4 Plásmidos con regiones codificantes.....	50

1.5	Reactivos para las reacciones en geles de poliacrilamida y agarosa .....	51
1.6	Oligonucleótidos .....	51
1.7	Soluciones empleadas.....	52
<b>2.</b>	<b>Métodos .....</b>	<b>54</b>
2.1	Clonaje y mutagénesis dirigida .....	54
2.1.1	Virus del Zika .....	54
a)	Clonaje del dominio RdRp de ZIKV NS5 en el plásmido pET16b .....	54
b)	Mutagénesis del plásmido pET16b-ZIKV-NS5RdRp para la generación de un mutante catalíticamente inactivo .....	55
c)	Mutagénesis del plásmido pET16b-ZIKV-NS5RdRp para la generación de mutantes del bolsillo N.....	55
2.1.2	Virus del Nilo Occidental.....	55
a)	Clonaje del dominio RdRp de WNV NS5 en el plásmido pET16b.....	55
b)	Obtención de un mutante catalíticamente inactivo para WNV NS5 RdRp .....	56
2.1.3	Virus SARS-CoV-2.....	57
a)	Obtención de un mutante catalíticamente inactivo para la nsp12 de SARS-CoV-2.....	57
2.1.4	Virus de Hepatitis C .....	57
a)	Clonaje de la proteína HCV NS5b en el plásmido pET28a.....	57
b)	Obtención de un mutante catalíticamente inactivo para HCV NS5b RdRp .....	57
2.1.5	Protocolos y componentes empleados en las reacciones de mutagénesis y amplificación de las polimerasas virales. ....	58
2.2	Expresión de las polimerasas virales.....	59
2.2.1	ZIKV NS5 RdRp .....	59
2.2.2	WNV NS5 RdRp .....	59
2.2.3	SARS-CoV-2 nsp12 RdRp, nsp7, nsp8, nsp7-8, nsp7L8 .....	60
2.2.4	HCV NS5b RdRp.....	60
2.2.5	FMDV 3D RdRp.....	60
2.3	Purificación de las polimerasas virales.....	60
2.3.1	ZIKV NS5 RdRp .....	60
2.3.2	WNV NS5 RdRp .....	62
2.3.3	SARS-CoV-2 nsp12 RdRp, nsp7, nsp8, nsp7-8, nsp7L8 .....	62
2.3.4	HCV NS5b RdRp.....	62
2.3.5	FMDV 3D pol RdRp.....	63
2.4	Ensayo de fluorescencia basado en la actividad polimerasa a tiempo real .....	63
2.4.1	ZIKV NS5 RdRp.....	64
a)	Puesta a punto general del método .....	64
b)	Determinación de la $K_M$ y la $V_{max}$ de la enzima .....	64
c)	Búsqueda de inhibidores de ZIKV NS5 RdRp en las quimiotecas con actividad antikinotoplástida. ....	65
d)	Cálculo de la $IC_{50}$ de los inhibidores de ZIKV NS5 RdRp .....	65
2.4.2	WNV NS5 RdRp.....	66
a)	Puesta a punto general del método .....	66
b)	Determinación de la $K_M$ y la $V_{max}$ de la enzima .....	66
d)	Actividad en presencia de compuestos potencialmente inhibitorios.....	66
e)	Cálculo de la $IC_{50}$ de los inhibidores de WNV NS5 RdRp .....	67
2.4.3	SARS-CoV-2 nsp12 RdRp, nsp7, nsp8 y nsp7L8.....	67
a)	Puesta punto del ensayo con el complejo replicativo transcriptivo formado por SARS-CoV-2 nsp12 RdRp, nsp7, nsp8 y nsp7L8 .....	67
2.4.4	HCV NS5b RdRp .....	67
2.4.5	FMDV 3D pol RdRp.....	68
2.5	Ensayos de actividad basados en fluorescencia medidos a tiempo final.....	68
2.5.1	ZIKV NS5 RdRp .....	68
2.5.2	WNV NS5 RdRp .....	68

2.6	Ensayos de actividad basado en radioactividad medidos a tiempo final.....	69
2.6.1	ZIKV NS5 RdRp y HCV NS5b RdRp .....	69
2.7	Análisis de la idoneidad del ensayo de fluorescencia como plataforma de muestreo de alto rendimiento .....	69
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>72</b>
1.	Virus del Zika.....	72
1.1	Purificación y caracterización bioquímica de la ZIKV NS5 RdRp .....	72
1.2	Detección de la actividad polimerasa de ZIKV RdRp mediante ensayos fluorimétricos a tiempo real. ....	75
1.3	Optimización del ensayo de detección basado en fluorescencia .....	77
1.4	Adaptación del ensayo fluorométrico para la detección de compuestos con potencial inhibitorio de la polimerasa de ZIKV.....	79
1.5	Búsqueda de nuevos inhibidores en quimiotecas comerciales .....	82
1.6	Construcción de mutantes para la polimerasa de ZIKV .....	85
2.	Virus del Nilo Occidental .....	87
2.1	Expresión y purificación WNV NS5 RdRp .....	87
2.2	Detección de la actividad polimerasa a tiempo real.....	88
2.3	Optimización del ensayo de detección basado en la fluorescencia .....	89
2.4	Actividad polimerasa en presencia de antivirales de amplio espectro .....	91
2.5	Actividad polimerasa en presencia de los compuestos provenientes de la librería FLA-IQM 92	
2.6	Actividad polimerasa en presencia de los compuestos 6 y 15.....	93
3.	Validación del método en otras polimerasas de interés clínico. ....	94
3.1	Virus de la Hepatitis C y Virus de la Fiebre aftosa .....	94
3.2	Virus SARS-CoV-2 .....	97
3.3	Expresión y purificación del complejo replicativo de SARS-CoV-2 .....	97
3.4	Detección de la actividad polimerasa a tiempo real.....	98
<b>VI.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>104</b>
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>121</b>
<b>VIII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>124</b>

Listado de abreviaturas

3'dATP	Cordicepina 5'-trifosfato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN /ARN mc	ADN/ ARN de cadena sencilla
ADN/ARNbc	ADN/ARN de cadena doble
Amp	Ampicilina
APS	Persulfato amónico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
Bp	Pares de bases
Chlor	Cloranfenicol
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP/dNTP's	Desoxinucleótido trifosfato
DO	Densidad óptica
DS	Desviación estándar
DTT	1,4-ditiotreitol
<i>E.coli</i>	Bacteria <i>Eschericia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FMDV 3D-D338A pol RdRp*	ARN polimerasa dependiente de ARN catalíticamente inactiva del Virus de la Fiebre Aftosa
FMDV 3D-WT pol RdRp*	ARN polimerasa dependiente de ARN del Virus de la Fiebre Aftosa
Fw	Iniciador Sentido 5'a 3'
GTP	Guanosín trifosfato
HCV	Virus de la Hepatitis C
HCV NS5b RdRp*	ARN polimerasa dependiente de ARN NS5b del virus de la hepatitis C
HCV NS5b- WT RdRp*	ARN polimerasa dependiente de ARN del Virus de la Hepatitis C
HCV NS5b-GNN RdRp*	ARN polimerasa dependiente de ARN catalíticamente inactiva del Virus de la Hepatitis C
HCV NS5bΔ21-GNN RdRp*	ARN polimerasa dependiente de ARN NS5b del virus de la hepatitis C delecionada en los últimos 21 aminoácidos del extremo C terminal catalíticamente inactiva
HCV NS5bΔ21-WT RdRp*	ARN polimerasa dependiente de ARN NS5b del virus de la Hepatitis C delecionada en los últimos 21 aminoácidos del extremo C terminal
HEP	Heparina
HF-pol	ADN polimerasa de alta fidelidad <i>Phusion</i> <sup>®</sup>
HisPur <sup>™</sup> Ni-NTA	Resina de níquel-IMAC de alta capacidad y alto rendimiento para la purificación de afinidad de las proteínas de fusión etiquetadas con residuos de His.
HTS	Ensayos de detección de alto rendimiento, del inglés <i>High Throughput Screening Assays</i>

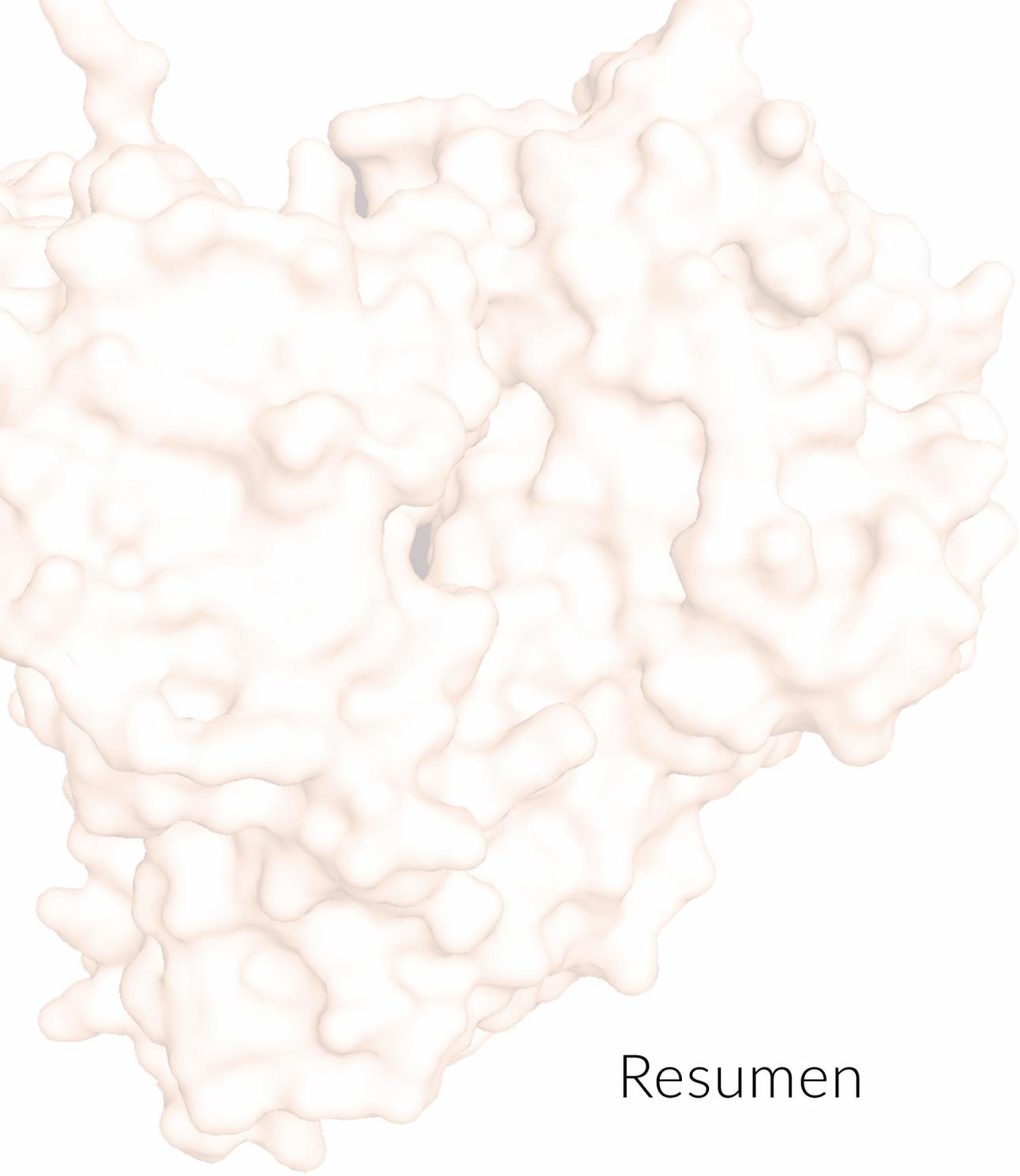
IC <sub>50</sub>	Concentración necesaria de una sustancia para inhibir la actividad de la enzima en un 50%
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
Kan	Kanamicina
Kb	Kilobases
kDa	KiloDaltons
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis-Menten: concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción es la mitad que de la Velocidad máxima de la enzima
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
min	Minutos
ml	Mililitro
mmol	Milimolar
nm	Nanómetros
NMP	Ribonucleótido monofosfato
NTP/NTP's	Nucleótido trifosfato
°C	Grados centígrados
ORF	Marco abierto de lectura
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Protein Data Bank
pm	Peso Molecular
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
Poli-A	Ácido poliadenílico de cadena sencilla de ARN
Poli-C	Ácido policitolídico de cadena sencilla de ARN
Poli-U	Ácido poliuridílico de cadena sencilla de ARN
RdRp	ARN polimerasa dependiente de ARN
rpm	Revoluciones por minuto
RTP	Ribaviridina 5'-trifosfato
Rv	Iniciador antisentido
s	Segundos
SARS-CoV-2 Nsp12 RdRp*	ARN polimerasa dependiente de ARN del virus SARS-CoV-2
SARS-CoV-2 Nsp7*	Proteína no estructural accesoria 7 del complejo replicativo del virus SARS-CoV-2
SARS-CoV-2 Nsp7L8/Nsp7-8*	Proteínas quiméricas de Nsp7 y Nsp8 del virus SARS-CoV-2
SARS-CoV-2 Nsp8*	Proteína no estructural accesoria 8 del complejo replicativo del virus SARS-CoV-2
SDS	Dodecilsulfato sódico
TAE	Tampón Tris-acetato-EDTA
TB	Medio <i>terrific broth</i>
TBE	Tampón Tris borato acetato
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina
tm	Temperatura de Melting
ufc	Unidades formadoras de colonias
V <sub>max</sub>	Velocidad máxima de la enzima

WNV NS5-GAA RdRp*	ARN polimerasa dependiente de ARN catalíticamente inactiva del Virus del Nilo Occidental
WNV NS5-WT RdRp*	ARN polimerasa dependiente de ARN del Virus del Nilo Occidental
ZIKV	Virus del Zika
ZIKV NS5-GNN RdRp*	ARN polimerasa dependiente de ARN NS5 catalíticamente inactiva del virus Zika
ZIKV NS5-WT RdRp*	ARN polimerasa dependiente de ARN NS5 del virus del Zika
μCi	Microcurio
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μM	Micromolar

\* El nombre de los virus se ha elegido en inglés para seguir los criterios de la comunidad científica.

#### Códigos de una y tres letras de aminoácidos

Alanina	Ala, A	Leucina	Leu, L
Arginina	Arg, R	Lisina	Lys, K
Ácido aspártico	Asp, D	Metionina	Met, M
Asparagina	Asn, N	Fenilalanina	Phe, F
Cisteína	Cys, C	Prolina	Pro, P
Ácido glutámico	Glu, E	Serina	Ser, S
Glicina	Gly, G	Tirosina	Tyr, Y
Glutamina	Gln, Q	Treonina	Thr, T
Histidina	His, H	Triptófano	Trp, W
Isoleucina	Ile, I	Valina	Val, V



Resumen

## I. RESUMEN

La gran incidencia de los virus de ARN a nivel global los convierte en patógenos con un alto impacto médico, medioambiental y veterinario. Su aparición y reemergencia ha provocado, en los últimos años, multitud de brotes epidémicos, cobrando especial importancia aquellos virus que son transmitidos por vectores artrópodos, como el virus del Zika o el virus del Nilo Occidental, y aquellos que son transmitidos mediante zoonosis, como el nuevo coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2).

Estos virus son responsables de enfermedades humanas que derivan en trastornos neurológicos graves y malformaciones congénitas en el caso de la infección por el virus del Zika, parálisis y encefalitis provocadas por el virus del Nilo Occidental e incluso infartos y hemorragias cerebrales en algunos pacientes, que se han contagiados del SARS-CoV-2. Todos estos síntomas pueden derivar en la muerte del paciente.

Desde su descubrimiento, se han realizado múltiples abordajes experimentales en la búsqueda de fármacos que puedan combatir las enfermedades producidas por estos virus. Sin embargo, aunque se ha realizado un gran esfuerzo para el desarrollo de tratamientos terapéuticos contra estos virus, no existen hasta el momento medicamentos eficaces específicos para tratar las infecciones que causan.

Todos los virus de ARN replican sus genomas mediante polimerasas de ARN dependientes de ARN (RdRp). Se trata de una proteína imprescindible para la replicación viral sin equivalente conocido en los organismos susceptibles a la infección. En consecuencia, la actividad de esta enzima proporciona una diana muy atractiva para el desarrollo de antivirales directos con alta especificidad y baja toxicidad. De este modo, los inhibidores de la polimerasa viral constituyen uno de los campos de mayor éxito en la investigación antiviral.

En la presente Tesis Doctoral, se ha descrito un método basado en fluorescencia para monitorizar la actividad de polimerización a tiempo real de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) de virus como el Zika y el virus del Nilo Occidental. Mediante el uso de moldes de ARN monocatenarios homopoliméricos, la síntesis *de novo* de ARN puede ser detectada con un tinte fluorescente. Esto permite la cuantificación de la formación de ARN bicatenario y la caracterización enzimática de estas polimerasas.

La reproducibilidad del método diseñado permite su uso para el cribado de quimiotecas de compuestos con potencial efecto inhibitorio frente a estas polimerasas. Gracias a este método, mediante el reposicionamiento de una quimioteca de compuestos sin actividad antiviral descrita, se han podido descubrir y caracterizar dos nuevos inhibidores no análogos de nucleósido de la polimerasa del virus del Zika: TCMDC-143406 (compuesto 6) y TCMDC-143215 (compuesto 15). Ambos compuestos son capaces de inhibir *in vitro* la actividad polimerasa y mostrar efecto antiviral en ensayos en cultivos celulares.

Así mismo, la versatilidad y adaptabilidad de este método han sido demostradas utilizando otras polimerasas virales con requerimientos experimentales diferentes.

Mediante ligeras adaptaciones, se ha podido medir en tiempo real la actividad de la polimerasa del virus de la fiebre aftosa y del virus de la hepatitis C. En adición, los datos iniciales indican que el método también es exportable para medir la actividad de la polimerasa de SARS-CoV-2.

Los resultados aquí presentados demuestran que la plataforma basada en fluorescencia para medir la actividad polimerasa a tiempo real, representa una alternativa rápida, económica, fiable y eficaz para la medida de la actividad de distintas RdRp y el cribado de compuestos con potencial efecto inhibitorio frente a ellas.

## SUMMARY

The high incidence of RNA viruses globally makes them pathogens with a high medical, environmental, and veterinary impact. Its appearance and re-emergence have caused, in recent years, a multitude of epidemic outbreaks, with particular importance being those viruses that are transmitted by arthropod vectors, such as the Zika virus or the West Nile virus, and those that are transmitted through zoonoses, such as the new type 2 coronavirus that causes severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV-2).

These viruses are responsible for human diseases that lead to severe neurological disorders and congenital malformations in the case of Zika virus infection, paralysis, and encephalitis caused by the West Nile virus, and even strokes and cerebral hemorrhages in some patients, which have been infected with SARS-CoV-2. All these symptoms can lead to the death of the patient.

Since its discovery, multiple experimental approaches have been carried out in the search for drugs that can combat the diseases caused by these viruses. However, although a great effort has been made to develop treatments against these viruses, there are currently no specific effective drugs to treat the infections they cause.

All RNA viruses replicate their genomes by RNA-dependent RNA polymerases (RdRp). It is an essential protein for viral replication with no known equivalent in organisms susceptible to infection. Consequently, the activity of this enzyme provides a very attractive target for the development of direct antivirals with high specificity and low toxicity. Thus, viral polymerase inhibitors constitute one of the most successful fields in antiviral research.

In the present Doctoral Thesis, a fluorescence-based method has been described to monitor the real-time polymerization activity of RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of viruses such as Zika and West Nile virus. By using homopolymeric single-stranded RNA templates, de novo RNA synthesis can be detected with a fluorescent dye. This allows the quantification of double-stranded RNA formation and the enzymatic characterization of these polymerases.

The reproducibility of the designed method allows its use for the screening of libraries of compounds with a potential inhibitory effect against these polymerases. Thanks to this method, by repositioning a library of compounds without previously described antiviral activity, it has been possible to discover and characterize two new non-nucleoside analogue inhibitors of Zika virus polymerase: TCMDC-143406 (compound 6) and TCMDC-143215 (compound 15). Both compounds are capable of inhibiting polymerase activity in vitro and show antiviral effects in cell culture assays.

Likewise, the versatility and adaptability of this method have been demonstrated using other viral polymerases with different experimental requirements. Through slight adaptations, it has been possible to measure in real-time the activity of the polymerase of the foot-and-mouth disease virus and the hepatitis C virus. In addition, the initial data indicate that the method is also exportable to measure the activity of the polymerase of SARS-CoV-2.

The results presented here demonstrate that the fluorescence-based platform to measure polymerase activity in real-time represents a fast, economical, reliable, and efficient alternative for measuring the activity of different RdRp and screening for compounds with a potential inhibitory effect against them.



# Introducción

## II. INTRODUCCIÓN

### 1. Virus: concepto e historia.

La vida en la tierra está compuesta por multitud de organismos celulares, desde bacterias a seres más complejos como los humanos. Sin embargo, esta forma de vida celular está sobrepasada en número y diversidad genética por entidades no celulares parasitarias denominadas; virus (Edwards & Rohwer, 2005; Forest, 2003; Jalasvuori, 2012; Rohwer & Thurber, 2009; Suttle, 2005).

La palabra virus, es un término proveniente del latín que significa veneno o toxina, y hace referencia a su estrategia de replicación. Fue en 1975 cuando Renato Dulbecco definió a los virus como parásitos intracelulares obligados que actúan de forma involuntaria dentro de un cuerpo, a partir de las instrucciones de su material genético (D. Davis, Renato, E. Eisen, & McCarty 1978).

Además de tener un dominio físico sobre la biosfera, los virus parecen abarcar colectivamente la mayor parte de la diversidad genética en la tierra (Hendrix, 2003; Kristensen, Mushegian, Dolja, & Koonin, 2010; Kristensen et al., 2013). Todas las formas de vida celulares poseen genomas que consisten en ADN bicatenario (ADNbc) y emplean el mismo esquema general para la replicación, transcripción y expresión de sus genes. Sin embargo, los virus y otros elementos denominados autorreplicativos, utilizan mecanismos muy variados. Su genoma puede ser: monocatenario, bicatenario, circular o lineal y puede constar de una o varias moléculas de ARN o ADN (Koonin, Dolja, & Krupovic, 2015).

El estudio de los virus se ha aprovechado para el desarrollo de herramientas clínicas y biotecnológicas. Un ejemplo de ello son los bacteriófagos, inicialmente empleados como alternativa a los antibióticos por su capacidad de infectar y eliminar bacterias. Específicamente, el bacteriófago Lambda, fue el primero en aislarse única y exclusivamente a partir de una bacteria. Este virus, más allá de sus capacidades bactericidas, abrió la puerta al empleo de numerosas herramientas genéticas derivadas de su sistema replicativo (Hendrix & Casjens 2006).

Debido a su alto nivel de organización, los virus son muy útiles como herramientas nanotecnológicas, como por ejemplo el fago M13, el cual puede ser manipulado genéticamente de una manera sencilla. Gracias a este conocimiento, y al desarrollo de la técnica *Phage Display* las aplicaciones de estos virus como matrices para nanodispositivos de diagnóstico, vectores de expresión viral y la distribución de fármacos los ha posicionado como una de las herramientas más potentes en nanomedicina y medicina personalizada.

Dentro de este último campo, han supuesto una alternativa a las terapias convencionales, dando lugar a la llamada viroterapia. Esta técnica emplea virus como vectores para tratar enfermedades. Puesto que son diseñados para dirigirse a un tipo celular concreto, su uso es prometedor para la terapia génica y en el cáncer. Numerosos tipos de neoplasias pueden verse beneficiadas por el tratamiento con virus oncolíticos como así lo demuestran los ensayos clínicos correspondientes (Kaufman, Kohlhapp, & Zloza, 2015). Un ejemplo de ello es el caso del Virus del Herpes Simple (HSV), el cual ha

sido modificado y empleado para tratar glioblastomas, melanomas, cáncer de páncreas... etc. (Kaufman et al., 2015; Ma, He, & Wang, 2018).

Finalmente, los virus conforman sistemas evolutivos fascinantes capaces de adaptarse y cambiar a grandes velocidades, cuyo estudio ha proporcionado una valiosa información sobre la relación entre virus y hospedador, lo que ha ayudado tanto a combatir las infecciones como a utilizarlos como modelos de estudio.

A pesar de ser una de las herramientas más empleadas en biología molecular, los virus han supuesto desde la prehistoria un problema para el hombre, siendo origen de epidemias y pandemias capaces de mermar la población. Desde la mal denominada Gripe “española” en 1918 producida por *Influenzavirus A* (H1N1), la cual provocó la muerte de entre 20-50 millones de personas en el mundo, hasta la actual pandemia generada por SARS-CoV-2 con un total de 5.22 millones de fallecidos hasta la fecha, la comunidad científica ha buscado incansablemente numerosas alternativas para erradicar enfermedades derivadas por virus (Ministerio de Sanidad, 2021; Pagani Balletti, 2020). Dicha búsqueda ha dado su fruto en enfermedades como la viruela (Meyer, Ehmann, & Smith, 2020), poliomielitis (Patel, Zipursky, Orenstein, Garon, & Zaffran, 2015), rubeola (Glatman-Freedman, 2002), tétanos (Przedpelski, Tepp, Pellett, Johnson, & Barbieri, 2020) y sarampión (Gupta, Chen, & Rucker, 2020), generando vacunas que inmunizan a la población. En otros casos como en la infección por HIV, Virus del Herpes o el Papovavirus se produce una enfermedad crónica, que, aunque puede ser tratada con medicamentos para paliar los síntomas, no puede ser curada (Baron, 1996; Holmes, Bertozzi, Bloom, & Jha, 2017).

Además, por su capacidad de infectar no solo a humanos, sino también a animales y plantas, han sido objeto de innumerables estudios para el desarrollo de vacunas veterinarias y métodos de control.

Comenzando con el desarrollo del propio virus Vaccinia como vector de genes exógenos (L. A. Lee & Wang, 2006) la utilidad de numerosos virus en las estrategias de vacunación ha ido incrementándose hasta nuestros días: Desde las primeras vacunas consistentes en virus vivos atenuados o inactivados, pasando por toxoides o subunidades recombinantes hasta las revolucionarias vacunas de ácidos nucleicos o vectores recombinantes (Facciola et al., 2019).

A pesar de todos estos avances, aún siguen existiendo numerosas enfermedades víricas sin cura ni tratamiento, que provocan la muerte de miles de personas y animales cada año. El ebolavirus, marburgvirus (MARV), virus de la fiebre aftosa (FMDV), el virus del Zika (ZIKV), o el virus de la hepatitis C (HCV), son solo unos ejemplos. La investigación y creación de fármacos capaces de inhibir las infecciones virales son procesos lentos y altamente costosos. Actualmente, es indispensable desarrollar nuevas técnicas y plataformas que permitan la búsqueda rápida y eficiente de drogas capaces de detener dichas infecciones.

## **2. Clasificación y orden general**

Como se ha indicado anteriormente, los virus poseen grandes diferencias en la composición de su material genético (pudiendo ser ADN o ARN), en su configuración

(monocatenario o bicatenario), así como la capacidad de ser o no ser transcrito, o su polaridad que puede ser positiva (+) o negativa (-). Los genomas virales, además, pueden distribuirse en diferentes segmentos que pueden estar empaquetados en un solo virión o bien en diferentes partículas virales. En todos los casos es necesaria la infección de una célula para su replicación y expansión.

La clasificación clásica creada por Baltimore en 1971, basada en las estrategias de replicación-expresión y en particular, en la morfología y naturaleza del material genético que es incorporado al virión, da lugar a 7 grupos diferentes (Baltimore, 1971). Actualmente esta clasificación se complementa con la clasificación del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV).

Los 7 grupos víricos son los siguientes: (Baltimore, 1971; Dimmock, Easton, & Leppard, 2007; Mahmoudabadi & Phillips, 2018) (se indica entre paréntesis la polaridad de la(s) cadena(s) del genoma).

- **Grupo 1:** Virus de ADN bicatenario (+/-): necesitan entrar en el núcleo y deben usar las polimerasas celulares para su replicación. Ejemplos: virus del Herpes Simple, virus de la varicela-zóster, virus del papiloma humano y los bacteriófagos.
- **Grupo 2:** Virus de ADN monocatenario (+): necesitan entrar en el núcleo y emplean polimerasas de ADN. El ejemplo más representativo de este grupo son los virus de la familia *Parvoviridae*.
- **Grupo 3:** Virus de ARN bicatenario (+/-): replican en el citoplasma y no dependen de polimerasas celulares pues la información para codificarlas se encuentra en el virión. Sus genomas suelen estar segmentados y la replicación es monocistrónica. Ejemplo: Rotavirus.
- **Grupo 4:** Virus de ARN monocatenario (+): poseen genomas con la misma polaridad que el ARNm, por lo que pueden ser empleados directamente para la síntesis de proteínas. El genoma viral codifica para una polimerasa de ARN que utiliza un molde de ARN como en el caso anterior, imprescindible para la replicación viral. Ejemplos de este grupo son: SARS-CoV-2, los virus pertenecientes a la familia *Flaviviridae* y el virus de la Rubeola.
- **Grupo 5:** Virus de ARN monocatenario (-): su material genético es complementario al ARNm, por lo que es necesario que la cadena se transcriba a ARN (+) por las polimerasas de ARN que se encuentran formando parte del virión. Este paso es crítico para la multiplicación del virus, puesto que la hebra de ARN (-) no puede traducirse. Ejemplos representativos de este grupo son: el virus del Ébola, virus del sarampión, virus de Marburgo, y los virus que producen la gripe, rabia y parotiditis.
- **Grupo 6:** Virus de ARN monocatenario retrotranscrito: también conocidos como retrovirus, son capaces de sintetizar ADN a partir de su molde de ARN por la

acción de una retrotranscriptasa. Esta enzima se encuentra codificada en el genoma del virión, posteriormente emplea la maquinaria celular para generar ARNm. El ejemplo más representativo de este grupo es el Virus de la Inmunodeficiencia humana (HIV).

- **Grupo 7: Virus de ADN bicatenario retrotranscrito:** a partir del molde de ADN que portan son capaces de generar ARN empleando la maquinaria celular. En su genoma, poseen la información para la retrotranscriptasa que les permite generar de nuevo ADNbc, formando así un ciclo replicativo que termina produciendo nuevas partículas virales. En este grupo destaca el virus de la Hepatitis B.

Se ha observado que los viomas que infectan tanto bacterias como arqueas, suelen ser mayoritariamente de ADNbc y en menor proporción de ADNmc. Mientras que los retrovirus no se encuentran en este tipo de organismos. Sin embargo, los virus capaces de infectar eucariotas suelen poseer un genoma de ARN, mostrando una diversidad génica que excede con creces la de los virus de ADN.

### 3. **Virus de ARN**

Los virus de ARN presentan genomas pequeños y compactos (3-41 kb) en comparación a los virus de ADN (con genomas mayores de 1000 kb). Esto hace que en muchos genomas de ARN existan marcos de lectura superpuestos y codificación de proteínas multifuncionales. De este modo, para el desarrollo de su ciclo replicativo dependen mucho de la maquinaria molecular de la célula huésped. Sin embargo, los virus de ARN son los patógenos que han tenido más éxito a la hora de infectar diferentes huéspedes en la mayoría de los reinos biológicos. Son considerados de alta importancia por su capacidad infectiva en humanos, animales y plantas. Su éxito es el resultado de una combinación de las siguientes características: su plasticidad evolutiva, los cortos tiempos de generación, los enormes tamaños poblacionales y las altas tasas de mutación (Elena, 2012; Elena et al., 2011).

#### 3.1 **La dinámica de las cuasiespecies de los virus de ARN.**

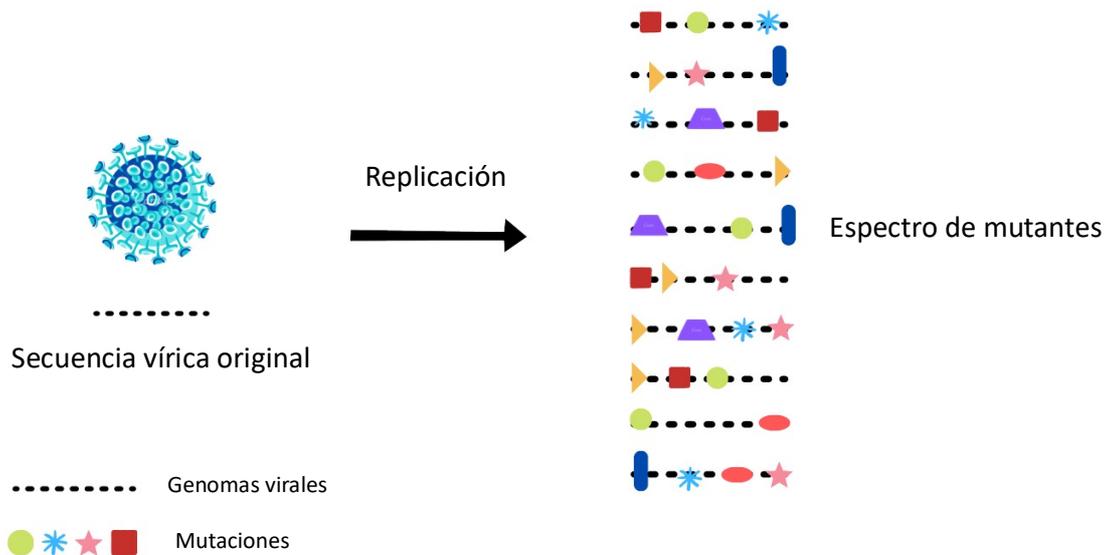
Gracias a las capacidades anteriormente citadas, los virus de ARN forman complejas distribuciones de genomas estrechamente relacionados entre sí, pero no idénticos, sujetos a continuos procesos de variación genética, competición y selección conformando lo que se denomina una cuasiespecie (**Figura 1**).

Diferentes trabajos experimentales llevados a cabo desde la acuñación del término cuasiespecie por Eigen y Schuster en 1971, han demostrado que los clásicos conceptos de genética *wild-type* y mutante no pueden ser aplicados a estos virus en replicación. Concretamente, la idea de individualidad no se aplica para virus ARN, sino que se habla de nubes o enjambres de mutantes que actúan como unidades denominadas espectros de mutantes. Esto implica que la evolución de cada uno de los genomas individuales está altamente influenciada por el resto de los genomas en el espectro y por el ambiente en el que se multiplican (Lauring & Andino, 2010; Martínez et al., 2012; Más, López-Galíndez, Cacho, Gómez, & Martínez, 2010). La secuencia formada por el promedio de

nucleótidos en cada posición (en un alineamiento de los genomas que conforman el espectro de mutantes) se denomina secuencia consenso.

Debido a esta gran plasticidad genética, los virus de ARN son capaces de evadir el sistema inmune del hospedador, así como la inmunidad inducida por las vacunas y los tratamientos antivirales.

Las numerosas mutaciones les permiten adaptarse con rapidez a los cambios ambientales que puedan darse en el entorno. Una prueba clara de ello son los constantes brotes de infecciones virales que provienen de reservorios animales (Martínez et al., 2012).



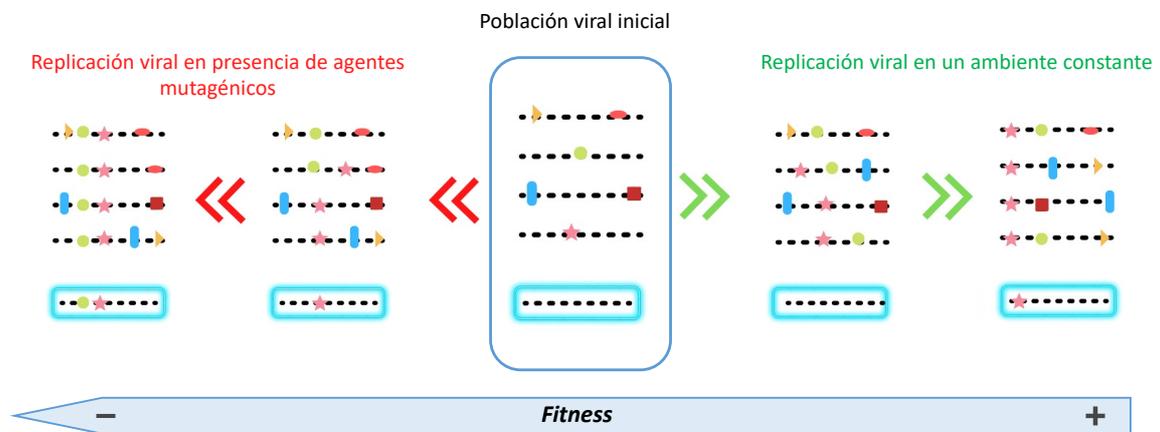
**Figura 1: Representación esquemática de las cuasiespecies virales.** Los genomas virales están representados por líneas horizontales discontinuas, las mutaciones como símbolos sobre estas. La replicación propensa al error de los virus de ARN y favorece la generación de progenie viral con errores conformando así el espectro de mutantes de la cuasiespecie.

El estudio teórico de sistemas replicativos que cometen muchos errores, predice la existencia teórica de un valor límite de errores que pueden ser acumulados y que está determinado por la necesidad de la transmisión fiable de la información genética (Eigen, 1971). Este límite se denomina umbral de error y su existencia ha sido demostrada empíricamente para los virus ARN (Crotty, Cameron, & Andino, 2001). La replicación con una tasa de error superior al umbral provoca la entrada de la cuasiespecie en catástrofe-error que conduciría a la pérdida de viabilidad y *fitness* viral (Belshaw, Pybus, & Rambaut, 2007; Domingo et al., 2002; Sanjuán, 2010).

El *fitness* viral es un concepto complejo basado en la evolución. Originariamente fue definido como la capacidad de un virus para producir una progenie específica en un ambiente dado. Esta definición se emplea en la actualidad como *fitness* replicativo medido en cultivos celulares bajo un ambiente controlado. Sin embargo, a esta definición se le debe añadir la clásica definición Darwiniana de *fitness* general, que hace referencia a la cantidad de material genético que se transmite a la próxima generación (Wargo & Kurath, 2012). Por lo tanto, este término puede utilizarse para determinar la

viabilidad de un virus en cualquier ambiente controlado (**Figura 2**), como por ejemplo en el estudio del efecto antiviral de distintos compuestos.

En combinación, los conceptos de umbral de error y *fitness* han abierto un paradigma sobre como luchar contra las infecciones virales. Así, los virus se combatirían no solo inhibiendo su replicación, sino también mediante el aumento de la tasa de mutación para conducir su replicación hasta el catástrofe-error y consiguiente extinción (Castro, Arnold, & Cameron, 2005; Eigen, 2002; Perales et al., 2019). Diferentes compuestos químicos han sido catalogados como posibles inductores de mutagénesis y por lo tanto como posibles compuestos antivirales. Este es el caso de los análogos de nucleótidos, como, por ejemplo, el uso de análogos de piridinas, que ha sido probado con cierto éxito para el tratamiento por la infección de VIH en pacientes (D. Li et al., 2014; Mullins et al., 2011).



**Figura 2: Efecto de las altas tasas de mutaciones en el fitness viral.** La imagen muestra una visión simplificada de la dinámica y cambio del fitness viral. La replicación no restringida (flechas verdes) da lugar a una ganancia de fitness y por lo tanto a una mayor tasa de supervivencia. La ganancia puede darse con o sin variación de la secuencia consenso (líneas discontinuas en cuadrados azules). La replicación en presencia de compuestos mutagénicos o altamente restrictiva (flechas rojas) da lugar a una acumulación de mutaciones, variaciones en la secuencia consenso y pérdida del fitness.

### 3.2 El elemento común entre todos los Virus ARN

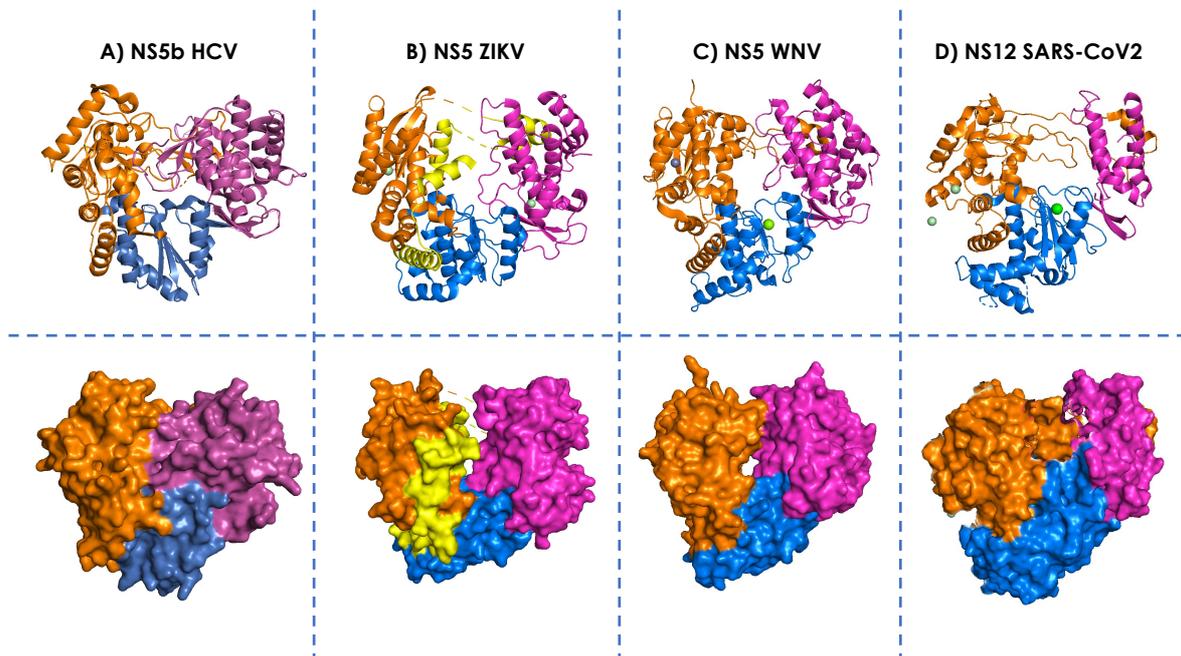
La hipótesis del mundo de ARN (Higgs & Lehman, 2015) da pie a pensar en un entorno en donde los virus hayan supuesto un maquinaria de cambio genómico primordial, debido a que el ARN (+) vírico puede ser traducido para la producción de proteínas virales, sin necesidad de realizar cambios en la naturaleza y en la polaridad de la molécula (Koonin & Dolja, 2013).

A lo largo de los años, los virólogos han intentado reconstruir la historia evolutiva de los virus de ARN. Los estudios derivados de esta investigación han arrojado importantes hallazgos y uno de los resultados más importantes tiene que ver con la existencia de un gen común a todos ellos, que codifica para una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) que es universal en todos los virus de ARN incluidos los replicones de ARN no encapsulados. Incluso dentro de cada una de las 3 clases de Baltimore de Virus ARN, los

únicos genes completamente conservados en todos sus miembros son los que codifican la RdRp. (Koonin & Dolja, 2014).

### 3.2.1 Las ARN polimerasas dependientes de ARN (RdRp)

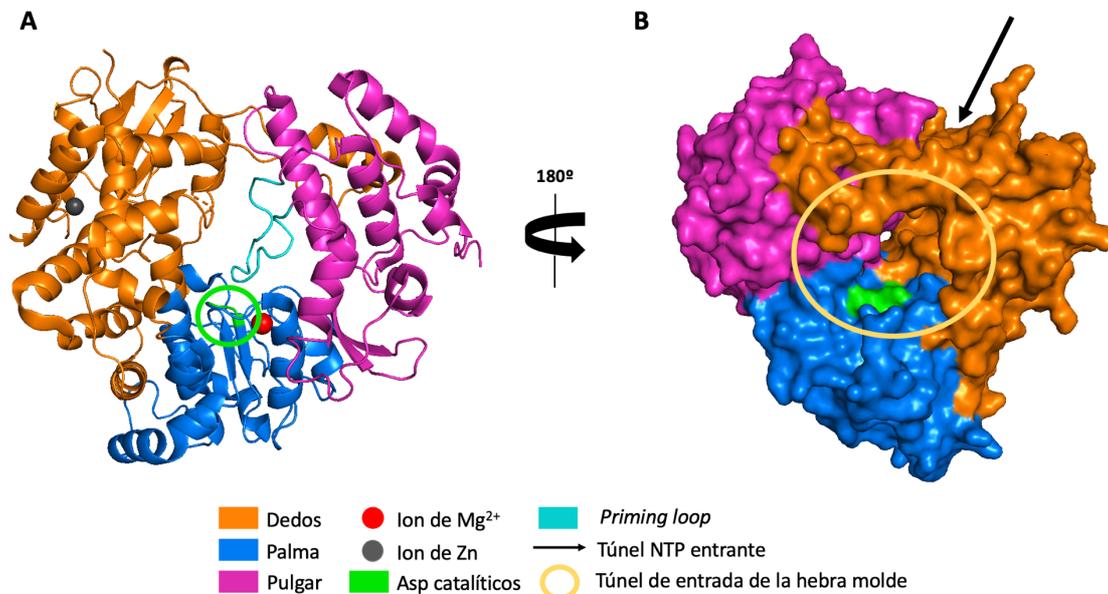
Las RdRp están altamente conservadas en todos los virus. La razón de una conservación tan alta en sistemas tan diversos como los virus es una cuestión que está siendo estudiada desde hace más de 10 años y que todavía no ha sido dilucidada. Esto es debido en parte al origen polifacético de los virus de ARN (Wolf et al., 2018). Las RdRp representan un linaje profundamente ramificado dentro de la superfamilia de las polimerasas y primasas (Mönttinen, Ravantti, Stuart, & Poranen, 2014; Ng, Arnold, & Cameron, 2008).



**Figura 3:** Representación gráfica mostrando los elementos estructurales secundarios (imagen superior), o la superficie (imagen inferior) de la estructura tridimensional de cuatro RdRps modelo. En rosa se indica el subdominio correspondiente al pulgar (pueden observarse las diferencias en la estructura de este subdominio dependiendo de la RdRp), en azul el subdominio catalítico de la palma y en naranja subdominio dedos. **A)** HCV NS5b RdRp (nº de PDB 3mwv), **B)** ZIKV NS5 RdRp, donde se pueden ver los metales de  $Zn^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  (representados como dos esferas verdes) y en amarillo la estructura NSL (secuencia funcional de localización nuclear (Duan et al., 2017)) (nº de PDB 5wz3), **C)** WNV NS5 RdRp con los metales  $Zn^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  (nº de PDB 2hfz), **D)** SARS-CoV-2 RdRp con dos metales de  $Zn^{2+}$  y un metal de  $Mg^{2+}$  (nº de PDB 6xqb).

El tamaño medio del cuerpo central de las RdRp suele ser menor de 500 aa y se encuentra plegado en tres subdominios; pulgar, palma y dedos, característicos de todas las polimerasas de ácidos nucleicos, (Steitz, 1998) y un subdominio adicional denominado “punta de dedos” que une el subdominio dedos y pulgar, asemejándose así a la forma a una mano derecha cerrada ((Ferrero, Ferrer-Orta, & Verdaguer, 2018). Estos dominios se encuentran principalmente involucrados en la unión de la cadena de ARN molde, la polimerización y la entrada del nucleótido trifosfato (NTP) al sitio activo de la enzima, (Venkataraman, Prasad, & Selvarajan, 2018)(**Figura 3**), (**Figura 4**).

Numerosas polimerasas virales poseen dominios adicionales, como, por ejemplo; dominios metiltransferasas. Esto indica que, el dominio polimerasa, puede interactuar con otros factores para llevar a cabo una polimerización eficiente (Hyodo, Kaido, & Okuno, 2014). El sitio activo de estas enzimas está altamente conservado entre los virus de ARN y, además, muestra semejanzas con motivos pertenecientes a las ADN polimerasas dependientes de ARN o retrotranscriptasas, indicando un mecanismo general en la reacción de transferencia nucleotídica.



**Figura 4: Representación de los tres subdominios de la RdRp. A)** Imagen frontal de la estructura terciaria del motivo RdRp del virus del Nilo Occidental (PDB 2hfz). Se observan los iones metálicos, los aspárticos catalíticos y el priming loop característico de las polimerasas capaces de iniciar la síntesis de novo de ARN. **B)** Imagen dorsal de la RdRp. observarse observan los túneles de entrada de la hebra molde (círculo verde) y del nucleótido entrante (señalado por una flecha negra). Los aspárticos catalíticos (en verde) se encuentran en el centro del túnel de entrada del ácido nucleico.

El subdominio de la palma se encuentra espacialmente ubicado entre los dedos y el pulgar. En su secuencia contiene la mayoría de los motivos estructurales conservados y que están involucrados en la catálisis enzimática. Los Asp catalíticos y el motivo de reconocimiento de ARN comprenden las tres láminas b que se pueden apreciar en la estructura tridimensional (Ng et al., 2008)(Figura 4 A). Este subdominio es responsable de la selección del NTP sobre el dNTP y de catalizar la reacción de transferencia del fosfato, mediante la coordinación con dos iones metálicos (normalmente Mg<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup>), que son necesarios para el correcto funcionamiento de la enzima (Ng et al., 2008; Černý, Černá Bolfíková, Valdés, Grubhoffer, & Růžek, 2014).

El subdominio del pulgar incluye en su secuencia los residuos que se encuentran involucrados en el reconocimiento de la hebra molde, permitiendo la estabilización del complejo formado por el NTP iniciador, el ARN y la proteína (Figura 4 B). Este subdominio es capaz de facilitar la translocación del molde después de la polimerización, mediante cambios conformacionales de la estructura de la proteína y reordenamiento de la hebra molde (te Velthuis, 2014).

Además, es el más diverso entre las RdRp y difiere en tamaño y complejidad según el modo de inicio de la polimerización, el cual viene determinado por la familia vírica del virus en cuestión. Por ejemplo, aquellas polimerasas de las familias *Picornaviridae* y *Caliciviridae* necesitan una molécula iniciadora de la replicación, la cual puede ser de naturaleza nucleica o proteica. De esta manera, el subdominio pulgar tiene residuos conservados dentro de su estructura para facilitar la unión del iniciador. Por el contrario, las RdRps de la familia *Flaviviridae* poseen dominios voluminosos para ayudar a la síntesis *de novo* en la replicación, es decir, en ausencia de iniciador (Ferrer-Orta, Ferrero, & Verdaguer, 2015; J. H. Lee, Chung, & Kim, 2017; Lu & Gong, 2017). Estas polimerasas a menudo poseen un *priming loop* o bucle b, dentro del subdominio del pulgar, que actúa como una plataforma de estabilización del primer nucleótido en el extremo 5' durante el proceso de iniciación (**Figura 4 A**). (Kidmose, Vasiliev, Chetverin, Andersen, & Knudsen, 2010; A. J. Te Velthuis, Robb, Kapanidis, & Fodor, 2016; A. J. W. Te Velthuis & Oymans, 2018).

Por último, el subdominio de los dedos juega un papel fundamental en el ajuste de la geometría del sitio activo. Además, estabiliza molde de ARN en el sitio correcto para permitir la polimerización (**Figura 4 B**). La conformación tridimensional de la polimerasa forma dos túneles de entrada en diferentes direcciones, conectando el centro catalítico con el exterior de la proteína. El túnel del NTP entrante facilita la entrada del sustrato, además de la entrada de los cationes divalentes al centro activo de la enzima (McDonald, Tao, & Patton, 2009)(**Figura 4 B**). El túnel de entrada de la hebra molde, se encuentra implicado también en el reconocimiento y posicionamiento del NTP entrante hacia el centro catalítico para incorporarlo a la hebra en crecimiento. Estos túneles, por su importancia en la función de la enzima, se han convertido en importantes objetivos para el desarrollo de fármacos inhibidores de polimerasa (Ferrer-Orta et al., 2015; Jácome, Becerra, Ponce de León, & Lazcano, 2015).

### 3.2.2 Actividad de las RdRp

Todas las polimerasas virales sintetizan ácidos nucleicos en dirección 5'a 3' mediante la transferencia nucleotídica al grupo 3'-OH libre de la cadena naciente (Steitz, 1998). En este caso, las RdRp catalizan la síntesis de la cadena complementaria de ARN a partir de una hebra molde por un proceso que consta de dos pasos principales.

- La fase de iniciación supone la adición de un residuo de NTP en extremo 3'-OH del último nucleótido incorporado del RNA naciente. Durante este proceso, se libera un pirofosfato, dando lugar a un NMP que puede ser incorporado a la cadena de ARN de nueva síntesis. Para que esta reacción se lleve a cabo, es necesaria la participación de los tres residuos de Asp, que se encuentran en el subdominio palma de la polimerasa. Estos residuos, interactúan a su vez con los cationes metálicos que se encuentran en el sitio activo, permitiendo que el residuo 3'-OH quede posicionado de manera correcta para la catálisis del iniciador.

Aunque diversos virus de ARN emplean diferentes tipos de replicación, existen dos principales mecanismos de iniciación de síntesis de ARN : iniciación *de novo* y la iniciación dependiente de iniciador (Z. Jin, Leveque, Ma, Johnson, & Klumpp, 2012) :

- Iniciación por síntesis *de novo* o en ausencia de iniciador: Para este tipo de iniciación se requiere la interacción del nucleótido trifosfato iniciador y un segundo NTP. El NTP iniciador proporciona el 3'-OH libre para la adición del siguiente nucleótido (**Figura 5 A**). Este tipo de iniciación es característico de las polimerasas de la familia *Flaviviridae*, con una estructura *priming loop* en el subdominio del pulgar que favorecen este proceso c. En la **Figura 3** se pueden ver las diferencias en el subdominio perteneciente al pulgar, en las imágenes superiores correspondientes a A), B), C))(Kao, Singh, & Ecker, 2001).

La principal ventaja de la síntesis *de novo* para la replicación del ARN viral es que no hay pérdida de información genética durante la replicación y no se necesitan enzimas adicionales para generar el iniciador o para escindir la región entre el ARN molde y la hebra naciente. Normalmente la síntesis *de novo* es seguida por la elongación, sin embargo, en algunos casos esta iniciación conduce a la formación de productos de ARN abortivos que dan lugar a oligonucleótidos cortos que pueden ser utilizados posteriormente como iniciadores (van Dijk, Makeyev, & Bamford, 2004).

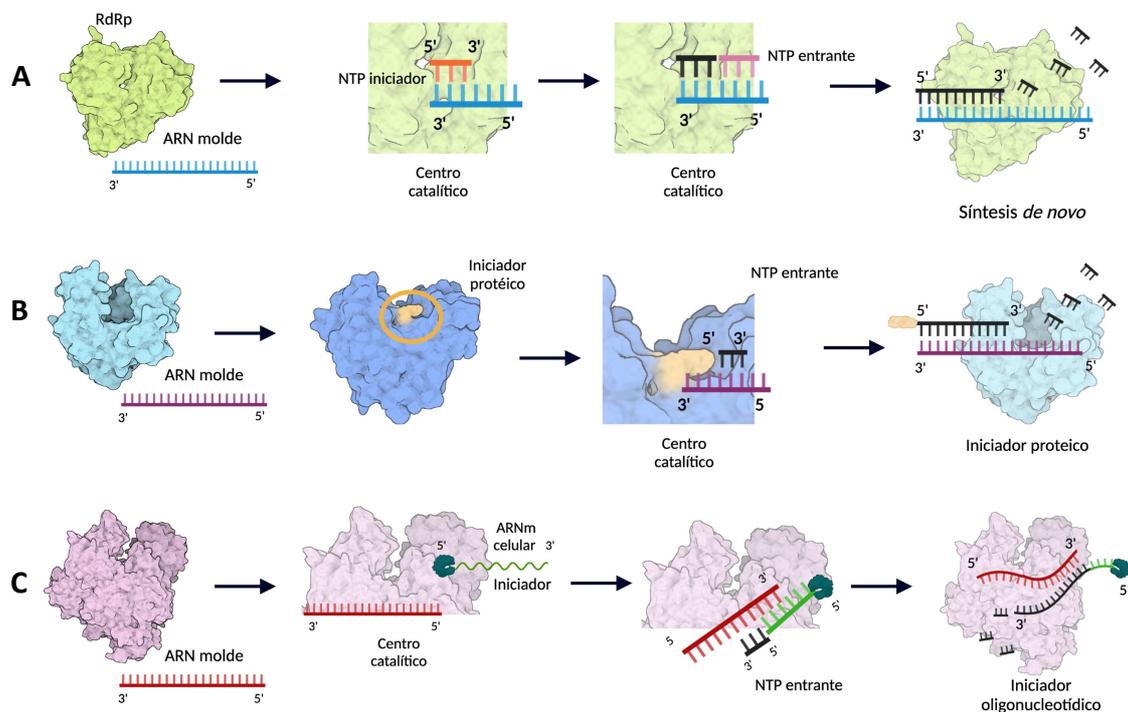
- Iniciación dependiente de iniciador: este tipo de iniciación se da en aquellas polimerasas que no son capaces de iniciar la síntesis *de novo*. En estas proteínas la estructura del subdominio del pulgar se ve modificada, siendo más pequeña en comparación con las otras RdRps (puesto que se pierde el *priming loop* **Figura 3** y **Figura 4**). Esta modificación permite formar una hendidura entre las hélices que conduce directamente al sitio activo, de manera que el pulgar queda acomodado en la plantilla, dejando un canal para el iniciador (**Figura 5 B y C**).

Cuando el iniciador es de **naturaleza proteica**, como ocurre con la RdRp del virus de la fiebre aftosa (FMDV), este es sintetizado de manera natural en la poliproteína viral. Es la propia polimerasa la que adiciona un residuo de UMP (uridina monofosfato) a la Tyr que se está en la posición 3 del péptido iniciador, que en este caso es denominado (VPg) (Ferrer-Orta et al., 2006; Nayak, Goodfellow, & Belsham, 2005; Paul, van Boom, Filippov, & Wimmer, 1998; Paul et al., 2003), ello hace que pueda formar un enlace con la molécula molde de ARN y de este modo acomodar y estabilizar la hebra para que comience la replicación. Este primer proteico permanecerá unido de manera constante a la hebra de nueva síntesis (**Figura 5 B**).

Por otro lado, existen diferentes mecanismos a través de los cuales las RdRp inician la replicación mediante un **iniciador de oligonucleótidos**. De forma natural las fuentes de origen de esos iniciadores son diversas, siendo las más comunes las siguientes (van Dijk et al., 2004)(**Figura 5 C**):

- Segmentos de oligonucleótidos que pueden provenir de:
  - El extremo 5' encapsulado del ARNm celular, descrito para virus de ARN(-) (Hagen, Tiley, Chung, & Krystal, 1995).
  - Un ciclo abortivo de replicación en el que se sintetizan de dos a cinco nucleótidos, que servirán como iniciador para la replicación completa del genoma (McClure, 1985).

- Síntesis de bucle invertido: formado por el extremo 3' del ARN viral, que repliega sobre si mismo dando lugar a un iniciador (Behrens, Tomei, & De Francesco, 1996; Laurila, Makeyev, & Bamford, 2002; G. Luo et al., 2000; Zhong, Ferrari, et al., 2000; Zhong, Gutshall, & Del Vecchio, 1998; Zhong, Uss, Ferrari, Lau, & Hong, 2000).
- El segundo paso es denominado elongación que sucede a partir del primer NMP incorporado en el extremo 3'-OH. Como ocurría en el inicio el extremo 3'-OH del primer NMP incorporado queda libre para la transferencia del siguiente nucleótido entrante. De nuevo, se cataliza la reacción mediante un enlace fosfodiéster entre ambos nucleótidos liberando pirofosfato, la cadena de nueva síntesis es creada en sentido 5'a 3'.



**Figura 5: Representación de los diferentes mecanismos de iniciación en las RdRp. A)** Esquema de la síntesis de novo (WNV RdRp, PDB (2HFZ)), **B)** Esquema de la síntesis dependiente de iniciador proteico (FMDV 3D RdRp, PDB (3DDK)), **C)** Esquema de la síntesis dependiente de iniciador de ARNm celular (Influenza virus B RdRp, PDB (6QCT)). Imagen creada con Biorender.com.

### 3.2.3 Inhibidores de las RdRp

La necesidad indispensable de las RdRp en la síntesis de ARN viral y la ausencia de una proteína homóloga en los seres vivos las convierte en una diana molecular preferencial para el desarrollo de estrategias y fármacos antivirales específicos. Actualmente se han desarrollado varias estrategias para el diseño de pequeñas moléculas que actúan como moduladores o inhibidores de la RdRp, y que presentan diferentes mecanismos de acción, como son; los análogos de Nucleótidos (IAN), los no análogos de nucleótidos (INAN), inhibidores de interacciones proteína-proteína (IPP) e inhibidores covalentes dirigidos (ICD) (Picarazzi, Vicenti, Saladini, Zazzi, & Mori, 2020).

- Inhibidores análogos de nucleótidos/nucleósidos (IAN): son moléculas que poseen una alta homología con las bases nucleotídicas tradicionales, su esqueleto molecular está compuesto por una base purina o pirimidina y un azúcar, pero carecen de un grupo 3'-OH libre. Actúan en el sitio activo de la RdRp, incorporándose en la cadena de ARN naciente y compitiendo con los NTPs naturales. Una vez incorporados impiden la continuación de la síntesis, lo cual conlleva a la terminación de la cadena de forma inmediata (inmediatamente después de su incorporación) o retardada (varios nucleótidos después de su incorporación, debido a cambios estructurales en la topología de la doble hélice de ARN), dependiendo de las características químicas del inhibidor.

La principal limitación de los IAN es su suministro intracelular en forma de nucleótido trifosfatos (denominada forma bioactiva). De hecho, estos compuestos tienen una baja permeabilidad en la membrana celular debido a la carga localizada de los grupos fosfato en condiciones fisiológicas. Para superar este problema, el IAN se suministra como un profármaco farmacológicamente inactivo que experimenta transformaciones en el interior celular por las enzimas propias de la célula (Slusarczyk, Serpi, & Pertusati, 2018). En el caso de los IAN, los profármacos son transportados y activados a través de varios pasos de fosforilación, lo cual permite la incorporación del IAN en forma trifosfato en la cadena de ARN con un mecanismo semejante al proceso fisiológico normal.

Un ejemplo del uso de un IAN en forma de profármaco es el sofosbuvir (CID Pubchem 45375808). El inhibidor sofosbuvir fue aprobado en 2013 por la FDA para el tratamiento de la Hepatitis crónica producida por el virus de la hepatitis C (HCV) (Gotte & Feld, 2016). Una vez que el sofosbuvir es metabolizado, el compuesto bioactivo GS-461203 (2'-desoxi-2'- $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -C-metiluridina-5'-trifosfato) actúa como un terminador de cadena.

Este IAN, resultó ser prometedor para el tratamiento de esta enfermedad pues un porcentaje elevado de pacientes pudo beneficiarse de sus efectos. Dado el alto grado de similitud que poseen las RdRp de los virus ARN y más dentro de la familia *Flaviviridae* (Lim et al., 2013), este compuesto se ha empleado como antiviral de amplio espectro para distintos miembros del género *Flavivirus*. El reposicionamiento de este fármaco ha sido una de las aproximaciones abarcadas para la inhibición de las RdRp de ZIKV, DENV, WNV.

Este fármaco se probó contra el ZIKV en diferentes sistemas celulares y se demostró que inhibe directamente la replicación viral, actuando como un terminador de cadena e induciendo mutaciones A/G en el genoma (Sacramento et al., 2017). En el caso del DENV, demostró capacidad inhibitoria tanto en ensayos celulares como bioquímicos (H. T. Xu, Colby-Germinario, et al., 2017).

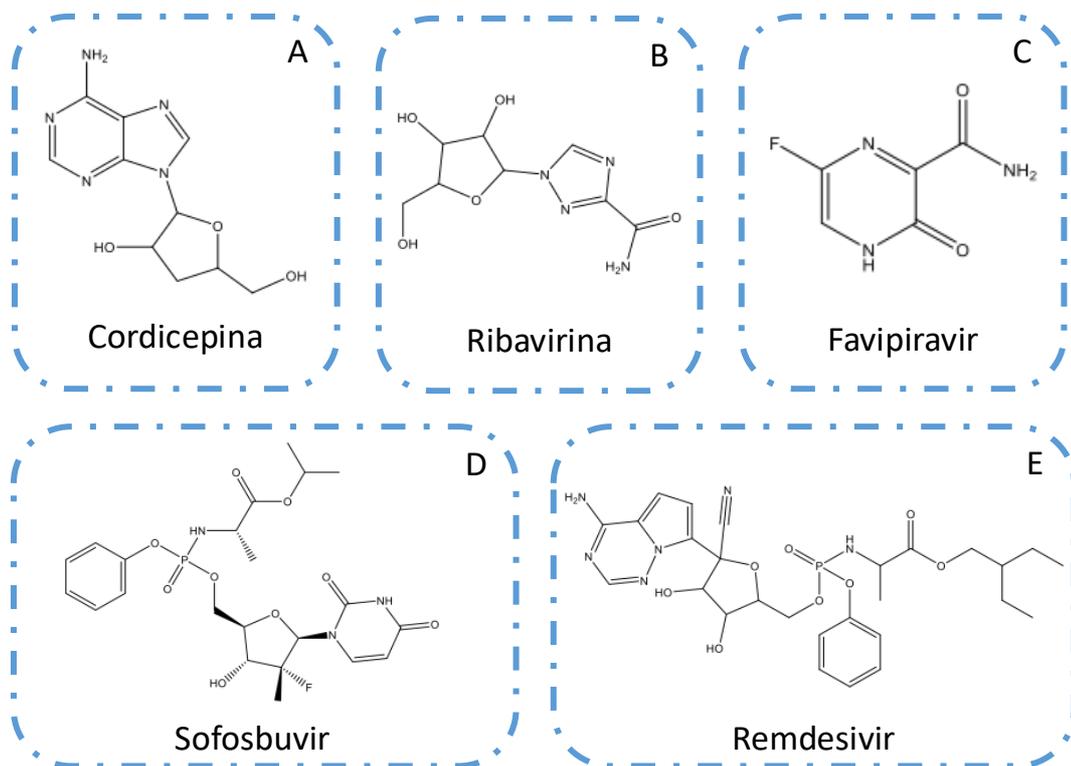
Sin embargo, a pesar de estos resultados prometedores, actualmente existen mutantes resistentes a la acción del sofosbuvir tanto para WNV como para HCV (Dragoni et al., 2020).

Adicionalmente, su papel como antiviral de amplio espectro, está siendo estudiado actualmente para tratar las infecciones por SARS-CoV-2 (Jácome et al., 2015; Jácome, Campillo-Balderas, Ponce de León, Becerra, & Lazcano, 2020).

Para la familia *Flaviviridae*, han sido descritos diferentes tipos de IAN, para el virus de la Encefalitis Japonesa JEV (Lu & Gong, 2013), el virus del Dengue (DENV) (Noble et al., 2010; Noble et al., 2013; Yap et al., 2007), el virus del Zika (ZIKV) (Godoy et al., 2017; Saiz & Martin-Acebes, 2017), virus del Nilo Occidental (WNV) (Malet et al., 2007) y el virus de la Hepatitis C (HCV) (Madhvi et al., 2017).

Otros ejemplos que actúan de manera similar y son considerados IAN son el Remdesivir (Jockusch et al., 2020; Yin et al., 2020), el favipiravir (Escribano-Romero, Jiménez de Oya, Domingo, & Saiz, 2017; Furuta et al., 2013) y la ribavirina (Arias et al., 2008; Cavalletto et al., 2000; Crotty et al., 2001). De la misma manera que el Sofosbuvir son administrados en forma de profármaco y deben sufrir las fosforilaciones consecutivas para actuar como forma bioactiva (**Figura 6**).

A pesar de todos estos avances, ningún fármaco (a excepción del sofosbuvir), con potencial efecto inhibitor ha superado la fase de ensayos preclínicos ya sea por su toxicidad o por la aparición de mutantes resistentes, por lo que actualmente estas enfermedades provocadas por ZIKV, WNV y DENV son tratadas paliando los síntomas.



**Figura 6:** Estructura química de distintos inhibidores análogos de nucleótidos (IAN) de RdRp. A) Cordicepina, B) Ribavirina, C) Favipiravir, D) Sofosbuvir, E) Remdesivir.

- Inhibidores No análogos de nucleósidos/nucleótidos (INAN): son inhibidores no competitivos que se unen a distintos sitios alostéricos de la enzima. El mecanismo de acción de los inhibidores alostéricos depende en gran medida del sitio de unión y del estado conformacional de la polimerasa (Eltahla, Lackovic, Marquis, Eden, & White, 2013; Eltahla, Luciani, White, Lloyd, & Bull, 2015). Los INAN que se unen en la región del pulgar parecen actuar en el correcto posicionamiento de los

subdominios palma y pulgar, inhibiendo la correcta unión entre la RdRp y el ARN molde, promoviendo una disminución de afinidad por el molde de ARN (Winqvist et al., 2013).

Por otro lado, los inhibidores que son capaces de unirse al subdominio de la palma interactúan con un bolsillo hidrofóbico, alterando la conformación del subdominio (Mosley et al., 2012) o inhibiendo la formación del enlace fosfodiéster entre el NTP entrante y la hebra de nueva síntesis (Tomei et al., 2004).

- Inhibidores de interacción proteína-proteína (IPP): la inhibición de la RdRp ocurre durante la formación del complejo replicativo (ver **Figura 7**), bloqueando la interacción entre las proteínas esenciales que lo conforman. Un ejemplo de este tipo de inhibición es el que se realiza mediante el bloqueo entre las subunidades PA y PB1 de la RdRp del Influenza virus con diversas moléculas como el ANA-1 (3-(2-clorofenil)-6-etil-7-metil[1,2,4] triazolo [4,3-a] pirimidin-5-ol), de esta manera la RdRp no puede conformarse correctamente y la replicación del virus queda inhibida (Massari, Desantis, Nizi, Cecchetti, & Tabarrini, 2021).
- Inhibidores covalentes dirigidos (ICD): están diseñados específicamente como grupos funcionales capaces de interactuar con un residuo específico de la proteína diana, formando un complejo covalente que conduce a la pérdida de actividad de la proteína. Pueden ser divididos en dos grupos según su mecanismo de acción; reversibles e irreversibles, dependiendo de si la unión entre el grupo funcional y la enzima puede deshacerse o no, respectivamente (Gehringer & Laufer, 2019; J. Singh, Petter, Baillie, & Whitty, 2011).

Actualmente este tipo de inhibidores presentan desventajas como una alta toxicidad e hipersensibilidad. Además, las proteínas dianas deben ser altamente estudiadas, puesto que no todas son apropiadas para este tipo de inhibición por la alta tasa de reconversión o degradación del fármaco (Gehringer & Laufer, 2019; J. Singh et al., 2011). En este sentido, la reutilización y el reposicionamiento de medicamentos se ha convertido recientemente en un enfoque exitoso que tiene como objetivo identificar nuevas indicaciones terapéuticas, diferentes a las originales para fármacos ya aprobados, en fase de investigación o retirados (Picarazzi et al., 2020).

Esta estrategia ofrece varias ventajas sobre el proceso canónico para desarrollar un nuevo fármaco, dado que ya se han recopilado datos farmacocinéticos, toxicológicos y de seguridad en ensayos clínicos anteriores. De esta manera el riesgo de fracaso es considerablemente menor.

Existen muchos ejemplos satisfactorios de la reutilización o reposicionamiento de fármacos para diferentes patologías. Un ejemplo de ello ha sido la aprobación del remdesivir durante la pandemia provocada en 2019 por el SARS-CoV-2 (Elfiky, 2020; Serafin et al., 2020; T. U. Singh et al., 2020), este fármaco inhibidor de RdRp fue desarrollado originalmente contra HCV y propuesto posteriormente también como tratamiento para la infección del virus del Ébola.

#### 4. La familia Flaviviridae

Los miembros pertenecientes a esta familia de virus de ARNmc(+) se encuentran transmitidos principalmente por vectores artrópodos y causan enfermedades que han sido catalogadas como graves en los seres humanos.

La propagación mundial y la transmisión epidémica de estos virus (concretamente del género *Flavivirus*) durante las últimas siete décadas ha ido en aumento de manera alarmante (Pierson & Diamond, 2020). Un ejemplo de este incremento, ha sido el experimentado por el Virus del Dengue (DENV).

Los mosquitos capaces de transmitirlo infectan aproximadamente a 400 millones de seres humanos cada año. Teniendo en cuenta que más de una cuarta parte del mundo la población vive en áreas donde el dengue es endémico (Bhatt et al., 2013) y que existen documentadas epidemias esporádicas desde la Segunda Guerra Mundial, la situación resulta preocupante (Bhatt et al., 2013).

Por otro lado, las introducciones del Virus del Nilo Occidental y del Virus del Zika en el hemisferio occidental han sido definidas como rápidas propagaciones geográficas con un gran número de infecciones humanas provocando una alta morbilidad (Bhatt et al., 2013; Pierson & Diamond, 2018).

Los *Flavivirus* son conocidos por infectar artrópodos y humanos así como a un amplio rango de especies animales, lo que los convierte en importantes patógenos humanos y veterinarios (Mansfield, Hernández-Triana, Banyard, Fooks, & Johnson, 2017). Estos huéspedes animales constituyen importantes reservorios que benefician la transmisión de nuevas especies virales a los seres humanos (Pandit et al., 2018).

La amenaza continua por la reaparición de brotes provocados por estos virus, evidencia la necesidad de la búsqueda y obtención de drogas capaces de inhibir la síntesis viral, puesto que las vacunas para este género, o no han demostrado una alta eficacia (como la vacuna contra el DENV (Dengvaxia)), o son inexistentes (como en el caso del ZIKV y WNV)(Mao & Chao, 2020).

##### 4.1 Características generales

Esta familia se encuentra compuesta por más de 80 especies descritas que construyen los cuatro géneros principales: *Hepacivirus*, *Pegivirus*, *Pestivirus*, *Flavivirus*.

En todos los casos el virión tiene una estructura externa formada por tres proteínas denominadas: proteína C (cápside), proteína M (membrana), proteína E (envoltura). Su cápside tiene una forma icosaédrica, con una envoltura lipídica de un tamaño aproximado de 40 a 60 nm. En el interior de la cápside se encuentra su genoma de ARN monocatenario con polaridad positiva.

De manera general, el ciclo replicativo entre los diferentes géneros es semejante, aunque con pequeñas diferencias que reflejan las distintas estrategias que estos virus emplean para manipular a la célula huésped y crear un entorno favorable para la replicación viral.

## 4.2 Clasificación

Recientemente los virus que componen la familia *Flaviviridae* se han convertido en dos grupos distintos (denominados grupo I y II), con remarcadas diferencias en su ciclo replicativo, especialmente en su estrategia de control de traducción (*Lindenbach, Randall, Bartenschlager, & Rice, 2021*)

El denominado grupo I está compuesto por 3 géneros:

- *Hepacivirus*: compuesto por 14 especies, siendo posiblemente el más conocido de todos ellos el Virus de la Hepatitis C (HCV), aunque también incluye el virus GBV-B que provoca la Hepatitis G.
- *Pegivirus*: conformado por 11 especies, propuesto como género en 2011 (*Stapleton, Fong, Muerhoff, Bukh, & Simmonds, 2011*), tiene como especie tipo el Pegivirus humano (GB-C).
- *Pestivirus*: compuesto por 4 especies, destacando los virus de la diarrea viral bovina (BVD) y peste porcina clásica (CSFV). Otras especies se han encontrado infectando mamíferos no humanos y aún no han sido clasificadas (*Neufeldt, Cortese, Acosta, & Bartenschlager, 2018*).

Todos los virus de este grupo se transmiten por contacto o por vía sanguínea. La característica principal de este grupo es el control de su traducción mediante las secuencias internas de entrada al ribosoma (IRES) (**Figura 7**).

El grupo II se corresponde con el género *Flavivirus*, con 53 especies. La mayoría de las especies se transmiten y pueden replicarse en insectos o especies de ácaros, aunque también se ha visto que pueden transmitirse entre roedores y murciélagos sin vectores intermediarios conocidos.

Algunas de las especies más características de este grupo son; el virus de la fiebre amarilla (YFV), el virus del Dengue (DENV), el virus del Nilo Occidental (WNV), el Virus del Zika (ZIKV) y el virus de la encefalitis japonesa (JEV).

Como regla general, cada miembro perteneciente a este grupo controla su traducción mediante un mecanismo que consiste en la protección del extremo 5' del ARN genómico (*capping*) catalizado por enzimas virales. Esta reacción genera en este extremo una estructura de tipo *cap* (7meGpppA2'Ome-RNA) que asemeja el ARN genómico viral al ARNm celular (*Y. Song, Mugavero, Stauff, & Wimmer, 2019*) (**Figura 7**).

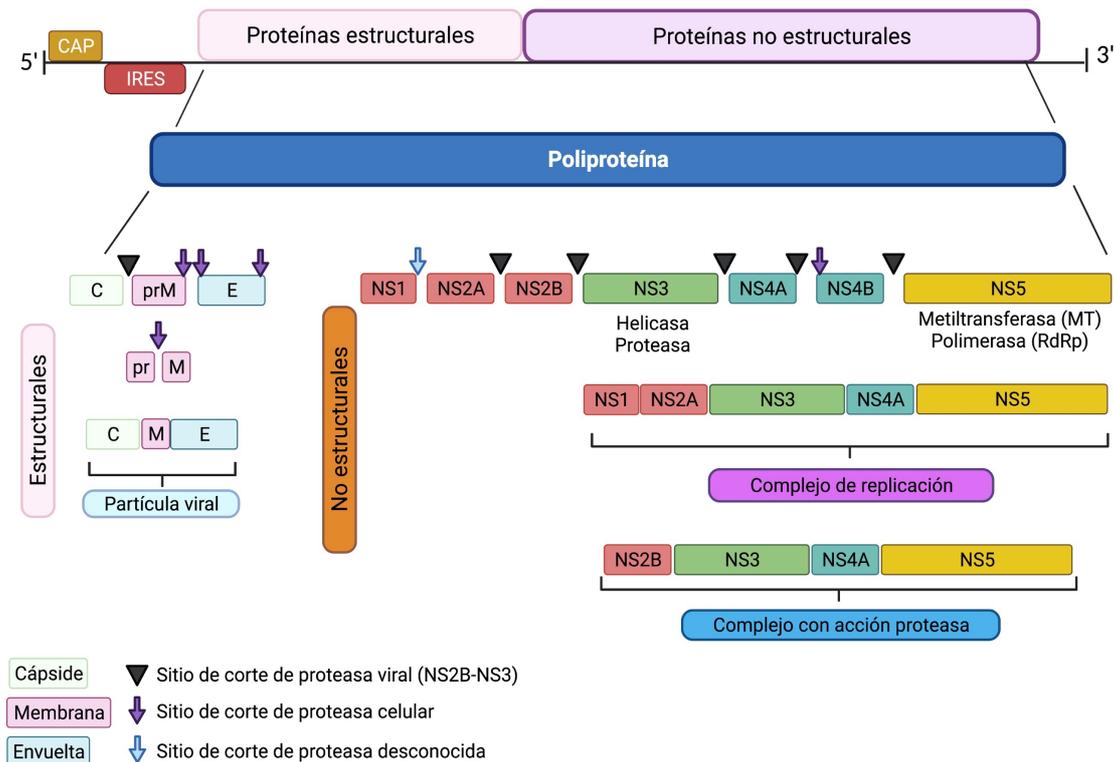
## 4.3 Genoma y ciclo replicativo

El tamaño de los genomas de estos virus con envuelta oscila entre las 9Kb -13 Kb, siendo los más pequeños los genomas del género *Flavivirus* y los más grandes los del género *Pegivirus* (*Bressanelli et al., 2004*). El genoma es de polaridad positiva, por lo que se emplea como molde para la creación del intermediario de ARNm (-) el cual, a su vez, es empleado como molde por la RdRp para la amplificación del genoma viral. Además, esta cadena de polaridad positiva puede ser traducida directamente en el ribosoma para la creación de nuevos viriones (*Butcher, Grimes, Makeyev, Bamford, & Stuart, 2001; Bügl et al., 2000*).

Todos ellos contienen un único marco de lectura abierto (ORF), largo y flanqueado por regiones no codificantes en los extremos 5' y 3', que forman estructuras secundarias necesarias para la replicación y traducción del genoma (Simmonds et al., 2017). El papel de las regiones no codificantes no está totalmente esclarecido, pero se ha sugerido que participan en el reconocimiento de factores virales y celulares, así como en la estabilización del genoma, en el proceso de traducción y empaquetamiento del ARN (Chambers, Hahn, Galler, & Rice, 1990).

Como se ha indicado anteriormente, los géneros pertenecientes al grupo I inician la traducción de su genoma a través de las secuencias IRES situadas en el extremo 5'. Por el contrario, la traducción de los genomas del género *Flavivirus* están condicionados al reconocimiento del *cap* por el ribosoma (Y. Song et al., 2019). En ambos casos, la traducción da lugar a una poliproteína que debe ser procesada por proteasas virales y celulares, para dar lugar a aproximadamente a 10-12 proteínas maduras (**Figura 7**).

El extremo amino terminal del genoma, codifica para proteínas estructurales (variando su número de 3 a 5 dependiendo de la especie) que se ensamblan formando la partícula viral. El resto del genoma da lugar a 7 proteínas no estructurales (NS) que son esenciales para la replicación viral. (**Figura 7**).



**Figura 7:** Diagrama esquematizado y generalizado de la organización y procesado de la poliproteína viral en la familia *Flaviviridae*. En la parte superior se observa la organización de las proteínas estructurales y no estructurales del genoma. En el medio, la organización de las diferentes proteínas que componen la secuencia superior. Por último, se pueden observar los diferentes complejos que se forman en el interior celular cuando se produce la infección una vez que la poliproteína viral es procesada por la proteasa viral NS2B-3. Imagen creada con Biorender.com

La internalización del virión en la célula huésped comienza con la interacción de la proteína E (envuelta) por los receptores celulares, permitiendo a los viriones una absorción en la superficie celular mediante endocitosis (Lindenbach et al., 2021). El ambiente altamente acidificado de los endosomas de naturaleza glicoprotéica (en el caso de *Flavivirus*) o lipoprotéica (en el caso de *Hepacivirus*, *Pegivirus* y *Pestivirus*) permite la fusión de los viriones en el interior celular, creando las vesículas virales (Neufeldt et al., 2018). Estas vesículas virales, son posteriormente desintegradas, liberando en el citoplasma el material genético del virus, que es traducido por el ribosoma dando lugar a la poliproteína completa. Esta poliproteína debe ser procesada por las proteasas celulares y por las proteasas virales NS2B-NS3.

Una vez que es procesada la poliproteína viral, las proteínas no estructurales se asocian formando complejos multiméricos. Estos complejos poseen actividades enzimáticas indispensables para el ciclo replicativo del virus, como, por ejemplo; el complejo de replicación y el complejo de acción proteasa (**Figura 7**).

Por otra parte, las proteínas estructurales son ensambladas en la superficie del retículo plasmático rugoso (RER) conformando el virión que contendrá en su interior el ARN viral. Finalmente, las partículas virales pasan a través del aparato de Golgi donde son liberadas al exterior por exocitosis (S. Chen, Wu, Wang, & Cheng, 2017).

#### **4.4 Proteínas no estructurales**

Las siete proteínas no estructurales, están implicadas en las distintas etapas de la multiplicación del virus dentro de la célula. Entre ellas forman diversos complejos enzimáticos con actividades esenciales para el desarrollo de la infección. Debido a la importancia de su función, diferentes estudios han demostrado que, la maquinaria de replicación viral de estos virus es una diana prometedoras para el desarrollo de antivirales (Bollati et al., 2010).

##### 4.4.1 Proteína NS1

Fue la primera en definirse como esencial para la replicación viral. En su forma nativa forma dímeros que se localizan en el lumen del RER y puede ser secretada al interior celular. Las funciones de la NS1 que han sido descritas son numerosas; como la interacción con otras proteínas virales para facilitar la replicación viral, o su actuación como proteína de unión a la membrana (J. Chen, Ng, & Chu, 2015; Glasner, Puerta-Guardo, Beatty, & Harris, 2018; Gutsche et al., 2011; Watterson, Modhiran, & Young, 2016). Recientemente, un estudio ha demostrado que la NS1 es capaz de remodelar la membrana del RER mediante invaginaciones hidrofóbicas, creando compartimentos donde se produce la replicación viral (Ci et al., 2020).

##### 4.4.2 Proteína NS2

La proteína NS2 de *Flaviviridae*, es una proteína transmembrana que contiene un dominio C-terminal donde se encuentra una subunidad catalítica cisteín-proteasa (Jirasko et al., 2010; Lorenz, Marcotrigiano, Dentzer, & Rice, 2006). Esta proteasa es un heterodímero formado por las proteínas NS2A y NS2B con dos sitios activos: uno de los monómeros aporta la denominada triada catalítica Ser-His-Glu (implicada en la replicación viral mediante la maduración de la poliproteína viral), mientras que la otra subunidad aporta el residuo cisteína.

Además de tener actividad como heterodímero, el monómero NS2B (por sí solo), es capaz de mediar en el autoprosesamiento de la proteasa NS2-NS3, favoreciendo su escisión de la poliproteína viral (Boukadida et al., 2018; Lorenz et al., 2006).

#### 4.4.3 Proteína NS3

Esta proteína es la segunda más grande después de la NS5 y juega un papel fundamental en el ciclo replicativo del virus. Posee dos dominios funcionales; el dominio N-terminal es una proteasa encargada del procesamiento proteolítico de la poliproteína viral. Se encarga de escindir las proteínas no estructurales.

Por otro lado, el dominio C-terminal posee una actividad helicasa de ARN dependiente de nucleótidos (NTPasa) cuya actividad está involucrada en la síntesis del ARN viral (Lescar et al., 2008; K. Li, Phoo, & Luo, 2014; *Lindenbach* et al., 2021). Para llevar a cabo su función, esta proteína necesita como cofactor la proteína NS2B, el cual permite el plegamiento preciso de la NS3 y la correcta formación de su centro activo (Erbel et al., 2006; D. Luo et al., 2008).

Algunas investigaciones sobre antivirales se han centrado en el impedimento de la unión entre estas dos proteínas. De este modo, la proteína NS3 se plegaría de forma incorrecta, por lo que no sería capaz de interactuar con la replicasa viral (NS5) y por lo tanto, la replicación vírica no sería viable (K. Li et al., 2014).

#### 4.4.4 Proteína NS4

Las proteínas NS4A y NS4B son dos proteínas de membrana fusionadas, que se encuentran unidas por una región en el extremo C-terminal denominada fragmento 2K. Este fragmento actúa como péptido señal para el direccionamiento de la proteína hacia el RER y, además, actúa como cofactor en el proceso de plegamiento para dar lugar a dos subunidades activas (Gopala Reddy, Chin, & Shivananju, 2018).

La subunidad NS4A, ha sido descrita como una proteína capaz de anclarse a membranas invaginadas, lo que permite generar los complejos replicativos con acción proteasa en el RER, para emplear la maquinaria celular como fábrica viral (Choksupmanee, Hodge, Katzenmeier, & Chimnaronk, 2012). Además, diferentes investigaciones, han relacionado esta proteína con la regulación de la respuesta inmune del hospedador en infecciones virales, debido a su acción inhibitoria de la secreción del interferón (INF) (Dalrymple, Cimica, & Mackow, 2015).

A través del fragmento 2K, la subunidad NS4B es capaz de penetrar en el interior del RER para alterar su estructura. A su vez, NS4B interactúa con distintas proteínas, tanto virales como celulares. Al ser capaz de remodelar la estructura del retículo, NS4B trabaja juntamente con NS1 para la formación de los compartimentos de replicación o factorías virales. Estos compartimentos se forman en el interior del RER, formando vesículas en cuyo interior se producen la progenie viral (Choksupmanee et al., 2012).

Al igual que la subunidad NS4A, la proteína NS4B es capaz de anclarse en la membrana del RER, exponiendo un dominio citoplasmático que interactúa con el dominio

helicasa de la proteína NS3. De esta manera, cuando ambas proteínas interactúan, la NS3 se disocia del ARN<sub>mc</sub> y queda disponible para unirse a la siguiente hebra de ARN<sub>bc</sub>. (Umareddy, Chao, Sampath, Gu, & Vasudevan, 2006).

#### 4.4.5 Proteína NS5

Esta proteína es la más grande expresada durante la infección vírica. Su secuencia codifica para dos subunidades diferentes que pueden, o no, permanecer unidas: una subunidad metiltransferasa (Mtasa) y una subunidad polimerasa (RdRp). Dependiendo del género vírico en el que se encuentre, se denomina con el nombre de la subunidad con la actividad polimerasa. Así, por ejemplo, para HCV se denominará NS5B. Sin embargo, para virus como ZIKV y WNV, se denomina NS5 al presentar la misma proteína las dos subunidades (**Figura 8**).

La subunidad Mtasa, de aproximadamente 30 kDa, es la responsable de generar la estructura *cap* en el extremo 5' de las hebras de nueva síntesis. Esta reacción es catalizada en dos pasos, generando la secuencia GpppN, que será posteriormente metilada para terminar de formar el *cap* tras la síntesis de nuevas hebras (Issur et al., 2009; Sanford, Mears, Fajardo, Locker, & Sweeney, 2019).

La metilación 2'-O de la estructura *cap* del ARN viral previene su identificación como un ARN exógeno por sistema inmune del huésped, facilitando la traducción del material genético del virus (Daffis et al., 2010; Fleith et al., 2018). Además, se ha demostrado que el dominio MTasa ayuda a la función polimerasa de la RdRp (Zhao et al., 2016).

Unido por una región conectora con la Mtasa, en el extremo C-terminal se encuentra la subunidad polimerasa o RdRp (**Figura 8**). La RdRp es capaz de iniciar la síntesis *de novo* mediante la unión a una estructura altamente conservada en el ARN, denominado *loop A* o *priming loop* que se encuentra en el extremo 5' del genoma flaviviral (Bujalowski, Bujalowski, & Choi, 2017; Fajardo et al., 2020; Filomatori et al., 2006)(**Figura 3 A, B, C y D, Figura 4 A, Figura 8 A y D**).

Estudios recientes han demostrado que el dominio MTasa ayuda a la función de la RdRp de manera natural, es decir que no actúan como subunidades independientes, como se creía en un principio (Zhao et al., 2016).

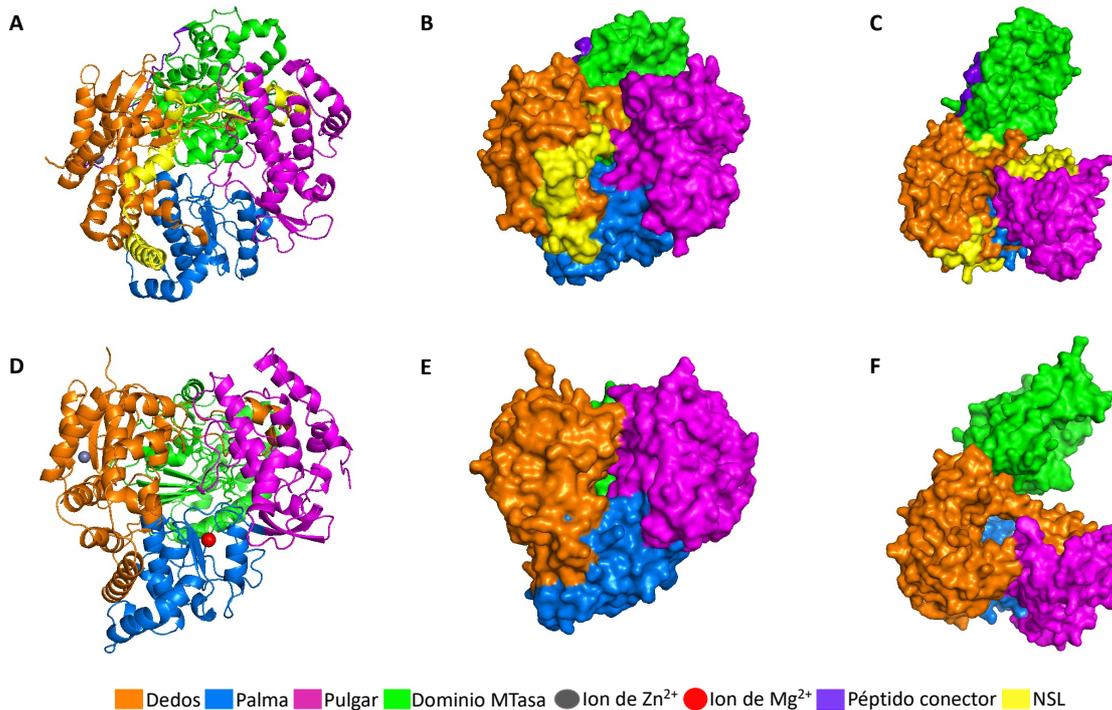
Además de las funciones RdRp y Mtasa, la proteína NS5 juega un papel fundamental en la interrupción de las vías de señalización inmunológicas del huésped (Best, 2017).

Por ejemplo, se ha demostrado que la proteína NS5 tanto de ZIKV como de DENV son capaces de activar la traducción del STAT2 (responsable de la activación de la síntesis de interferón) para su degradación en el proteasoma, lo que conlleva a una disrupción de la señalización y la síntesis de INF, deteniendo así la respuesta antiviral celular (Ashour, Laurent-Rolle, Shi, & García-Sastre, 2009; Grant et al., 2016; Morrison et al., 2013).

Debido a la alta tasa de semejanza que poseen todas las RdRp (NS5) de la familia *Flaviviridae*, las características estructurales básicas, son compartidas por todas ellas (Lim et al., 2013). Por lo general, están conformadas por 900 aa aproximadamente y comprenden los dos dominios mencionados anteriormente, con sus correspondientes subdominios.

El genoma de estos virus es de polaridad positiva, por lo que se emplea como molde para la creación del intermediario de ARNm (-), el cual, a su vez, es empleado como molde por la RdRp para la amplificación del genoma viral. Además, esta cadena de polaridad positiva puede ser traducida directamente en el ribosoma para la creación de nuevos viriones (Butcher et al., 2001; Bügl et al., 2000).

El papel de las regiones no codificantes del extremo 3' no está esclarecido, pero se ha sugerido que participan en el reconocimiento de factores virales y celulares, así como en la estabilización del genoma, y en el proceso de traducción y empaquetamiento del ARN (Chambers et al., 1990).



**Figura 8:** Representación gráfica de la estructura terciaria generalizada de los dominios y subdominios de las RdRp de la familia Flaviviridae. **A, B, C)** Representación gráfica de NS5 RdRp y Mtasa de ZIKV (PDB 5trf). **D, E, F)** Representación gráfica de NS5 RdRp y Mtasa de WNV (PDB 2hfz). En la imagen se reflejan diferentes grados de rotación de la proteína para una mejor observación del dominio Mtasa (en verde) y la unión entre ambos dominios en morado a través del péptido conector.

## 5. Flavivirus de importancia clínica

Este género está constituido principalmente por patógenos humanos transmitidos por artrópodos, que infectan a millones de personas cada año. Como ya se ha mencionado anteriormente, en este género se encuentran virus tan importantes como el DENV, WNV, ZIKV, YFV, el virus de la encefalitis japonesa (JEV).

Para poner en perspectiva la importancia clínica que tienen estos virus, cabe destacar que solamente los cuatro serotipos conocidos de DENV infectan entre 50-100 millones de personas anualmente, lo que resulta en aproximadamente 22.000 muertes al año (Gabriel, Alencar, & Miraglia, 2019; Guzman & Harris, 2015). Aunque la infección por dengue en la mayoría de los casos conlleva una serie de síntomas leves semejantes a un cuadro gripal, en algunos casos progresan a un síndrome de shock y fiebre hemorrágica

desarrollando el denominado Dengue hemorrágico, el cual tiene un pronóstico grave que, por lo general, acaba con la vida del paciente (García et al., 2011).

Por otro lado, desde mediados del siglo XX el ZIKV se ha extendido desde las regiones africanas (de Oliveira Dias et al., 2018; Weaver et al., 2016), al sudeste asiático (Salehuddin et al., 2017; Wikan & Smith, 2016) hasta América del sur, donde provocó un brote severo en 2016 (Carlson, Dougherty, & Getz, 2016; Gyawali, Bradbury, & Taylor-Robinson, 2016). La infección por este virus es una seria amenaza durante el embarazo, ya que el virus es capaz de atravesar la placenta y afectar gravemente al feto, provocando microcefalia o incluso la muerte (Brasil et al., 2016; Jaenisch et al., 2017).

Desde su auge en 1999 en Norte América ((CDC), 1999; Ronca, Murray, & Nolan, 2019), el WNV ha provocado en los humanos un espectro de enfermedades variadas y síndromes no reconocidos previamente (Emig & Apple, 2004; Sejvar, 2014). Se estima que más del 80% de las personas infectadas permanecen asintomáticas, sin embargo, una pequeña parte de la población que presenta síntomas, desarrollan enfermedades neuroinvasivas graves como es la meningitis del oeste del Nilo (*WNM* por sus siglas en inglés)(Sejvar et al., 2003). Esta enfermedad representa el mayor porcentaje de casos de enfermedades neuroinvasivas en los grupos de edad más jóvenes, mientras que a medida que aumenta la edad, los casos encontrados se asocian con encefalitis (Sejvar, 2016).

El desarrollo de vacunas ha sido fundamental para combatir YFV (C. C. Ferreira et al., 2018) y la JEV (Yun et al., 2015). Sin embargo, incluso estas cepas han mostrado un resurgimiento en los últimos años, probablemente debido a un control laxo de las poblaciones de mosquitos, un mayor transporte de mercancías y personas, poblaciones que no pueden acceder al tratamiento y la devaluación de la opinión sobre la vacunación por la influencia de ciertos colectivos (X. Li et al., 2021)

Es evidente que existe una necesidad urgente de desarrollar medicamentos antivirales que permitan a los profesionales de la salud, curar o al menos disminuir la tasa vírica y los síntomas después de la infección. Varios estudios han producido fármacos candidatos como la ribavirina y sus derivados (C. C. Lin, Philips, Xu, & Yeh, 2004), que han superado los rigores de los ensayos clínicos para convertirse en opciones como tratamiento para estos virus.

Por otro lado, existen numerosos estudios sobre moléculas con posible efecto antiviral de diversas naturalezas como; el 2-benzavir (Gwon et al., 2020), el umifenovir (Haviernik et al., 2018). Este tipo de moléculas, aunque prometedoras, aún se encuentran en fases preclínicas y muchos tratamientos potenciales, tienen serias limitaciones. Todo ello, junto con la aparición de resistencias virales, hace de la búsqueda de nuevos tratamientos sea una preocupación constante (Manns et al., 2007).

Se hace evidente la necesidad de enfoques novedosos para el desarrollo de sistemas de cribado de compuestos, que den lugar a la obtención de medicamentos antivirales eficaces para controlar las infecciones por Flavivirus.

## 5.1 Virus del Zika (ZIKV)

Este virus perteneciente al género *Flavivirus* se aisló por primera vez en 1947 de un mono Rhesus febril en el bosque Zika de Uganda. Posteriormente, diferentes investigaciones, identificaron mosquitos del género *Aedes africanus* (portadores del virus) en el mismo bosque (Dick, Kitchen, & Haddow, 1952). En 1954, se notificaron los tres primeros casos de infecciones humanas en Nigeria (Macnamara, 1954), donde se realizaron estudios de serovigilancia. Los resultados obtenidos, sugirieron que el virus estaba altamente extendido en África, Asia y Oceanía. Sin embargo, estos estudios sobreestimaron la verdadera prevalencia del virus, dada la superposición serológica que existe entre el ZIKV y los *Flavivirus* altamente relacionados, como el DENV y WNV (Baba, .H., & C.K., 1999; Korhonen et al., 2016).

Históricamente, las infecciones sintomáticas por este virus se limitaban a casos esporádicos o pequeños grupos de pacientes aislados, pero en 2007 este patrón cambio radicalmente cuando apareció el primer brote importante de infección por este virus en Yap (Estados Federados de Micronesia), donde aproximadamente el 73% de la población se encontraba infectada y el 18% desarrolló la enfermedad de manera sintomática grave (Duffy et al., 2009).

Desde entonces, la infección por el ZIKV se ha propagado rápidamente, produciéndose brotes en la Polinesia Francesa, las Islas Cook (Roth et al., 2014), Isla de Pascua (Tognarelli et al., 2016), Nueva Caledonia (Dupont-Rouzeyrol et al., 2015), y más recientemente en América (Fauci & Morens, 2016), con exportaciones esporádicas en el continente Europeo. En 2015 este virus se notificó por primera vez en Brasil, donde posteriormente se infectaron entre 44.000-130.000 personas. Todos estos hechos, provocaron que la organización Mundial de la Salud, declarara en 2016, el ZIKV como Emergencia de Salud Pública Global (Gulland, 2016).

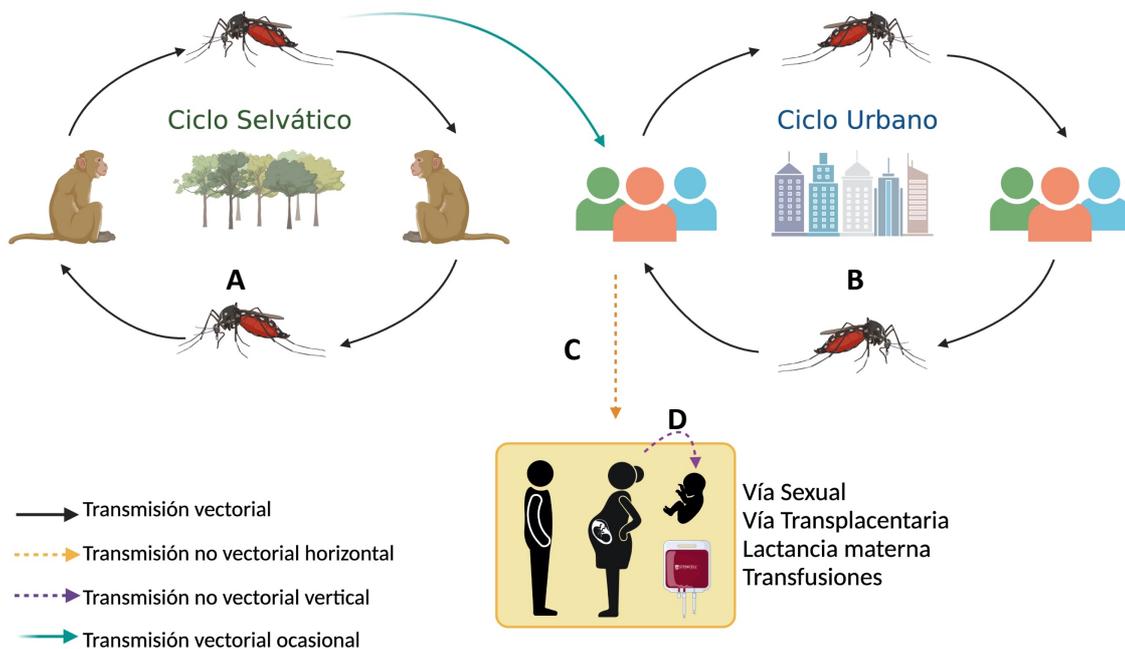
### 5.1.1 Transmisión

ZIKV es un arbovirus que es transmitido por mosquitos vectores con dos ciclos diferenciados. Por un lado, se encuentra el ciclo selvático, que provoca el mantenimiento del virus entre los primates y mosquitos arborícolas en los bosques (**Figura 9 A**) y por otro lado, existe un segundo ciclo urbano que involucra la transmisión directa entre humanos y mosquitos urbanos de las ciudades (**Figura 9 B**)(Weaver et al., 2016).

Actualmente, el ciclo urbano es el que ha provocado la alarma entre la sociedad científica, identificando a dos agentes responsables de esa transmisión. Ambos son mosquitos de la especie *Aedes*: *A. aegypti* (considerado como vector principal, que además puede ser portador de otros virus como DENV y YFV) y *A. albopictus* (comúnmente conocido como mosquito tigre, el cual puede ser portador de otros patógenos como WNV y el virus Chikungunya (CHIKV)) (B. H. Song, Yun, Woolley, & Lee, 2017).

Se ha documentado que la transmisión directa de persona a persona del ZIKV se produce por: (**Figura 9 C y D**)

- Vía perinatal diferentes estudios han encontrado ARN viral en el líquido amniótico, la orina y el suero de madres de fetos con anomalías cerebrales (Villamil-Gómez et al., 2016; Weaver et al., 2016).
- Vía sexual (ya que se han identificado partículas virales en el semen (Deckard et al., 2016)).
- A través de la leche materna (Besnard, Lastere, Teissier, Cao-Lormeau, & Musso, 2014).
- Mediante transfusión de sanguínea (Magnus et al., 2018; Musso, Stramer, Busch, Committee, & Diseases, 2016)



**Figura 9: Ciclos de transmisión del ZIKV.** A) Ciclo selvático entre monos Rhesus, macacos, chimpancés y los mosquitos *A. aegypti* y *A. albopictus* entre otros, B) Ciclo urbano entre población humana y los mosquitos de la especie *A. aegypti* y *A. albopictus*, C) Transmisión no vectorial horizontal entre humanos por vía sexual y transfusiones sanguíneas, D) Transmisión no vectorial vertical de la madre al feto por vía transplacentaria o mediante la lactancia materna. La flecha verde indica la posible transmisión vectorial entre mosquitos del ciclo selvático y la población humana ocasional por transporte de personas y mercancías. Imagen creada con Biorender.com

### 5.1.2 Presentación clínica

Las infecciones virales provocadas por ZIKV son sintomáticas solo en el 20-25% de las personas infectadas y se desarrolla una enfermedad leve y autolimitada, con un periodo de incubación de 4-10 días. Los síntomas que se presentan son comunes o inespecíficos y se asemejan a un cuadro gripal (Cerbino-Neto et al., 2016). Sin embargo, en algunos casos el cuadro se agrava apareciendo afecciones más complejas, como son el síndrome de *Guillain-Barré* en adultos y microcefalia en fetos nacidos de madres infectadas.

El síndrome de *Guillain-Barré* es una enfermedad de carácter autoinmune, en la que el sistema inmune del paciente ataca al sistema nervioso periférico causando: espasmos, debilidad muscular, parálisis e incluso la muerte (Créange, 2016).

Hasta ahora, el mecanismo por el cual este virus es capaz de producir esta secuela es desconocido (Goodfellow & Willison, 2016).

Uno de los efectos más preocupantes y graves que causa este virus, es la microcefalia. La microcefalia, está definida como una afección neuronal en bebés donde el cerebro no se desarrolla apropiadamente, causando que la cabeza sea mucho más pequeña de lo normal. Esta microcefalia puede estar presente en el feto desde su desarrollo en el útero, la cual está causada por una reducción del número de neuronas, o bien puede desarrollarse posterior al parto, la cual se encuentra asociada a la reducción de los procesos dendríticos y conexiones sinápticas (Alcantara & O'Driscoll, 2014; Klase et al., 2016; Panchaud, Stojanov, Ammerdorffer, Vouga, & Baud, 2016). La esperanza de vida para estos pacientes se reduce y suele verse afectada por las enfermedades derivadas de la microcefalia, pudiendo llegar a morir prematuramente incluso antes de nacer (Brasil et al., 2016; Group, 2016; Oliveira Melo et al., 2016; Sarno et al., 2016).

Desde el brote de 2015 en Brasil (ECDC, 2016), los datos acumulados hasta la fecha sobre casos clínicos prenatales y postnatales sugieren que la infección por ZIKV se encuentra relacionada con microcefalia y otras anomalías congénitas de diferentes grados de gravedad.

### 5.1.3 Tratamiento y prevención

Las infecciones por este virus se vuelven más complicadas debido a la falta de disponibilidad de vacunas confiables, profilácticos activos y efectivos terapéuticos (Javed et al., 2018).

Como se ha recalcado, actualmente no existe ningún fármaco aprobado para el tratamiento de la infección por ZIKV. Existen candidatos de vacunas que incluyen virus inactivados, vacunas genéticas, partículas virales semejantes, vectores víricos... y un largo etcétera de posibilidades que se encuentran en la fase I de ensayos clínicos (Munjál et al., 2017). Sin embargo, hasta el momento, ninguna de ellas ha demostrado una eficacia y seguridad suficiente para avanzar en fases.

Los fármacos disponibles se centran en paliar el dolor y disminuir la fiebre (paracetamol). Existen a su vez, IAN aprobados recientemente por la FDA (Alam et al., 2017), como son el sofosbuvir, 20-C-nucleósidos metilados, 7-deaza-20-C-metiladenosina y el 20-fluoro-2-C-metil-UTP. Estos compuestos han demostrado ser eficaces al provocar la terminación prematura de la síntesis de ARN, aunque su uso está altamente cuestionado por los riesgos de seguridad que suponen para el paciente (Govero et al., 2016).

También, alternativas como el tratamiento con INF (Bayer et al., 2016) , el uso de anticuerpos neutralizadores , el reposicionamiento de diferentes fármacos (Adcock, Chu, Golden, & Chung, 2017; Albulescu, Kovacikova, Tas, Snijder, & van Hemert, 2017) y las terapias contra la proteasa NS2-NS3 han sido propuestos e investigados como posibles tratamientos (Mastrangelo et al., 2012; Shiryayev et al., 2017).

No obstante, pese a todos los esfuerzos de la comunidad científica, no ha sido posible determinar un tratamiento eficaz para la inhibición viral de ZIKV.

## 5.2 Virus del Nilo Occidental (WNV)

Fue aislado por primera vez en 1937 en Uganda en la región del Nilo occidental (Smithburn, Hughes, Burke, & Paul, 1940). Desde entonces, este virus se ha convertido en endémico en numerosas partes de África, Europa, Asia, Australia y en Oriente medio (Mackenzie, Gubler, & Petersen, 2004). A pesar de su distribución mundial, no fue detectado en EE. UU. hasta el brote del verano de 1999, cuando la ciudad de Nueva York experimentó una mortalidad notablemente alta entre los cuervos y varias aves exóticas en cautividad (Briese, Jia, Huang, Grady, & Lipkin, 1999). Por otro lado, en ese mismo año, se observó un aumento inusual de casos de encefalitis humanas atípicas con causa desconocida ((CDC), 1999). A partir del brote de 1999, el virus ha dado lugar a un estimado de 7 millones de personas infectadas, de los cuales 24.000 han desarrollado problemas neuronales y más de 2.300 muertes solo en Estados Unidos (Ronca et al., 2019).

En Europa, durante el año 2020, se notificaron 336 casos en humanos, de los cuales 77 fueron registrados en España, donde el 95% necesitaron hospitalización y el 75% presentó sintomatología neurológica. En equinos y aves se ha observado que, de los 183 brotes reportados, 133 han sido en España, concretamente en la zona mediterránea que comprende desde Cádiz a Lleida (García San Miguel Rodríguez-Alarcón et al., 2021).

En la actualidad, el WNV se considera una de las enfermedades veterinarias más importantes en todo el mundo. Este virus es un patógeno animal importante en América, puesto que ha causado más de 28.000 casos en equinos y una alta mortalidad en más de 300 especies de aves, lo que ha provocado una disminución masiva en la población de al menos 23 especies, siendo responsable de la merma, por ejemplo en el caso de cuervos americanos, de un 45% de los individuos (LaDeau, Kilpatrick, & Marra, 2007).

### 5.2.1 Transmisión

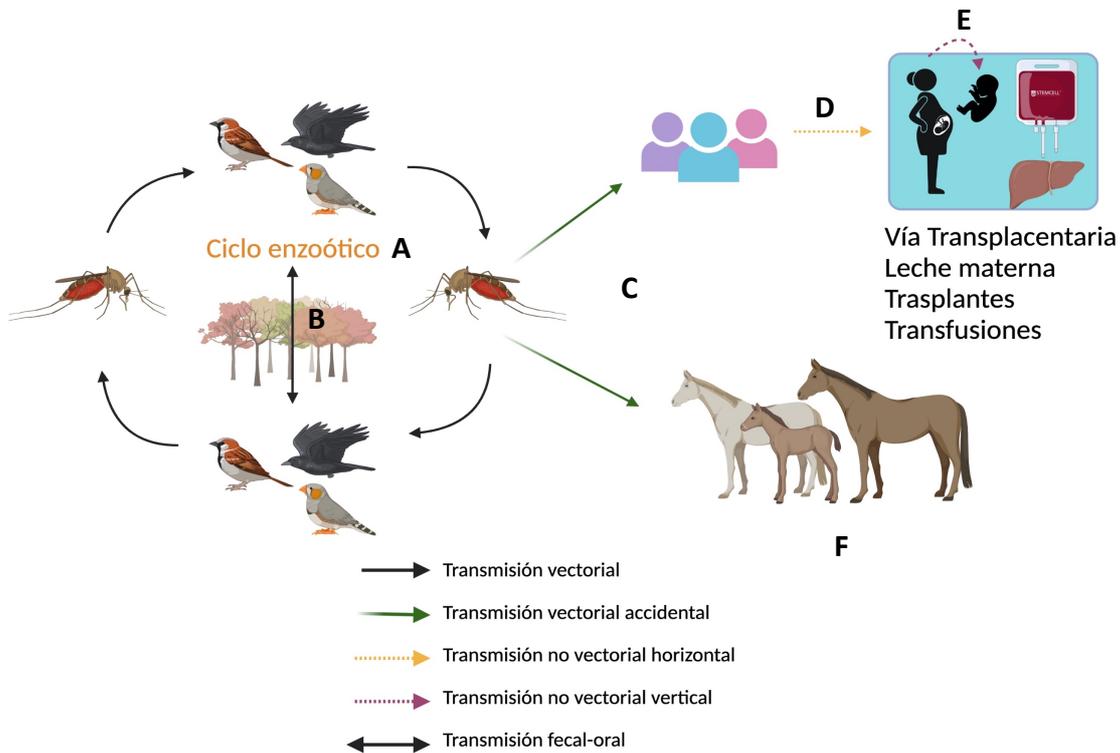
Los mosquitos del género *Culex* son los más implicados en la transmisión del virus en los humanos y aves. Las especies de *Culex* que han sido identificadas como las principales responsables de transmisión vírica son; *C. pipiens* y *C. modestus* (Andreadis, Anderson, & Vossbrinck, 2001; Dandawate, Rajagopalan, Pavri, & Work, 1969). En menor medida, puede ser transmitido por los mosquitos del género *Aedes* y *Anopheles*, así como por garrapatas (Gubler, 2007; Lawrie, Uzcátegui, Gould, & Nuttall, 2004).

Sin embargo, este virus se ha encontrado en 65 especies diferentes de mosquitos, 326 especies de aves y en más de 30 huéspedes no humanos, lo cual demuestra la alta capacidad de adaptación que presenta.

Dentro del ciclo enzoótico, las aves del orden *Passeriformes*, funcionan como huéspedes amplificadores. Debido a su alta tasa de migración y viremia, son capaces de infectar a grandes poblaciones de mosquitos distribuidos mundialmente (Lawrie et al., 2004)(**Figura 10 A y B**).

El segundo ciclo es el denominado epizoótico, en donde los humanos y los equinos se consideran hospedadores accidentales finales, puesto que solo pueden transmitir la enfermedad, generalmente, a través de la picadura de un vector (Chancey, Grinev, Volkova, & Rios, 2015) (**Figura 10 C y F**). Este ciclo, que se ha instalado en las ciudades

modernas, es el responsable de los últimos brotes de WNV en Europa. Esto es debido a las temperaturas más templadas que se pueden encontrar en las riberas de los ríos y mares del continente, provocado por el cambio climático. Dentro del ciclo epizoótico, se consideran, además, otros medios de transmisión no menos importantes, como la transfusión de sangre (Chancey et al., 2015; Meny, Santos-Zabala, Szallasi, & Stramer, 2011))(Stramer et al., 2005), el trasplante de órganos (Winston et al., 2014), la vía transplacentaria y mediante la ingesta de leche materna ((CDC), 2002)(**Figura 10 D y E**).



**Figura 10: Ciclo de transmisión de WNV. A)** Ciclo enzoótico entre aves y mosquitos del género *Culex*. **B)** Transmisión fecal-oral entre aves, **C)** Transmisión vectorial accidental a vertebrados no aves, **D)** Transmisión entre humanos, (ciclo epizoótico) no vectorial horizontal, mediante trasplantes y transfusiones, **E)** Transmisión no vectorial vertical, por vía intrauterina y leche materna. **F)** Transmisión a equinos. Imagen creada con Biorender.com

### 5.2.2 Presentación clínica

El periodo de incubación de la enfermedad se encuentra entre los 2-15 días. Según diversos estudios, este virus posee un tropismo por los queratinocitos a partir de los cuales, migrará a los islotes de Langerhans para multiplicarse y diseminarse por el organismo (Suthar, Diamond, & Gale, 2013). La infección por WNV suele ser leve y autolimitada siendo el 80% de los casos asintomáticos. En el 20% restante la enfermedad se caracteriza por una presentación aguda de fiebre, seguida de un cuadro gripal acompañado de prurito y gastroenteritis (Anderson, Horn, Hoang, Gottlieb, & Bennin, 2004; Sejvar, 2014).

Sin embargo, en algunos pacientes se presenta la denominada forma neuroinvasiva, la cual da lugar a encefalitis, meningitis y parálisis flácida aguda. Estos síntomas semejantes a la poliomielitis aguda, suelen provocar en el paciente cuadros de

monoplejías, parálisis de músculos, el coma o la muerte de una manera rápida (David & Abraham, 2016).

### 5.2.3 Tratamiento y prevención

Al igual que otros Flavivirus, no existe un tratamiento disponible para la infección por WNV. La búsqueda de la vacuna ha generado numerosos estudios en los que se han empleado diferentes abordajes, como la obtención de vacunas atenuadas, inactivadas, quiméricas, de péptidos sintéticos y genéticas (Ledgerwood et al., 2011; Smith et al., 2011; Verstrepen et al., 2014; Woods et al., 2019). Algunas de estas propuestas de vacunas, han llegado hasta la fase II de ensayos clínicos (Biedenbender, Bevilacqua, Gregg, Watson, & Dayan, 2011; Dayan, Bevilacqua, Coleman, Buldo, & Risi, 2012; Ulbert, 2019; Ulbert & Magnusson, 2014).

Sin embargo, aunque los resultados parecen prometedores, aún existen escollos que se necesitan salvar, como por ejemplo la reactividad cruzada entre los Flavivirus y el riesgo asociado de aumento de infección (Ulbert, 2019). Por otro lado, la inexistencia de fármacos capaces de acabar con la infección, provoca que el único tratamiento para aquellos pacientes que sufren la forma neuroinvasiva de la enfermedad, sean cuidados paliativos y de soporte (Sejvar, 2016).

Tras el hallazgo del análogo de guanosina ribavirina como potente antiviral contra la actividad de HCV, y bajo la suposición de su posible efecto inhibitorio sobre la proteína NS5 de WNV, se estableció como la alternativa farmacológica viable para detener las infecciones por este virus (Jordan, Briese, Fischer, Lau, & Lipkin, 2000). Estudios posteriores, demostraron que la ribavirina no tiene efecto en modelos animales ni en pacientes con neuroinvasión (Chowers et al., 2001; Hrnicek & Mailliard, 2004; Morrey et al., 2004).

Desde entonces, se han investigado un gran número de compuestos para combatir al WNV. Distintos IAN y otras pequeñas moléculas con carácter competitivo, han sido probadas tanto en modelos animales, como en modelos *in vitro* (Cannalire et al., 2019; Eyer et al., 2019; Nelson, Roe, Orillo, Shi, & Verma, 2015; Tarantino et al., 2016). Una de ellas, el favipiravir (**Figura 6 C**), ha demostrado ser un potente candidato (Furuta et al., 2013; Morrey et al., 2008; Segura Guerrero, Sharma, Neyts, & Kaptein, 2018) con actividad antiviral. Esta molécula, aunque fue inicialmente desarrollada para tratar la infección producida por el virus de la gripe, ha sido utilizada como antiviral en ensayos clínicos frente a infecciones producidas por Ébola (Mentré et al., 2015) y más recientemente, como un potente inhibidor, tanto *in vivo*, como *in vitro*, de WNV y otros virus de ARN (Abdelnabi et al., 2017; Escribano-Romero et al., 2017; Segura Guerrero et al., 2018). Este compuesto produce la inhibición de la síntesis de ARN a nivel de la RdRp, ejerciendo su acción antiviral mediante mutagénesis viral, como así lo confirman estudios realizados en CHIKV (Abdelnabi et al., 2017). Sin embargo, esta medida solo es efectiva durante los tres primeros días tras infección, posteriormente, se ha demostrado no tener efecto y menos en la forma neuroinvasiva de la enfermedad (Eyer et al., 2019).

## 6. Nuevos virus: SARS-CoV-2

Los coronavirus humanos (HCoV) son miembros de los coronavirus (CoV), responsables de múltiples enfermedades respiratorias de diversa gravedad, que pueden ocasionar desde un resfriado común a una neumonía severa (Pene et al., 2003). Actualmente, los HCoV son bien conocidos en la comunidad científica por su rápida evolución debido a la alta tasa de sustitución y recombinación de nucleótidos en su genoma (Vijgen et al., 2005). Estos virus han aparecido históricamente en diferentes lugares del mundo, y se han relacionado con importantes brotes de neumonía mortal en humanos desde principios del siglo XXI (F. Wu et al., 2020).

Uno de los brotes más importantes, apareció a finales del año 2019, ocasionado en la provincia de Wuhan (China), por una nueva cepa semejante al SARS-CoV, previamente encontrado en murciélagos, clasificada como SARS-CoV-2, mundialmente conocida por causar la pandemia de la COVID-19 (Zhu et al., 2020).

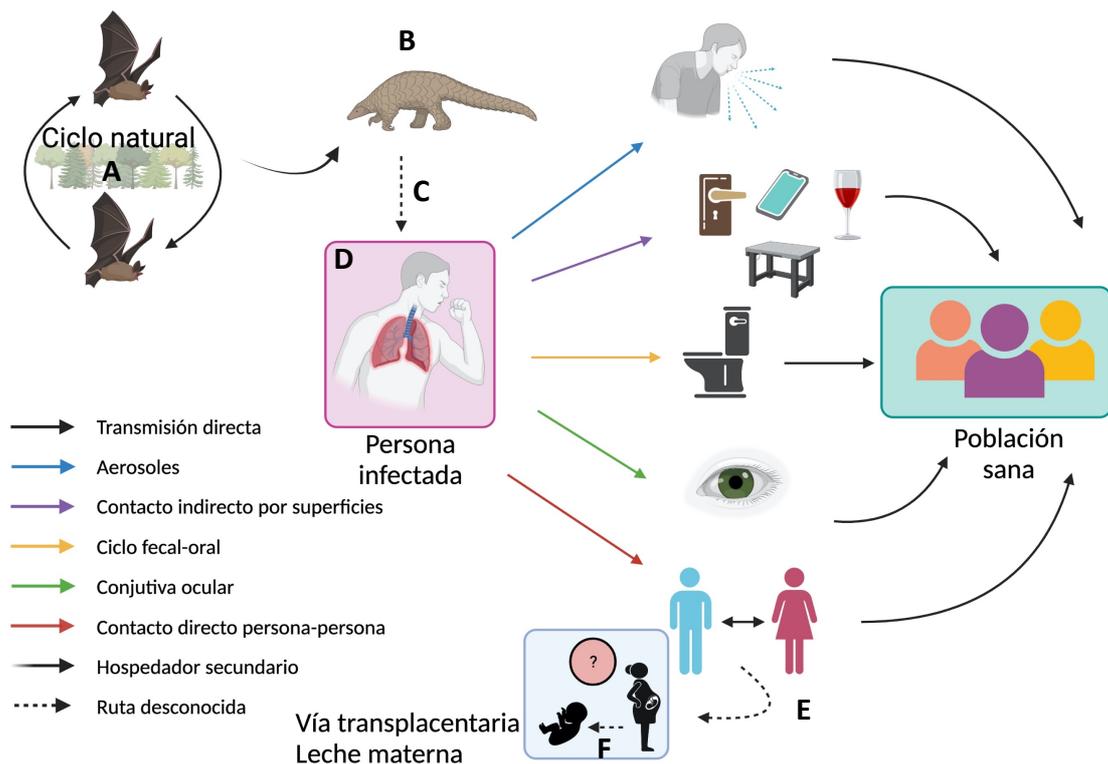
La pandemia global, está presionando el sistema de salud y económico a escala mundial. Esto ha provocado que la comunidad científica realice un esfuerzo multidisciplinario sin precedentes, para hacer frente tanto a la urgente necesidad de tratamientos, como a la prevención frente SARS-CoV-2.

### 6.1 Transmisión

El inicio de la pandemia por SARS-CoV-2, se ha vinculado con el brote en un mercado de animales vivos en Wuhan (China). El análisis genético de este virus sugirió que el hospedador natural podría ser un murciélago (*Chiroptera spp*), ya que el grado de homología de este virus con los CoV que infectan normalmente estos animales (bat-SL-CoVZC45, MG772933.1) era del 96% (Z. Xu et al., 2020; Zhou et al., 2020) (**Figura 11 A**).

Posteriormente, se sugirió que los pangolines (*Manis spp*) podrían ser posibles huéspedes intermediarios, ya que el virus pangolin-CoV (descrito por (Xiao et al., 2020) comparte una homología con el SARS-CoV-2 del 99%. Sin embargo, el origen de la zoonosis que ha dado lugar a esta pandemia sigue siendo objeto de estudio (Yi, Lagniton, Ye, Li, & Xu, 2020) (**Figura 11 B**).

Después de la infección en humanos del SARS-CoV-2, se han propuesto varios modos de transmisión, incluidos los aerosoles, la contaminación de superficies, la ruta fecal-oral y transmisión a través de la conjuntiva ocular (**Figura 11 D**) (Mukhra, Krishan, & Kanchan, 2020). Aunque las posibles vías de transmisión aún siguen siendo un objetivo de investigación, nuevos ensayos están demostrando que podrían existir partículas virales en la leche materna (Bardanzellu, Puddu, & Fanos, 2021) (**Figura 11 E y F**).



**Figura 11: Ciclo de transmisión del SARS-CoV-2:** A) Ciclo natural con los murciélagos como posibles hospedadores primarios del virus, B) Pangolín como posible hospedador secundario, C) Vía de transmisión desconocida entre el pangolín y el hombre, D) Hombre como hospedador terciario con desarrollo de síntomas y con capacidad para actuar como agente dispersante mediante diferentes medios, indicados por colores en la imagen, E) Posible vía de transmisión sexual, F) Posible transmisión de la madre al feto por vía intrauterina o mediante leche materna. Las vías E y F aún se encuentran en fase de investigación. Imagen creada con Biorender.com

## 6.2 Presentación clínica

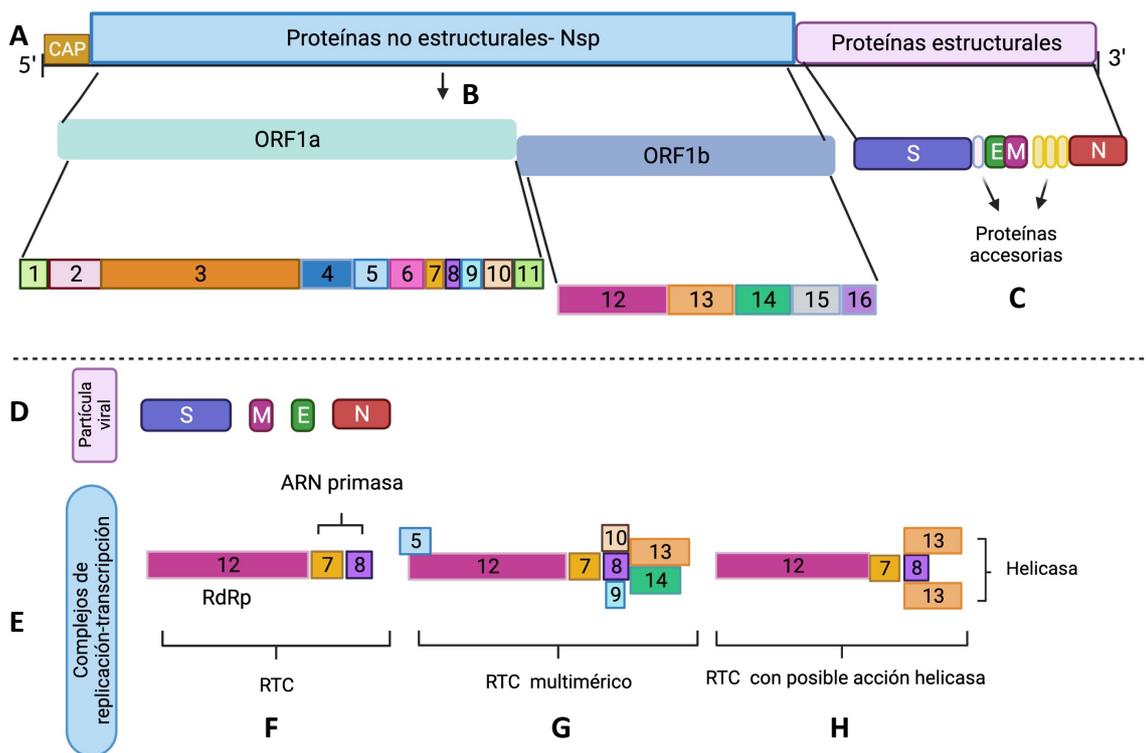
El SARS-CoV-2 fue originalmente catalogado como un agente causante de enfermedades respiratorias atípicas. Actualmente, se conoce que este virus tiene un especial tropismo por las células alveolares de los pulmones, las cuales expresan de manera elevada el receptor ACE2, indispensable para la entrada del virus en la célula (Zou et al., 2020).

Los pacientes infectados con SARS-CoV-2, a menudo presentan una variedad de síntomas similares a los de la gripe siendo los principales, fatiga, fiebre y tos (Huang et al., 2020). Se trata de síntomas generales que han hecho que los diagnósticos sean difíciles y poco fiables (Y. Jin et al., 2020). Actualmente los pacientes que son positivos en este virus, se encuentran clasificados en cinco grandes grupos: Asintomáticos (aquellos que no presentan cuadro clínico pero dan positivo en la prueba de detección de ARN), leves (con cuadros agudos de infección del tracto respiratorio y complicaciones gástricas), moderados (experimentan neumonía con lesiones pulmonares), graves (presentan neumonía con hipoxemia y lesiones pulmonares graves) y críticos (presencia de síndrome de dificultad respiratoria aguda junto con shock, encefalopatía, lesión miocárdica, disfunción de la coagulación, insuficiencia cardíaca y lesión renal aguda) (Yuki, Fujiogi, & Koutsogiannaki, 2020).

Los diferentes síntomas que se presentan en la infección por SARS-CoV-2, varían por poblaciones según; el sexo, la edad, la etnia, los antecedentes clínicos y las patologías previas presentes en el paciente. Además, con la pandemia de COVID-19, el SARS-CoV-2 evoluciona de manera persistente y el número de variantes aumenta significativamente. A excepción de la alfa, que solo es altamente transmisible, las otras variantes son altamente transmisibles, con una alta mortalidad. Entre todas las variantes, la beta es la más infecciosa y patógena (Y. Zhang, Banga Ndzouboukou, Gan, Lin, & Fan, 2021). Es por ello por lo que la infección tiene un curso clínico impredecible en cada individuo (Pollard, Morran, & Nestor-Kalinowski, 2020).

### 6.3 Genoma y ciclo replicativo

El SARS-CoV-2 es un virus de ARNm (+) con un genoma de aproximadamente 30 Kb. Su ARN genómico comprende 14 (ORF), dos de los cuales son los principales (ORF1a y ORF1b) que se superponen con un cambio del marco lectura. Estas regiones codificantes, abarcan dos tercios del genoma y se traducen en dos poliproteínas; 1a y 1b, respectivamente (Alanagreh, Alzoughool, & Atoum, 2020; Helmy et al., 2020) (**Figura 12 A y B**). Estas poliproteínas son procesadas por proteasas virales (proteasa similar a la papaína y la proteasa principal del virus), para dar lugar a las 16 proteínas no estructurales del virus (nsp) (Y. Chen, Liu, & Guo, 2020).



**Figura 12: Representación gráfica de la organización del genoma de SARS-CoV-2.** A) Organización principal donde se pueden distinguir las estructuras protectoras (CAP) y la separación entre las proteínas no estructurales y las estructurales, B) Marcos de lectura ORF1a y 1b superpuestos que dan lugar a dos poliproteínas 1a y 1b respectivamente, C) Organización de las proteínas estructurales junto con las accesorias, D) Composición de la partícula viral, E) Posibles complejos de replicación-transcripción junto con la RdRp, F) RTC estándar, G) RTC multimérico, H) Posible RTC con acción helicasa. Imagen creada con Biorender.com

Algunas de estas 16 nsp, junto con cofactores del hospedador, forman el denominado complejo de replicación-transcripción (RTC). Estos complejos son los encargados de catalizar la replicación y transcripción del genoma viral (Helmy et al., 2020; Romano, Ruggiero, Squeglia, Maga, & Berisio, 2020) (**Figura 12 E**).

El tercio restante del genoma contiene varios ORF superpuestos que codifican para las cuatro proteínas estructurales principales: Espícula (S), membrana (M), envoltura (E) y nucleocápside (N) y otras proteínas accesorias (Arya et al., 2021) (**Figura 12 C y D**).

### 6.3.1 Proteínas no estructurales

Dentro de la célula hospedadora, los ORF1a y ORF1a/b, se traducen en las poliproteínas pp1a y pp1a/b. A partir de estas poliproteínas, se generan 16 nsp mediante la escisión proteolítica llevada a cabo por nsp3 (proteasa similar a la papaína (PLpro)) y nsp5 (proteasa viral principal (Mpro / 3CLpro)) (Kadam, Sukhramani, Bishnoi, Pable, & Barvkar, 2021).

Las proteínas no estructurales, realizan múltiples funciones en el ciclo replicativo de los virus pertenecientes a la familia *Coronaviridae*, manteniendo sus características en los diferentes géneros. Pueden agruparse según sus funciones principales, sin embargo, muchas de las proteínas realizan acciones múltiples y superpuestas (Kadam et al., 2021):

- Las proteínas nsp1, nsp2 y nsp3 intervienen en la inhibición del sistema inmune del huésped (Claverie, 2020; Cornillez-Ty, Liao, Yates, Kuhn, & Buchmeier, 2009; Schubert et al., 2020)
- La nsp3 es la proteasa viral secundaria con dominio similar a la papaína (PLpro) encargada de escindir la poliproteína viral, además, es capaz de interactuar con el ARN del huésped para evitar su traducción (Koudelka et al., 2021; Lei, Kusov, & Hilgenfeld, 2018).
- La nsp4 ha sido descrita previamente como responsable de la creación de la doble membrana de las vesículas virales (Angelini, Akhlaghpour, Neuman, & Buchmeier, 2013).
- La nsp5 es la proteasa viral principal con dominio (Mpro / 3CLpro) (Koudelka et al., 2021).
- La nsp6 se encarga de la inducción de los autofagosomas, que permiten la entrada de la progenie viral en las células hospedadoras colindantes (Angelini et al., 2013)
- La nsp9 es capaz de interactuar con las helicasas celulares para facilitar la replicación vírica (Kadam et al., 2021).
- La nsp15 es una endoribonucleasa que escinde el ARN en los sitios de poliuridilato (Kadam et al., 2021).

Además de las funciones específicas de cada proteína, las proteínas no estructurales ensamblan el complejo de replicación y transcripción (RTC), cuya función es facilitar la replicación y la transcripción del virus, como ya ha sido descrito anteriormente para diferentes coronavirus (Ziebuhr, 2005).

En este complejo de replicación, la proteína principal es la nsp12, que funciona como RdRp usando diferentes proteínas no estructurales como factores auxiliares (**Figura 12 E, F, G y H**):

- Complejo nsp12, nsp7 Y nsp8

La nsp12 es una RdRp de múltiples dominios con un peso molecular de 103 kDa. Junto con la nsp7 y nsp8, forma un complejo con acción replicasa para la replicación y transcripción del genoma de ARN viral (Gao et al., 2020; Yan et al., 2020)(**Figura 13**).

La nsp12 contiene dos dominios diferentes; un dominio polimerasa (RdRp) y un dominio de nucleotidiltransferasa asociada a nidovirus (NiRAN). Se cree que este dominio semejante a los presentes en los nidovirus, puede tener una acción similar a una quinasa sobre la hebra de ARN, facilitando la estabilidad estructural de la proteína y por lo tanto su acción polimerasa (Dwivedy et al., 2021; Gao et al., 2020; Kadam et al., 2021)(**Figura 13 A**).

El dominio polimerasa es capaz de realizar la reacción de polimerización con una eficacia extremadamente baja. Sin embargo, la presencia de las proteínas auxiliares nsp7 y nsp8 estimulan enormemente la reacción. Este hecho previamente documentado para SARS-CoV (Imbert et al., 2006; te Velthuis, Arnold, Cameron, van den Worm, & Snijder, 2010), ha sido corroborado posteriormente en SARS-CoV-2 (Peng et al., 2020)(**Figura 12 F**) (**Figura 13 B**).

El complejo formado por nsp12-nsp7-nsp8 se define como el componente central mínimo para mediar en la síntesis de ARN por el virus.

Las estructuras cristalográficas y los modelos bioinformáticos sugieren que; el complejo nsp7-8 forma un heterodímero, que necesita de una subunidad adicional de nsp8 para unirse correctamente a la nsp12(Peng et al., 2020; Wilamowski et al., 2021).

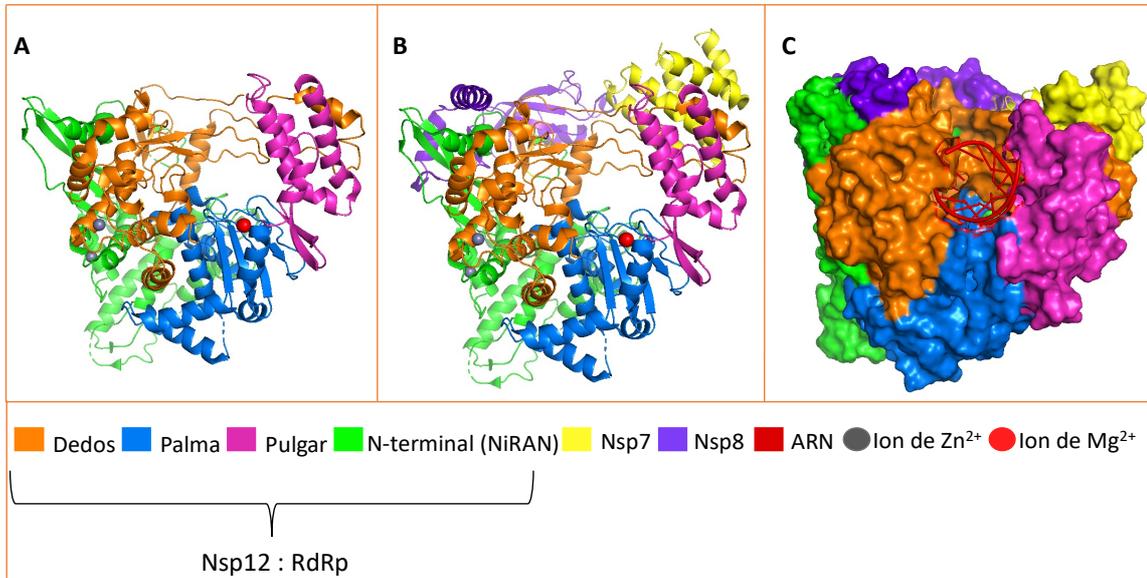
Este heterodímero formado por la nsp7-8 es capaz de unirse a los diferentes subdominios de la polimerasa. Por un lado, es capaz de unirse al subdominio del pulgar, ubicado frente al canal del NTP entrante. Por otro lado, es capaz de unirse al subdominio de los dedos y al canal de entrada de la hebra molde de ARN. Estas interacciones permiten una unión con mayor afinidad de la polimerasa a la hebra molde, lo que podría aumentar su procesividad (Gao et al., 2020; Peng et al., 2020; Yin et al., 2020)(**Figura 13 C**).

Para lograr la transcripción y replicación completas del genoma viral, se requieren otras unidades e interacciones de nsp para ensamblarse en un complejo de holoenzimas (Peng et al., 2020). Diferentes estudios han demostrado que la nsp12 también interactúa directamente con las proteínas nsp5, nsp9, y nsp13 (Brockway, Clay, Lu, & Denison, 2003; Naidu, Mustafa, Clemens, & Naidu, 2021; Yoshimoto, 2021), mientras que la nsp8 tiene capacidad de interactuar con la nsp7, nsp9, nsp10, nsp13 y nsp14, formando un complejo de replicación multimérico (Brant, Tian, Majerciak, Yang, & Zheng, 2021; von Brunn et al., 2007).

Otra de las uniones entre las proteínas no estructurales que se encuentran en estudio, es la que forma el complejo nsp12-nsp7-nsp8 con la nsp13. Se cree que esta unión codificaría para la formación de dos helicasas de ARN (J. Chen et al., 2020).

Estas supuestas helicasas, trabajarían juntamente con el complejo de replicación, desenrollando la parte del ARN que actúa como iniciador en la cadena molde,

permitiendo la entrada de un nuevo complejo de replicación (Arya et al., 2021; J. Chen et al., 2020; Zeng et al., 2021) (**Figura 12 H**).



**Figura 13: Representación gráfica del complejo mínimo de RTC de SARS-CoV-2, A)** Estructura terciaria de la nsp12, donde se puede observar los tres subdominios y el dominio N-terminal en verde, **B)** Estructura terciaria del RTC, con la proteína nsp7 (amarillo) y nsp8 (morado), **C)** Estructura cuaternaria de todo el complejo RTC, con la cadena de ARN monocatenaria (rojo). Figura realizada a partir del PDB 6xqb

- **Nsp10**

Es una proteína pequeña de 139 aa de longitud, que actúa como andamio para formar el complejo de metilación del ARN (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. **A**). Esta proteína trabaja juntamente con la nsp14 (con actividad exonucleasa y N7-metiltransferasa, para formar el cap en el extremo 5') y la nsp16 (2'-o-metiltransferasa, que aumentan la resistencia del ARN al efecto del sistema inmune del huésped) (Romano et al., 2020). Diferentes estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que, esta proteína es imprescindible para la activación de las metiltransferasas (nsp14 y nsp16), y, por ende, es responsable de la protección del ARN viral frente al sistema inmune del huésped (Arya et al., 2021; Ke et al., 2012; Krafcikova, Silhan, Nencka, & Boura, 2020).

- **Nsp14**

Es una proteína bifuncional, con un dominio exonucleasa 3' → 5' en el extremo N-terminal y un dominio guanina-N7 metiltransferasa en el extremo C-terminal, como se ha indicado anteriormente (Hassan, Sedenho, Vitale, Oliviera, & Crespilho, 2021; Hsu, Laurent-Rolle, Pawlak, Wilen, & Cresswell, 2021). El dominio N-terminal está implicado en la corrección de errores de la RdRp cometidos durante la síntesis del ARN y su actividad está estimulada por su interacción con nsp10 (Krafcikova et al., 2020; S. Lin et al., 2021). Este papel fundamental de corrección y protección del ARN viral la convierten a nsp14 en un objetivo para el desarrollo de fármacos antivirales. Por otro lado, la combinación de estos inhibidores con los aquellos utilizados frente a la actividad RdRp de nsp12, podrían tener un efecto sinérgico beneficioso (Morse, Lalonde, Xu, & Liu, 2020; Saramago et al., 2021).

## 6.4 Tratamiento y prevención

A pesar de la gran variedad de vacunas que han sido desarrolladas, las que están clínicamente aprobadas no están disponibles mundialmente, además de no poseer actualmente datos de la eficacia y la seguridad de estas (Saramago et al., 2021; M. Y. Wang et al., 2020). Por ello, actualmente no existe un tratamiento eficaz para la infección por SARS-CoV-2, por lo que las medidas médicas incluyen principalmente; la vacunación, la protección, el tratamiento de enfermedades subyacentes, el alivio de los síntomas, la reducción de las complicaciones y el apoyo a órganos vitales si se requiere. En los pacientes graves y críticos se debe proporcionar oxigenoterapia y a menudo ventilación mecánica (Valdenassi et al., 2020).

Muchos han sido los fármacos empleados para tratar de paliar la infección, como por ejemplo; antibióticos, antiparasitarios y glucocorticoides (Stasi, Fallani, Voller, & Silvestri, 2020). Sin embargo, ninguno de ellos ha mostrado capacidad para inhibir la acción del virus. La inmunoterapia, incluida la terapia con plasma de convalecencia y la administración de anticuerpos monoclonales humanos o policlonales, ha sido una parte importante de la terapia integral. Por el contrario, la evidencia de su beneficio es limitada para esta enfermedad y su seguridad y eficacia aun necesitan más pruebas básicas y clínicas (Y. Li et al., 2020)

Actualmente, se han empleado algunos compuestos de moléculas pequeñas (previamente descritos para otras infecciones), que han mostrado efectos inhibitorios sobre este virus. El remdesivir ha demostrado ser capaz de inhibir significativamente la polimerización del ARN en estudios *in vitro*, mediante su unión a la hebra naciente y promover su terminación (Yin et al., 2020). Así mismo, el Favipiravir es capaz de unirse de manera análoga a la hebra naciente, bloqueando su polimerización. En ensayos clínicos ha demostrado tener pocos efectos secundarios, propuesto, así como el primer compuesto anti-SARS-CoV-2 en China (Tu et al., 2020).

Recientemente, el molnupiravir parece haber cambiado el escenario en cuanto a tratamientos contra el SARS-CoV-2 se refiere, es el primer fármaco oral que demuestra un beneficio significativo en la reducción de la hospitalización o de la muerte por COVID-19, cuando se presenta en su forma leve. Sin embargo, cuando la enfermedad se presenta en su forma moderada o grave, su papel es cuestionable y son necesarios más estudios (C. C. Lee, Hsieh, & Ko, 2021; A. K. Singh, Singh, Singh, & Misra, 2021). Hoy en día, ha sido aprobado su uso en caso de emergencia bajo estrictos criterios médicos, actualmente la FDA continúa evaluando los riesgos asociados con el uso de esta droga (FDA, 2021).

## 7. Búsqueda de nuevos compuestos antivirales

Durante el desarrollo de un nuevo fármaco, pueden transcurrir de 12 a 15 años desde su concepción original hasta el lanzamiento al mercado de un producto terminado, con un coste total superior a los 1000 millones de dólares. Esto es debido a las numerosas pruebas y ensayos que se deben realizar para que se pueda demostrar un efecto terapéutico con una mínima toxicidad, para dar lugar a la producción de fármacos seguros (Hughes, Rees, Kalindjian, & Philpott, 2011).

Los datos mostrados en la introducción de esta tesis doctoral hacen evidente la necesidad urgente de desarrollar nuevos tratamientos para las infecciones provocadas por virus de ARN emergentes.

En el caso de la enfermedad causada por ZIKV, es necesaria la búsqueda de fármacos que inhiban la replicación del virus, que, además, en el caso de mujeres embarazadas, pudieran evitar los efectos negativos sobre los fetos en desarrollo. Además, la obtención de inhibidores frente a la polimerasa de este virus, podrían permitir su utilización en pacientes que sufran la forma neuroinvasiva causada por WNV, debido a la alta homología de secuencia entre las polimerasas de estos dos Flavivirus.

Por otro lado, durante la pandemia de la COVID-19, diferentes empresas farmacéuticas, así como diferentes centros de investigación, han desarrollado vacunas para controlar la propagación del virus. Aunque el protocolo de inmunización avanza rápidamente en todo el mundo, la eficacia real de estas vacunas no ha sido demostrada para todos los casos, y tampoco lo ha sido para las diferentes cepas víricas que están surgiendo.

Los diferentes enfoques para el descubrimiento de moléculas pequeñas con posible potencial inhibidor incluyen el cribado de bibliotecas químicas, modelado molecular y cribados virtuales (Sebera et al., 2018). Aunque se han logrado avances prometedores, hasta la fecha, siguen sin existir tratamientos eficaces y aprobados para su uso extensivo en pacientes con enfermedades causadas por ZIKV, WNV y SARS-CoV-2 (B. Wang, Thurmond, Hai, & Song, 2018). Debido a la gran cantidad de moléculas candidatas posibles, es necesario desarrollar sistemas que permitan un cribado rápido y eficaz que sirva como paso previo al estudio con modelos *in vivo* (Sinigaglia, Peta, Riccetti, & Barzon, 2020).

En consecuencia, el desarrollo de métodos de alto rendimiento para el cribado de moléculas con propiedades anti-RdRp supondría un gran avance en la lucha contra estos patógenos. Aunque se han llevado a cabo distintos abordajes experimentales para tratar esta cuestión, existen varias limitaciones prácticas que dificultan su implementación como plataformas de cribado de alto rendimiento. Entre otros problemas, estos métodos utilizan compuestos radioactivos que implican el uso de infraestructuras de bioseguridad adicionales, o una configuración experimental complicada que dificulta su miniaturización (Campagnola, Gong, & Peersen, 2011; Gong et al., 2013; Madhvi et al., 2017; Su et al., 2010).

En la presente Tesis Doctoral, se describen diferentes métodos para medir la actividad polimerasa de distintas RdRp mediante medida de fluorescencia. Además, se describe el uso aplicado de este sistema como una plataforma que permite el cribado rápido y eficaz de distintos compuestos con potencial efecto inhibitorio sobre la polimerasa. Finalmente se ejemplifica su uso con una prueba de concepto en la que se hallan varios antivirales frente a ZIKV aislados a partir del cribado de una quimioteca de compuestos sin efecto antiviral previamente descrito. De esta manera, estos métodos fluorimétricos pueden suponer una forma rápida y económica para el cribado de compuestos, acortando así los tiempos de selección actuales, y facilitando el reposicionamiento y el avance de la investigación de diferentes fármacos con posibles efectos terapéuticos.



Objetivos

### III. OBJETIVOS

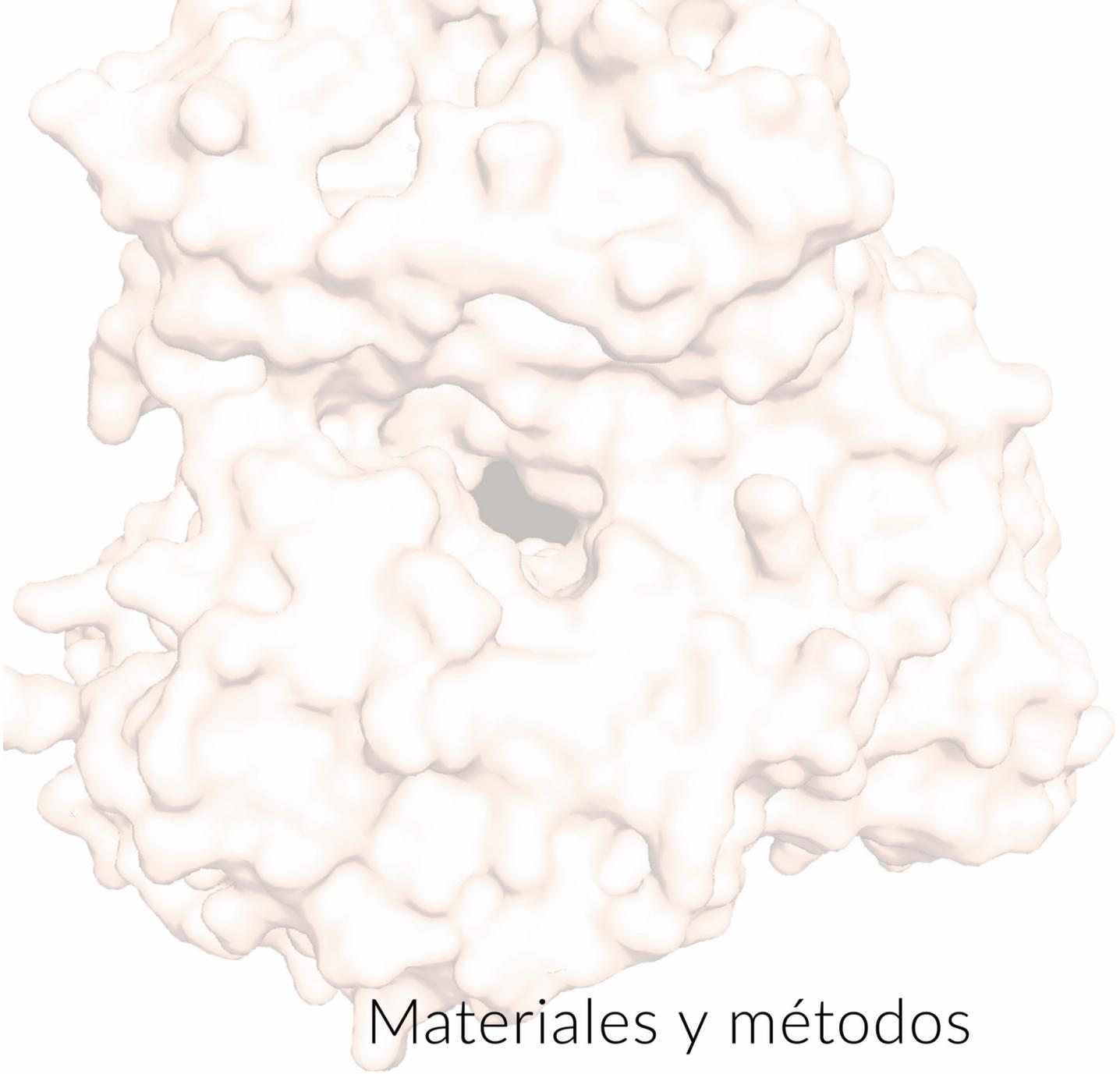
El **objetivo principal** del proyecto es el desarrollo de una plataforma de alto rendimiento basada en fluorescencia para medir a tiempo real la actividad polimerasa de las RdRps virales, de virus con un alto impacto clínico.

Dentro de este objetivo principal, se encuentran tres objetivos específicos que permitirán trabajar con tres polimerasas virales distintas para poner a punto el sistema en diferentes virus de ARN.

**Objetivo 1:** Clonaje, expresión y purificación de la ZIKV NS5 RdRp para el desarrollo de una plataforma basada en fluorescencia capaz de detectar la actividad polimerasa a tiempo real, a través de la cual sea posible la caracterización bioquímica y la búsqueda de inhibidores de la polimerasa viral.

**Objetivo 2:** Clonaje, expresión y purificación de la WNV NS5 RdRp para el desarrollo de una plataforma basada en fluorescencia capaz de detectar la actividad polimerasa a tiempo real, a través de la cual sea posible la caracterización bioquímica y la búsqueda de inhibidores de la polimerasa viral.

**Objetivo 3:** Expresión y purificación del complejo replicativo transcripcional formado por SARS-CoV-2 nsp12 RdRp, nsp7 y nsp8 para el desarrollo de una plataforma basada en fluorescencia capaz de detectar la actividad polimerasa a tiempo real, a través de la cual sea posible la caracterización bioquímica y la búsqueda de inhibidores de la polimerasa viral.



Materiales y métodos

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Materiales

#### 1.1 Medios de cultivo

Los medios de cultivo, LB deshidratado y el agar para bacteriología fueron suministrados por Panreac Applichem. Los medios TB y SOC, fueron fabricados siguiendo las indicaciones proporcionadas por Green y Sambrook (Green & Sambrook, 2012).

#### 1.2 Reactivos generales

Los antibióticos empleados en todos los protocolos fueron adquiridos desde Panreac Applichem, y sus concentraciones fueron empleadas como figura en la **Tabla 2**. El MnCl<sub>2</sub>, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>, así como Glicerina, Imidazol, el IPTG, DTT, PMSF, EDTA y Bis-Tris para soluciones tampón, fueron compradas a Panreac Applichem.

Los detergentes utilizados en la purificación de proteínas y en la realización de tampones, Tween 20 y SDS fueron suministrados por Bio-Rad Laboratories.

La resina de purificación HisPur™ Ni-NTA y así como las soluciones stock de ATP, GTP y la tinción para ácidos nucleicos verde fluorescente SYTO 9® fueron obtenidos de ThermoFisher Scientific.

La heparina (HEP), los análogos de nucleótidos; cordicepina 5'-trifosfato (3'dATP) y rivabiridina 5'-trifosfato (RTP), así como el DMSO y la tinción para ácidos nucleicos fluorescente verde: SYBR® Green II, fueron procurados por Sigma-Aldrich.

Los ARN homopoliméricos empleados para los ensayos de polimerización: ácido poliuridílico, ácido poliadenilico y ácido ácido policitidílico (denominados poli-U, poli-A y poli-C, respectivamente) todos ellos de unos 300 residuos de longitud, se compraron a Amersham Biosciences.

Los oligonucleótidos de ADN fueron sintetizados bajo demanda por la empresa Eurofins-megalab.

Los plásmidos de expresión bacteriana pET28a y pET16b fueron obtenidos de Novagen. Los nucleótidos marcados con radioactividad [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP y [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]GTP fueron suministrados por Perkin Elmer.

El péptido sintético VPg1, fue elaborado por el Servicio de Química de Proteínas y Síntesis de Péptidos del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM). Este péptido contiene la secuencia aminoacídica (GPYAGPLERQRPLKVRACLPRQE) de la VPg-1 de FMDV-S8c1: (Sobrinó, Dávila, Ortín, & Domingo, 1983).

Las células *E. coli* BL21(DE3)-pRIL y *E. coli* DH5a electrocompetentes se prepararon en el laboratorio utilizando el método estandarizado por (Green & Sambrook, 2012)

GlaxoSmithKline proporcionó las tres cajas químicas antikinoplastidas gracias al acuerdo de transferencia de material MTA: MTARG566.

Los compuestos  $C_{20}H_{26}N_8$  (4- (5-Amino-4-ciclohexil-3-propan-2-ilpirazol-1-il) -6-piridin-2-il-1,3,5-triazin-2-amina) con PubChem CID: 91800701 y TCMDC-143406 y  $C_{21}H_{23}N_5O$  (1- (6- (piridin-2-il) -2- (p-tolilamino) pirimidin-4-il) piperidin-3-ol con PubChem CID: 91800580 y TCMDC-143215, denominados Compuesto 6 y Compuesto 15 respectivamente, fueron sintetizados en polvo seco y suministrados por Enamine.Ltd.

La quimioteca FLA\_IQM fue cedida por la Profesora María Jesús Pérez Pérez del Instituto de Química Médica, (IQM-CISC).

### 1.3 Enzimas

Las enzimas de restricción empleadas como *DpnI*, *NdeI* y *XhoI* y T4 Ligasa, así como los componentes necesarios para su funcionamiento, fueron suministrados por New England Biolabs. Las enzimas responsables de la PCR de alta fidelidad como *Phusion® High-Fidelity DNA polymerase* (HF-pol) y *Gibson Assembly® Máster Mix*, fueron también adquiridos de New England Biolabs.

### 1.4 Plásmidos con regiones codificantes

El plásmido **pcDNA ZIKV**, que codifica por el genoma completo del virus ZIKV (aislado PRVABC59; Puerto Rico 2015, ATCC: VR-1843 (Lanciotti, Lambert, Holodniy, Saavedra, & Signor, 2016)), fue cedido por el Dr. Armando Arias Esteban del Centro Regional de Investigaciones Biomédicas (CRIB-UCLM).

El plásmido **pUC-NS5**, que contiene en su interior la secuencia completa de la región NS5 de WNV del aislado Serbia Novi Sad/12 (KC407673.1 (Petrović et al., 2013)), fue cedido por el Dr. Miguel Ángel Martín Acebes (INIA-CSIC).

Los plásmidos pET28a que contienen los genes codificantes de las proteínas nsp12, nsp8 y nsp7 del virus SARS-CoV-2 se obtuvieron de la empresa *Genscript* tras el diseño en el laboratorio.

La secuencia de los genes nsp7, nsp8 y nsp12 pertenecen al virus SARS-CoV-2, descrito en 2020 durante la pandemia mundial desatada en Wuhan (F. Wu et al., 2020). Estos genes codifican para una proteína de 83 aa (nsp7), 198 aa (nsp8) y 932 aa (nsp12). El constructo nsp7L8 es una proteína de fusión entre nsp7 y nsp8 separadas por una región de 6 glicinas.

Los genes nsp7, nsp8 y el constructo codificante de la proteína nsp7L8 se clonaron dentro del plásmido pET28b entre las dianas de *NcoI* y *NotI*, obteniéndose los plásmidos **pET28a-SARS-CoV2-nsp7**, **pET28a-SARS-CoV2-nsp8** y **pET28a-SARS-CoV2-nsp7L8**, respectivamente.

Estos plásmidos codifican para las correspondientes proteínas unidas a un tracto de 11 aminoácidos (secuencia: AAALHHHHHH) en el extremo C-terminal.

El gen nsp12 se clonó dentro del mismo plásmido, entre las dianas de *NcoI* y *XhoI*, obteniéndose el plásmido **pET28a-SARS-CoV2-nsp12**, que codifica la proteína nsp12

Los pesos aproximados de las diferentes proteínas recombinantes son los siguientes: 14 kDa (nsp 7), 23 kDa (nsp 8), 33 kDa (nsp 7L8) y 107 kDa (nsp 12).

Los plásmidos **pET-28a-3Dpol** y **pET-28aD338A**, que codifican para para la polimerasa 3D-WT pol de FMDV, y para la variante catalíticamente inactiva 3D-D338A pol,

respectivamente, fueron cedidos por el Dr. Rubén Agudo Torres. Su construcción ha sido descrita previamente (Arias et al., 2005; Ferrer-Orta et al., 2004).

El plásmido **Jc1FLAG2(p7-nsGluc2a)** fue cedido por la Dra. Celia Perales Viejo (CNB-CSIC). Este vector es un plásmido infeccioso que da lugar al genoma quimérico de HCV, Jc1. Este genoma se generó a partir de dos cepas de genotipo 2a de HCV aisladas de pacientes: JFH1 y J6CF (Marukian et al., 2008). El plásmido **Jc1FLAG(p7-nsGluc2A) /GNN**, cedido también por la Dra. Celia Perales Viejo, contiene unas mutaciones en la región NS5b de Jc1. Estos producen los cambios D318N y D319N en la polimerasa, haciéndola catalíticamente inactiva (Marukian et al., 2008).

### 1.5 Reactivos para las reacciones en geles de poliacrilamida y agarosa

La agarosa (*SeaKem® LE Agarose*) empleada para la realización de geles de electroforesis fue suministrada por la empresa Lonza Biosciences. El *MIDORIGreen Advance*, empleado como agente intercalante de ácidos nucleicos en geles de agarosa y el marcador de peso molecular *FastGene 1 kb DNA Marker Plus*, fueron suministrado por la empresa Nippon Genetics Co. Ltd. El tampón de carga para ácidos nucleicos *Gel Loading Dye, Purple (6X)* fue adquirido a New England Biolabs. Tanto los geles de agarosa, como los tampones de electroforesis TAE y TBE, y el tampón de carga azul de bromofenol/xileno-cianol fueron fabricados siguiendo protocolos estandarizados de laboratorio.

La solución Acrilamida/Bis 37,5:1, el APS, y el TEMED, fueron comprados a SERVA Electrophoresis GmbH, Panreac Applichem (ITW reagents) y Bio-rad Laboratories, respectivamente. Los tampones Tris-HCl pH 8.8; Tris-HCl pH 6.8; así como el SDS-10% necesarios para la preparación de los geles, se realizaron siguiendo los protocolos estandarizados de (Green & Sambrook, 2012). El tampón Tris-Glicina con SDS se obtuvo como un preparado concentrado 10X en Bio-rad Laboratories. Los marcadores de peso molecular *FastGene® DNA ladders* de 1kb y de 100 bp así como el marcador de proteínas, *PiNK Prestained Protein Ladder (5-175 kDa)*, empleados durante todos los experimentos realizados durante esta tesis pertenecen a la empresa Nippon Genetics Co. Ltd. El tampón de carga para proteínas en condiciones desnaturalizantes, fue fabricado siguiendo las indicaciones de (Green & Sambrook, 2012)

El análisis del grado de purificación de las proteínas recombinantes se realizó mediante electroforesis en geles de acrilamida conteniendo 0,1% SDS (SDS-PAGE)(Laemmli, 1970). La tinción empleada para el revelado de los geles de acrilamida se realizó con Azul Brillante de Comassie ([0,25% *Coomassie Brilliant Blue R250* (BioRad), 40% metanol, 10% ácido acético]) y se destiñó con una solución 40% metanol, 10% ácido acético.

### 1.6 Oligonucleótidos

**Tabla 1:** Oligonucleótidos utilizados en las diferentes estrategias de clonaje y mutagénesis dirigidas empleadas en la presente tesis doctoral.

Nombre	Secuencia (5'→3')
NS5B_HCV_Fw	TTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGTCCATGTCATACTC CTGGACCGGGGCTC



**Tabla 3:** Composición de los tampones empleados en los protocolos de purificación de las polimerasas virales.

	Composición	Purificaciones donde se emplea
<b>Tampón de Lisis</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 mM Tris-HCl pH 7.5</li> <li>• 300 mM NaCl</li> <li>• 400 mM C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub></li> <li>• 4 mM MgCl<sub>2</sub></li> <li>• 10 % Glicerol</li> <li>• 10 mM Imidazol</li> <li>• 0.1 % (v/v) Tween 20</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ ZIKV NS5 RdRp</li> <li>○ WNV NS5 RdRp</li> <li>○ HCV NS5b RdRp</li> <li>○ SARS-CoV-2 Nsp12 RdRp, Nsp7, Nsp8, Nsp7L8</li> </ul>
<b>Tampón de Lisis II</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 mM tampón fosfato pH 7.8</li> <li>• 300 mM NaCl</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ FMDV 3D pol RdRp</li> </ul>
<b>Tampón de Lavado</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 mM Tris-HCl pH 7.5-8</li> <li>• 300 mM NaCl</li> <li>• 4 mM MgCl<sub>2</sub></li> <li>• 10 % Glicerol</li> <li>• 10 mM Imidazol</li> <li>• 0.1 % (v/v) Tween 20</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ ZIKV NS5 RdRp</li> <li>○ WNV NS5 RdRp</li> <li>○ HCV NS5b RdRp</li> <li>○ SARS-CoV-2 Nsp12 RdRp, Nsp7, Nsp8, Nsp7L8</li> <li>○ FMDV 3D pol RdRp</li> </ul>
<b>Tampón de Lavado II</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 mM tampón fosfato pH 6</li> <li>• 500 mM NaCl</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ FMDV 3D pol RdRp</li> </ul>
<b>Tampón de Lavado con imidazol</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 mM Tris-HCl pH 7.5-8</li> <li>• 300 mM NaCl</li> <li>• 4 mM MgCl<sub>2</sub></li> <li>• 10 % Glicerol</li> <li>• 10 mM Imidazol</li> <li>• 0.1 % (v/v) Tween 20</li> <li>- <u>Gradiente de imidazol:</u> 25 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 125 mM.</li> <li>- <u>Final:</u> 400 mM</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ ZIKV NS5 RdRp</li> <li>○ WNV NS5 RdRp</li> <li>○ HCV NS5b RdRp</li> <li>○ SARS-CoV-2 Nsp12 RdRp, Nsp7, Nsp8, Nsp7L8</li> <li>○ FMDV 3D pol RdRp</li> </ul>
<b>Tampón de Diálisis I</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 mM Tris-HCl pH 7.5-8</li> <li>• 150 mM NaCl</li> <li>• 5 mM MgCl<sub>2</sub></li> <li>• 10 % Glicerol</li> <li>• 0.5% (v/v) Tween 20</li> <li>• 1 mM DTT</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ ZIKV NS5 RdRp</li> <li>○ WNV NS5 RdRp</li> <li>○ HCV NS5b RdRp</li> </ul>
<b>Tampón de Diálisis II</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 mM Tris-HCl pH 7.5-8</li> <li>• 150 mM NaCl</li> <li>• 50 % Glicerol</li> <li>• 0.5 % (v/v) Tween 20</li> <li>• 1 mM DTT</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ SARS-CoV-2 Nsp12 RdRp, Nsp7, Nsp8, Nsp7L8</li> </ul>

<b>Tampón de Diálisis III</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 mM Tris-HCl pH 7.5-8</li> <li>• 100 mM NaCl</li> <li>• 10 % Glicerol</li> <li>• 1 mM EDTA</li> <li>• 1 mM DTT</li> </ul>	○ FMDV 3D pol RdRp
-------------------------------	--	--------------------

## 2. Métodos

### 2.1 Clonaje y mutagénesis dirigida

#### 2.1.1 Virus del Zika

##### a) Clonaje del dominio RdRp de ZIKV NS5 en el plásmido pET16b

Para la realización de este proceso, el dominio polimerasa ARN dependiente de ARN (RdRp) de la proteína ZIKV NS5 se clonó en el plásmido de expresión pET16b entre las dianas de corte de *NdeI* y *XhoI* mediante *Gibson Assembly* (Gibson, 2011).

Con este fin, se realizó una reacción de PCR utilizando el vector pET16b como molde con los componentes y condiciones experimentales indicadas en las **Tabla 4** y **Tabla 5**, respectivamente, utilizando los oligonucleótidos NS5 short\_pET16\_Fw y NS5\_pET16\_rv (**Tabla 1**). Por otro lado, se amplificó el dominio RdRp (que abarca los residuos de aminoácidos 275–903 de la proteína NS5) del plásmido pcDNA ZIKV. La amplificación por PCR fue similar a la descrita anteriormente, pero utilizando los cebadores específicos NS5 short\_pET16\_Fw y NS5\_pET16\_rv (**Tabla 1**).

Ambos productos de PCR fueron purificados con el kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean up* (Macherey Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras este proceso, el vector y el inserto se mezclaron en presencia de  $2\times$  *Gibson Assembly Master Mix* (New England Biolabs) utilizando las concentraciones y condiciones mostradas en las **Tabla 7** y **Tabla 8** respectivamente. El producto ensamblado resultante, se transformó mediante electroporación con el aparato *Bio-Rad Gene Pulser II Electroporator* dentro de *E. coli* BL21(DE3)-pRIL electrocompetentes, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente las bacterias se sembraron en placas de agar LB con Ampicilina (para la selección de las bacterias que contienen el plásmido pET16b) y Cloranfenicol (antibiótico al que son resistentes las bacterias que contienen el plásmido pRIL), y se incubaron a 37° C toda la noche.

Al día siguiente, se aislaron y cultivaron 4 colonias independientes de las que posteriormente se extrajo su ADN plasmídico mediante el uso del kit *NucleoSpin® Plasmid EasyPure kit* (Macherey Nagel) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Este ADN fue secuenciado para comprobar el éxito del clonaje. El resto de cultivo no utilizado para la extracción de ADN se guardó a -80°C en glicerol al 20% para su conservación.

El plásmido resultante, llamado **pET16b-ZIKV-NS5RdRp**, codifica el dominio RdRp de la proteína ZIKV NS5 fusionado a un tracto de 17 aminoácidos (secuencia HHHHHHHHHSSGHIEG) en el extremo N-terminal. Esta región es empleada para la purificación de la proteína recombinante por afinidad utilizando resina HisPur™ Ni-NTA. El peso molecular aproximado de esta proteína es de 75 kDa.

b) Mutagénesis del plásmido pET16b-ZIKV-NS5RdRp para la generación de un mutante catalíticamente inactivo

Para crear un mutante catalíticamente inactivo de la ZIKV NS5 RdRp, se realizó una PCR mutagénica utilizando como molde el plásmido pET16b-ZIKV-NS5RdRp y los oligonucleótidos NS5\_GNN\_Fw y NS5\_GNN\_rv (**Tabla 1**). Los componentes y condiciones experimentales de esta PCR se describen en las **Tabla 4** y **Tabla 6** respectivamente. El producto de la mutagénesis fue purificado mediante el kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean up* (Macherey Nagel) y se utilizó para transformar bacterias *E. coli* BL21(DE3)-pRIL electrocompetentes. El proceso de transformación y posterior comprobación del éxito de la mutagénesis mediante secuenciación se realizó tal y como se describe en el apartado anterior. El plásmido resultante se denomina **pET16b-ZIKV-NS5RdRp-GNN**. Este plásmido codifica para la proteína ZIKV NS5-GNN RdRp, que contiene un par de mutaciones que dan lugar a los cambios D665N y D666N en dos de los aspárticos catalíticos de la enzima (Godoy et al., 2017).

c) Mutagénesis del plásmido pET16b-ZIKV-NS5RdRp para la generación de mutantes del bolsillo N.

Para la generación de los diferentes mutantes del bolsillo N, se tomó como molde el plásmido pET16b-ZIKV-NS5RdRp para realizar las PCR mutagénicas con los correspondientes oligonucleótidos que se describen a continuación. Los componentes y condiciones experimentales de esta PCR se describen en las **Tabla 4** y **Tabla 6** respectivamente.

- Mutante simple H713W: ZIKV\_NS5\_H713W\_Fw y ZIKV\_NS5\_H713W\_Rv.
- Mutante simple Y768A: ZIKV\_NS5\_Y768A\_Fw y ZIKV\_NS5\_Y768A\_Rv.
- Mutante simple Y768W: ZIKV\_NS5\_Y768W\_Fw y ZIKV\_NS5\_Y768W\_Rv.
- Mutante simple Y798F: ZIKV\_NS5\_Y798F\_Fw y ZIKV\_NS5\_Y798F\_Rv.
- Mutante simple T796 : ZIKV\_NS5\_T796\_Fw y ZIKV\_NS5\_T796\_Rv.
- Mutante doble H713A- Y768A: ZIKV\_NS5\_H713A\_Fw y ZIKV\_NS5\_H713A\_Rv con ZIKV\_NS5\_Y768A\_Fw y ZIKV\_NS5\_Y768A\_Rv.
- Mutante doble H713A- Y768W: ZIKV\_NS5\_H713A\_Fw y ZIKV\_NS5\_H713A\_Rv con ZIKV\_NS5\_Y768W\_Fw y ZIKV\_NS5\_Y768W\_Rv.
- Mutante doble H713W- Y768W: ZIKV\_NS5\_H713W\_Fw y ZIKV\_NS5\_H713W\_Rv con ZIKV\_NS5\_Y768W\_Fw y ZIKV\_NS5\_Y768W\_Rv.

Los productos de la mutagénesis fueron purificados mediante el kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean up* (Macherey Nagel) y se utilizó para transformar bacterias *E. coli* BL21(DE3)-pRIL electrocompetentes. El proceso de transformación y posterior comprobación del éxito de la mutagénesis mediante secuenciación se realizó tal y como se describe en el apartado anterior.

## 2.1.2 **Virus del Nilo Occidental**

a) Clonaje del dominio RdRp de WNV NS5 en el plásmido pET16b

Este procedimiento se realizó a partir de la región NS5 del virus del Nilo occidental correspondiente al aislado Serbia Novi Sad/12 (Petrović et al., 2013). Este gen codifica una proteína de 905 aminoácidos con actividad metiltransferasa y RdRp. La región RdRp se extiende entre los aminoácidos 273 y 905.

Antes del clonaje de este dominio en el plásmido pET16b, se eliminó una diana de restricción *Xho*I (ctcgag) presente en la región codificante para el dominio RdRp, puesto que la enzima de restricción fue empleada en el clonaje.

Por lo tanto, se realizó una PCR mutagénica utilizando los iniciadores WNV\_ *Xho*I\_rm\_Fw y WNV\_ *Xho*I\_rm\_rv (**Tabla 1**) y el plásmido pUC-NS5, manteniendo las condiciones recogidas en la **Tabla 4** y la **Tabla 6** para alterar este sitio de reconocimiento de *Xho*I. El producto de PCR se purificó y transformó como se describe apartado 2.1.1 a).

A partir de las bacterias obtenidas, se realizaron cultivos celulares para la extracción del ADN plasmídico y su secuenciación para comprobar el éxito del clonaje.

El resultado fue un plásmido pUC-NS5 con una mutación sinónima C→A en la tercera posición de diana de la secuencia ctcgag, que altera la región de reconocimiento de *Xho*I. Este plásmido se denominó **pUC-NS5(A)**.

Posteriormente, el dominio RdRp de WNV presente en el plásmido pUC-NS5(A), se clonó en el plásmido de expresión pET16b entre los sitios de *Nde*I y *Xho*I. Para ello, en primer lugar, el plásmido pUC-NS5(A) se utilizó como molde de una PCR en la que se utilizaron los iniciadores WNV\_NS5B\_pET16\_Fw, WNV\_NS5B\_pET16\_rv (**Tabla 1**) utilizando las condiciones mostradas en la **Tabla 4** y la **Tabla 5**. El producto de amplificación (inserto) se purificó como se describe anteriormente.

Por otro lado, el plásmido pET16b se digirió con las enzimas *Nde*I y *Xho*I (10 Unidades de cada una por cada microgramo de ADN) durante 2 h a 37°C. El producto total de digestión se cargó en un gel de agarosa (0,8%) corrido a 100 V durante 30 min. El plásmido digerido (vector) se purificó de la agarosa mediante el kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* siguiendo las instrucciones del fabricante.

Finalmente, el inserto se ligó con 100 ng de vector manteniendo una ratio molar de 7:1 (inserto:vector). La reacción se llevó a cabo en presencia de la enzima T4 Ligasa a 16°C durante toda la noche. 2µL de la reacción de ligación se transformaron en bacterias electrocompetentes tal y como se ha descrito previamente. A partir de colonias aisladas de las bacterias obtenidas, se realizaron cultivos celulares para la extracción del ADN plasmídico y su posterior secuenciación para comprobar el éxito del clonaje.

El resto de cultivo no utilizado para aislar el ADN se guardó a -80°C en glicerol al 20% para su conservación.

El plásmido resultante se denomina **pET16b-WNV-NS5RdRp**, y codifica para el dominio RdRp de la proteína NS5 de WNV unido a un tracto de 17 aminoácidos (secuencia HHHHHHHHHSSGHIEG) en el extremo N-terminal. Esta región es empleada para la purificación de la proteína recombinante por afinidad utilizando resina HisPur™ Ni-NTA. El peso molecular aproximado de esta proteína es de 73 kDa.

#### b) Obtención de un mutante catalíticamente inactivo para WNV NS5 RdRp

La creación del mutante catalíticamente inactivo para WNV NS5 RdRp, se llevó a cabo mediante la mutagénesis dirigida del plásmido pET16b-WNV-NS5RdRp. Esta mutagénesis, tiene como objetivo generar una variante con los cambios en las

posiciones D668A y D669A, los cuales corresponden a los aspárticos catalíticos del motivo C de WNV NS5 RdRp (Malet et al., 2007).

Este proceso se realizó tal y como se describe en el apartado 2.1.1 b), utilizando en la PCR mutagénica las condiciones y componentes generales mostrados en las **Tabla 4** y **Tabla 6**, el ADN del plásmido pET16b-WNV-NS5RdRp y los oligonucleótidos WNV GAA Fw y WNV GAA rv (**Tabla 1**). El resultado de este proceso es un plásmido denominado **pET16b-WNV-NS5RdRp-GAA**, el cual codifica para la polimerasa del Virus del Nilo Occidental catalíticamente inactiva.

### 2.1.3 **Virus SARS-CoV-2**

#### a) Obtención de un mutante catalíticamente inactivo para la nsp12 de SARS-CoV-2

La obtención de un mutante catalíticamente inactivo de nsp12, se realizó mediante PCR mutagénica con las condiciones y componentes generales mostrados en la **Tabla 4** y la **Tabla 6**, utilizando como molde el plásmido **pET28a-SARS-CoV2-nsp12** y los iniciadores nsp12\_D760-761\_A\_Fw y nsp12\_D760-761\_A\_rv (**Tabla 1**).

Los procedimientos experimentales subsiguientes hasta la comprobación del éxito de la mutagénesis mediante secuenciación se realizaron tal y como se describe en apartado 2.1.1 b). El plásmido resultante, denominado **pET28a-SARS-CoV2-NSP12-GAA**, codifica para una proteína nsp12 que contiene el cambio D→A en las posiciones 760 y 761, catalíticos del motivo RdRp de la proteína.

### 2.1.4 **Virus de Hepatitis C**

#### a) Clonaje de la proteína HCV NS5b en el plásmido pET28a

Este proceso se llevó a cabo mediante recombinación *in vitro* por la técnica *Gibson Assembly* (Gibson, 2011). El plásmido pET28a, se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos pET28a\_Fw y pET28a\_rv (**Tabla 1**), con los componentes y condiciones experimentales indicadas en la **Tabla 4** y **Tabla 5**, respectivamente, obteniéndose de este modo el vector empleado en la reacción de ensamblaje.

El inserto de esta reacción se obtuvo por PCR, utilizando el plásmido Jc1FLAG2(p7-nsGluc2A) como molde, y los oligonucleótidos NS5B\_HCV\_Fw and NS5B\_Δ21\_HCV\_rv (**Tabla 1**) como iniciadores. Para esta reacción de amplificación se emplearon las condiciones experimentales de la **Tabla 4** y la **Tabla 5**.

El vector y el inserto se ensamblaron tal y como se describe en el apartado 2.1.1 a). Tras el proceso de transformación y secuenciación de ADN, se confirmó la obtención de un plásmido denominado **pET28-HCV-NS5bΔ21**, codificante para la proteína HCV NS5b RdRp, la cual tiene una delección de los últimos 21 aminoácidos del extremo C terminal (NS5bΔ21), sustituidos por un tramo de 8 aminoácidos con la secuencia LEHHHHH. Este tramo de polihistidinas será empleado en la purificación de la enzima por cromatografía de afinidad. El peso molecular aproximado de esta proteína es de 65 kDa.

#### b) Obtención de un mutante catalíticamente inactivo para HCV NS5b RdRp

La obtención de un plásmido que codifica para la proteína catalíticamente inactiva NS5b de HCV, se realizó tal y como se describe en el apartado anterior, pero utilizando como molde en la reacción de amplificación por PCR del inserto el plásmido Jc1FLAG(p7-nsGluc2A) /GNN. Como resultado del proceso de recombinación *in vitro*, se obtuvo el

plásmido denominado **pET28-HCV-NS5bΔ21-GNN**, el cual codifica para la una polimerasa recombinante HCV NS5b RdRp catalíticamente inactiva.

### 2.1.5 Protocolos y componentes empleados en las reacciones de mutagénesis y amplificación de las polimerasas virales.

**Tabla 4:** Componentes necesarios para la reacción estándar de PCR de alta fidelidad con la polimerasa Phusion HF.

Componente	Concentración final /reacción
Tampón 5x Phusion HF	1x
10 mM dNTPs	200 mM
Oligonucleótidos del gen empleado*	0.25 mM
ADN plásmidico	1 pg-10 ng
Polimerasa Phusion HF	0.5 unidades
H <sub>2</sub> O desionizada estéril	Hasta 25 µl

\*Los oligonucleótidos empleados en las distintas reacciones se encuentran reflejados en la **Tabla 1**

**Tabla 5:** Condiciones de amplificación para la reacción estándar con Polimerasa Phusion HF.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
98°C	30 s	1
98°C	10 s	25-35
<u>45-72°C *</u>	20 s	
72°C	<u>15-30 s/kb*</u>	1
72°C	7 min	
4°C	∞	

\*Las diferencias entre las TM y el tiempo de extensión final dependen de los oligonucleótidos seleccionados y el fragmento amplificado respectivamente.

**Tabla 6:** Condiciones de amplificación para PCR mutagénica con Polimerasa Phusion HF.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
98°C	3 min	1
98°C	15 s	30
<u>51-54°C *</u>	20 s	
72°C	<u>4 min</u>	1
72°C	10 min	
4°C	∞	

\*Las diferencias entre las TM y el tiempo de extensión final dependen de los oligonucleótidos seleccionados y el fragmento amplificado respectivamente.

**Tabla 7:** Componentes necesarios para una reacción estándar de Gibson Assembly

Componente	2-3 fragmentos de ADN	4-6 fragmentos de ADN	Control positivo
Concentración de ADN	0.02-0.5 pmol (Xml)	0.2-1pmol	10 ml
Gibson Assembly master mix (2x)	10 ml	10 ml	10ml
H <sub>2</sub> O desionizada estéril	10-X ml	10-X ml	-
Volumen total	20 ml	20 ml	20 ml

**Tabla 8:** Condiciones estándar para el clonaje por el método Gibson Assembly

Fragmentos	2-3	4-6
Temperatura	50°C	
Tiempo	15 min	60 min

## 2.2 Expresión de las polimerasas virales

### 2.2.1 ZIKV NS5 RdRp

Para la expresión de la ZIKV NS5 RdRp, células electrocompetentes de *E. coli* BL21(DE3)-pRIL), se transformaron con el plásmido **pET16b-ZIKV-NS5RdRp** y se sembraron en placas de LB-agar con Amp y Chlor (**Tabla 2**). Al día siguiente, una colonia aislada se inoculó en 10 ml de LB en presencia de Amp y Chlor (**Tabla 2**). Este cultivo se incubó a 37°C con agitación constante a 180 rpm (Incubador con agitación orbital *SH MAXI R*, Controltecnica) durante toda la noche.

Posteriormente, 7 ml de este cultivo se inoculan en 200 ml de medio líquido LB con Amp y Chlor (**Tabla 2**) y se incubaron a 37°C con agitación continua a 180 rpm, hasta alcanzar una DO aproximada de 0.6 medida a 600 nm (Thermo Scientific™ Espectrofotómetro *GENESYS™ 10S Vis*). En ese momento, se indujo la sobreexpresión de proteínas del cultivo bacteriano mediante la adición de 500 µM de IPTG. Además, se añadió 50 µM MgCl<sub>2</sub> y 50 µM ZnSO<sub>4</sub>. El cultivo se incubó entonces durante 24 h a 30 °C y agitación de 180 rpm. Tras este periodo, las células se aislaron por centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos (Centrifuga 5810 R rotor FA-45-6-30, *Eppendorf*). El sobrenadante se descartó y el sedimento de células se guardó a -80°C para su posterior purificación.

Este mismo procedimiento se realizó para la expresión de la proteína ZIKV NS5 GNN RdRp, utilizando como punto de partida células *E. coli* BL21(DE3)-pRIL transformadas con el plásmido **pET16b-ZIKV-NS5RdRp-GNN** como se describe anteriormente.

Los mutantes simples y dobles fueron expresados siguiendo el protocolo descrito para ZIKV NS5 WT.

### 2.2.2 WNV NS5 RdRp

La sobreexpresión de proteínas y posterior precipitación de bacterias correspondiente a las células transformadas con los plásmidos **pET16b-WNV-NS5RdRp** y **pET16b-WNV-NS5RdRp-GAA** se realizó tal y como se describe en el apartado 2.2.1.

### 2.2.3 SARS-CoV-2 nsp12 RdRp, nsp7, nsp8, nsp7-8, nsp7L8

El crecimiento e inducción de las proteínas codificadas por los plásmidos **pET28a-SARS-CoV2-NSP7**, **pET28a-SARS-CoV2-NSP8**, **pET28a-SARS-CoV2-NSP7L8** y **pET28a-SARS-CoV2-NSP7-8**, **pET28a-SARS-CoV2-NSP12** y **pET28a-SARS-CoV2-NSP12-GNN**, se llevó a cabo de manera similar a como describe el apartado 2.2.1, con las siguientes modificaciones: Tanto las placas de LB-agar, como los medios de cultivo, incorporaban los antibióticos Kan y Chlor en las concentraciones indicadas en la **Tabla 2**.

Además, no se añade 50  $\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$  y 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  y la incubación realizada durante el proceso de sobreexpresión de las proteínas se lleva a cabo en incubación a 180 rpm de agitación durante 24 h a 18  $^\circ\text{C}$ .

### 2.2.4 HCV NS5b RdRp

La sobreexpresión de proteínas y posterior precipitación de bacterias correspondiente a las células transformadas con los plásmidos **pET28-HCV NS5b $\Delta$ 21** y **pET28-HCV NS5b $\Delta$ 21-GNN**, se realizó de manera similar a como describe en el apartado 2.2.1. En este caso, tanto las placas de LB-agar, como los medios de cultivo, incorporaban los antibióticos Kan y Chlor en las concentraciones indicadas en la **Tabla 2**.

### 2.2.5 FMDV 3D RdRp

Para la sobreexpresión de la proteína 3D pol del virus de la fiebre aftosa, se seleccionaron colonias de bacterias *E. coli* BL21(DE3) transformadas con los plásmidos pET-28a-3Dpol y pET-28aD338A y, crecidas en placas de LB-agar con Kan y Chlor (**Tabla 2**). Al día siguiente, se inocularon en 10 mL de LB en presencia de Kan y se incubó a 37 $^\circ\text{C}$  con agitación constante a 180 rpm durante toda la noche.

Posteriormente, el volumen total de este preinóculo se añadió a 200 ml de medio líquido LB conteniendo Kan y Chlor (**Tabla 2**).

Las bacterias se incubaron a 37 $^\circ\text{C}$  con agitación continua a 180 rpm, hasta alcanzar una DO aproximada de 1 medida a 600 nm. En ese momento de fase exponencial de crecimiento bacteriano, se añadió IPTG a una concentración final de 500  $\mu\text{M}$ . Los cultivos se crecieron entonces durante 2.5 horas más. Tras este periodo de incubación, las células se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó y el sedimento de células se guardó a -80 $^\circ\text{C}$  para su posterior purificación.

## 2.3 Purificación de las polimerasas virales

El proceso completo de purificación de todas las proteínas utilizadas durante esta tesis doctoral se realizó en cámara fría a 4 $^\circ\text{C}$ .

### 2.3.1 ZIKV NS5 RdRp

Los sedimentos bacterianos recuperados de la inducción en 200 ml de LB, se resuspendieron en 20 ml de Tampón de Lisis (**Tabla 3**) en presencia de 200  $\mu\text{M}$  PMSF. Las muestras se sonicaron introducidas en un baño de hielo durante 5 ciclos de 20s alternando con 5 ciclos en pausa de 10s. Este proceso se llevó a cabo con el aparato *Qsonica Sonicator Q125* (Qsonica) utilizando una amplitud del 90%. La fracción soluble se recuperó mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 30 min a 4  $^\circ\text{C}$ , (Centrifuga 5810 R rotor FA-45-6-30, Eppendorf). El sobrenadante resultante de este proceso se

mezcló con 800µL de la resina HisPur™ Ni-NTA, previamente equilibrada con 20 volúmenes de Tampón de Lavado (**Tabla 3**).

El lisado se incubó en *batch* durante 1h con agitación suave utilizando el aparato Multi Bio RS-24 (Biosan), ello permite la interacción del tracto de histidinas de la proteína recombinante con el níquel de la resina.

Tras este proceso, se deja reposar la muestra y se elimina el líquido por decantación. La resina se lava con 20 volúmenes de Tampón de Lavado (**Tabla 3**) y se vierte sobre una columna vacía (*Poly-Prepâ Chromatography Columns* (Bio-Rad Laboratories)). Una vez que la resina se ha compactado por decantación, se realizan tres lavados sucesivos utilizando 20 volúmenes de Tampón de Lavado conteniendo 25 mM imidazol, 20 volúmenes de Tampón de Lavado conteniendo 35 mM imidazol y 5 volúmenes de Tampón de Lavado conteniendo 50 mM imidazol.

Posteriormente, la muestra se eluyó en presencia de concentraciones crecientes de imidazol, utilizando en cada caso 1 volumen de columna de Tampón de Lavado conteniendo de 100 a 250 mM imidazol, recogiendo el volumen eluido de cada una de las fracciones. Tras el gradiente, se realiza una elución final con 400 mM de imidazol en 1 volumen de columna de Tampón de Lavado.

La presencia de la proteína recombinante en cada una de las fracciones recogidas se analizó mediante de 0,1% SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Las fracciones que contienen la proteína pura (posterior a la confirmación por tinción con azul de Coomassie), se dializaron durante un mínimo de 3 horas a 4°C con una membrana de 12.000-14.000 MWCO (VISKING *dialysis tubing*, MWCO 12 000 - 14 000 SERVA (Electrophoresis GmbH) frente a 200 volúmenes del Tampón de Diálisis I (**Tabla 3**). Finalmente, la proteína se recuperó se y almacenó a -80 °C para su posterior uso.

La cantidad de proteína obtenida tras la purificación se cuantificó mediante absorbancia medida a 280 nm con NanoDrop™ One (Thermo Scientific™), utilizando para su cálculo un valor de aproximado  $\epsilon=166.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Este valor teórico, se calculó a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante obtenida con ayuda de la herramienta de acceso libre en internet *Expasy* (<https://web.expasy.org/protparam/>). Esta proteína se denominó ZIKV NS5-WT RdRp.

La purificación de la variante de ZIKV NS5 RdRp que contiene los cambios D665N y D666N se realizó como se describe en el párrafo anterior. La proteína resultante de este proceso se denominó ZIKV NS5-GNN RdRp.

La purificación de los diferentes mutantes del bolsillo N, son purificados siguiendo el protocolo descrito para ZIKV NS5 WT. Las proteínas obtenidas se denominaron ZIKV NS5-H713W RdRp, ZIKV NS5-Y768A RdRp, ZIKV NS5-Y768W RdRp, ZIKV NS5-Y798F RdRp, ZIKV NS5-T796 RdRp, ZIKV NS5-H713A-Y768A RdRp, ZIKV NS5-H713A-Y768A RdRp, ZIKV NS5-H713W-Y768W RdRp.

### 2.3.2 WNV NS5 RdRp

El proceso de purificación de las enzimas codificadas por los plásmidos **pET16b-WNV-NS5RdRp** y **pET16b-WNV-NS5RdRp-GAA**, se llevó a cabo como se describe en el apartado anterior. En este caso, para el cálculo mediante absorbancia de la cantidad de proteína recombinante purificada, se utilizó un valor aproximado de  $\epsilon = 168.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , calculado teóricamente como en el caso anterior.

Las proteínas recombinantes obtenidas se denominaron WNV NS5-WT RdRp y WNV NS5-GNN RdRp, respectivamente.

### 2.3.3 SARS-CoV-2 nsp12 RdRp, nsp7, nsp8, nsp7-8, nsp7L8

La purificación de todas las proteínas recombinantes de SARS-CoV2 se realizó siguiendo el protocolo descrito para ZIKV NS5 RdRp con las siguientes modificaciones:

El sedimento bacteriano resuspendido en Tampón de Lisis (**Tabla 3**) y se sonicó en baño de hielo durante 5 ciclos de 20s alternando con 5 ciclos en pausa de 30s. Se emplea una amplitud del 80% en un *Qsonica Sonicator Q125 (Qsonica)*.

Además, una vez que la resina se hubo compactado por decantación, se realizaron los lavados sucesivos de 20 volúmenes de Tampón de Lavado conteniendo 25 mM imidazol y 20 volúmenes de Tampón de Lavado conteniendo 35 mM imidazol. Adicionalmente, la resina se sometió a lavados sucesivos de 1 volumen de columna de Tampón de Lavado con concentraciones crecientes de imidazol: 50mM, 60mM, 70mM, 80mM, 90mM, 100mM, 400mM. Cada una de estas fracciones se recogieron para su posterior análisis.

Aquellas fracciones que tras ser analizadas mediante SDS-PAGE contenían la proteína pura, se dializaron durante al menos 3 horas a 4 ° en presencia de 200 volúmenes de Tampón de Diálisis II (**Tabla 3**).

Las proteínas obtenidas se denominaron SARS-CoV-2 nsp12 RdRp y SARS-CoV-2 nsp7, nsp8, nsp7-8, nsp7L8. Para el cálculo mediante absorbancia de la cantidad de cada una de las proteínas recombinantes purificadas, se utilizaron los valores aproximados de  $\epsilon = 5.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (**nsp7**),  $20.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (**nsp8**),  $25.400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (**nsp7L8**),  $25.300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (**nsp7-8**) y  $138.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (**nsp12**). Estos valores se obtuvieron tal y como se describe en el apartado 2.3.1 de este capítulo.

### 2.3.4 HCV NS5b RdRp

La purificación de las polimerasas recombinantes codificadas por los plásmidos **pET28-HCV NS5bΔ21** y **pET28-HCV NS5bΔ21-GNN**, se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo que el empleado en la purificación de la proteína ZIKV NS5 RdRp.

El cálculo de la cantidad de proteína recombinante purificada se realizó mediante absorbancia. Se utilizó un valor aproximado de  $\epsilon = 81.930 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , calculado como se indica en el apartado 2.3.1 de este capítulo.

Las proteínas recombinantes obtenidas se denominaron HCV NS5b-WT RdRp y HCV NS5b-GNN RdRp, respectivamente.

### 2.3.5 FMDV 3D pol RdRp

La purificación de FMDV 3D-WT pol RdRp y FMDV 3D-D338A pol RdRp se realizó en el laboratorio modificando ligeramente el protocolo descrito anteriormente (Ferrer-Orta et al., 2004)

El sedimento de bacterias obtenido tal y como se describe en el apartado 2.2.5 del capítulo Métodos se resuspendió en 20 mL de Tampón de Lisis II (**Tabla 3**) incluyendo 0,1 mg/ml lisozima y 200  $\mu$ M PMSF. Esta muestra se sonicó en hielo durante 4 ciclos de 30s alternando con 4 ciclos en pausa de 30s con una amplitud del 70% utilizando un aparato *Qsonica Sonicator Q125* (Qsonica).

La fracción soluble se recuperó mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se pasa a través de 800 $\mu$ L de resina HisPur™ Ni-NTA que había sido previamente equilibrada en Tampón de Lisis II. Tras este proceso, se deja reposar la muestra y se elimina el líquido por decantación. La resina se lava con 20 volúmenes de Tampón de Lisis II y se vierte sobre una columna vacía *Poly-Prepâ Chromatography Columns* (Bio-Rad Laboratories). Se continúan los lavados con 10 volúmenes de Tampón de lavado II conteniendo 25 mM imidazol.

Posteriormente, la muestra se eluyó en presencia de concentraciones crecientes de imidazol, utilizando en cada caso 1 volumen de columna de Tampón de Lavado II conteniendo de 50 a 500 mM imidazol, recogiendo el volumen eluido de cada una de las fracciones.

El grado de pureza de proteína purificada en cada fracción se evaluó por SDS-PAGE y posterior tinción con azul de *Coomassie*. Aquellas que contenían la proteína pura se juntaron y se dializan durante 3 horas a 4°C frente a 200 volúmenes del Tampón de Diálisis III (**Tabla 3**).

La proteína purificada se distribuyó en alícuotas y se congeló a -80 °C. La concentración de proteína se determinó mediante por absorbancia medida a 280 nm tal y como se describe en el apartado 2.3.1. de este capítulo. En este caso, se utilizó un valor teórico de  $\epsilon = 51.700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  calculado como se ha indicado anteriormente.

## 2.4 Ensayo de fluorescencia basado en la actividad polimerasa a tiempo real

Para la detección de la síntesis de ARNbc por las diferentes RdRp, se estableció un ensayo de fluorescencia medida a tiempo real. El desarrollo de esta técnica es una adaptación un método que han sido descrito previamente para la detección de ADN sintetizado por PrimPol humana (Agudo, Calvo, Martinez-Jimenez, & Blanco, 2017)

El ensayo desarrollado en esta Tesis registra la polimerización de ARNbc empleando, como molde de la reacción, un ARN adaptado a las características de cada polimerasa. Adicionalmente, puede añadirse un iniciador de la reacción de polimerización en el caso de que lo precise la enzima. La detección de la actividad por aumento de fluorescencia se basa en la alta afinidad que tiene el colorante fluorescente por el ARN de doble cadena (ARNbc).

Durante la reacción se producirá la unión del fluoróforo al ARNbc de nueva síntesis. Esta unión produce la excitación, y posterior emisión, de fluorescencia por parte del SYTO 9®. Esta puede ser monitorizada utilizando un fluorímetro mediante el uso de filtros de excitación y emisión de 485 y 520 nm, respectivamente. La cantidad de fluorescencia medida es proporcional a la cantidad de ARN formado, y, por lo tanto, a la actividad polimerasa de la enzima.

Las reacciones se llevaron a cabo en placas negras de 96 pocillos (*FluoroNunc™*, *Nunc™*) de fondo plano, adaptadas para medir fluorescencia.

En todos los experimentos realizados, se añadió un control negativo en ausencia de enzima para evaluar la fluorescencia basal de los componentes de la mezcla de reacción en cada ensayo.

#### **2.4.1 ZIKV NS5 RdRp**

##### **a) Puesta a punto general del método**

Para llevar a cabo la reacción con las RdRp recombinantes de ZIKV se empleó un molde homopolimérico de ácido poliuridílico (Poli-U) de 300 residuos de media de longitud y ATP como sustrato. La reacción estándar se realizó en 50 µL conteniendo: tampón 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 2,5 mM MnCl<sub>2</sub>, 500 µM ATP, 20 µg/mL poli-U, 0,1 mg/mL BSA, 5 mM DTT y 0,25 µM SYTO 9®. El ensayo se inició con la incorporación de 1 µL de proteína ZIKV RdRp (200-300 nM).

La fluorescencia se monitorizó a 30°C, durante un tiempo variable dependiendo de la información que se quisiera extraer de cada ensayo. La actividad de polimerización se obtuvo a partir de los datos de fluorescencia medidos durante los 10 minutos posteriores a los primeros 5 minutos de reacción.

Las variaciones en este ensayo, como por ejemplo el uso de diferentes concentraciones de reactivos y/o la presencia de compuestos, se indican específicamente en el apartado correspondiente del capítulo Resultados.

Para la representación gráfica de los datos obtenidos se restó el valor de fluorescencia en el tiempo 0 de reacción de cada uno de los valores medidos durante el ensayo. Los resultados fueron expresados como media ± desviación estándar, calculados con el programa informático Excel (Microsoft). En el capítulo Resultados, el número de repeticiones de cada experimento se indica en la leyenda de la figura correspondiente al experimento.

##### **b) Determinación de la $K_M$ y la $V_{max}$ de la enzima**

Para determinar las constantes cinéticas  $K_M$  y  $V_{max}$  de ZIKV NS5 RdRp para el poli-U en el ensayo de fluorescencia, se llevaron a cabo reacciones estándar utilizando concentraciones crecientes de molde (0,5 a 50 µg/ml) en presencia de 500 µM ATP. Las constantes cinéticas para el ATP se obtuvieron a partir de ensayos en presencia de concentraciones crecientes (200-2250 µM) de este nucleótido y usando 3 µg/mL de poli-U.

A partir de los datos obtenidos, se calculó la velocidad de reacción, medida como incremento de fluorescencia/tiempo, en cada experimento. El análisis de las constantes cinéticas se realizó, a partir de los datos de velocidad, mediante regresión no lineal, utilizando el programa informático *SigmaPlot 11.0* (Systat Software Inc).

c) Búsqueda de inhibidores de ZIKV NS5 RdRp en las quimiotecas con actividad antikineto-plástica.

Se llevaron a cabo ensayos de actividad medida por fluorescencia para la búsqueda de compuestos capaces de inhibir la ZIKV NS5 RdRp. Para ello, se realizó el cribado de la quimioteca formada por tres cajas de productos químicos (592 compuestos) con actividad antikineto-plástica y de acceso abierto, (Peña et al., 2015) proporcionada por la empresa *Glaxo SmithKline* (GSK).

Los principios activos fueron suministrados en placas de 96 pocillos de fondo plano listas para usar y realizar el análisis completo de la quimioteca por triplicado. Además, cada placa contiene pocillos suficientes para realizar 3 controles positivos de actividad en presencia de DMSO (utilizado como diluyente de todos los compuestos con potencial inhibitorio analizados durante esta tesis doctoral) y 3 controles negativos realizados en ausencia de polimerasa. Cada pocillo de placas contiene 0.5  $\mu\text{L}$  de cada producto químico (10 mM utilizando DMSO como diluyente).

El ensayo se inició mediante la adición de 49.5  $\mu\text{L}$  de solución de reacción estándar (la cual, en este caso, contiene 250 nM de la enzima) a la placa mediante el uso de una pipeta multicanal automática (*Eppendorf Research® plus*, 8 canales, variable 10-100ml).

El proceso de llenado de la placa de 96 pocillos tiene una duración estimada de un minuto. De este modo, el efecto en la inhibición, producido por la diferencia de tiempo en la adición de la solución estándar entre pocillos, fue insignificante puesto que el aumento de fluorescencia solo es detectable pasados 3-5 min.

d) Cálculo de la  $IC_{50}$  de los inhibidores de ZIKV NS5 RdRp

Para medir el efecto en la actividad polimerasa de los distintos compuestos utilizados durante esta tesis doctoral se calculó el valor  $IC_{50}$ . Este estimador indica la concentración necesaria para inhibir el 50% la actividad de la RdRp medida por fluorescencia.

El valor  $IC_{50}$  se determinó midiendo la actividad enzimática de la polimerasa frente a concentraciones crecientes de cada uno de los compuestos diluidos en DMSO. El valor de fluorescencia obtenido se comparó con un control positivo de la reacción en presencia de DMSO. El rango de concentraciones utilizado para el cálculo de las  $IC_{50}$  dependió de cada uno de los compuestos utilizados y se indica en el correspondiente apartado del capítulo Resultados.

Las curvas dosis-respuesta de los distintos compuestos, así como su posterior análisis, incluyendo el cálculo de la media  $\pm$  desviación estándar de cada valor, se realizaron utilizando el programa informático *SigmaPlot 11.0* (Systat Software Inc).

## 2.4.2 WNV NS5 RdRp

### a) Puesta a punto general del método

El procedimiento para la puesta a punto del método fluorimétrico para medir la actividad polimerasa de la WNV NS5-WT RdRp se realizó tal y como se describe para la polimerasa de ZIKV en el apartado 2.4.1 a) de este capítulo. En este caso, para iniciar la reacción estándar, se añadió 1  $\mu$ L de proteína purificada WNV NS5-WT RdRp (200-300 nM).

Las variaciones en este ensayo, como por ejemplo el uso de diferentes concentraciones de reactivos y/o la presencia de compuestos, se indican específicamente en el apartado correspondiente del capítulo Resultados.

### b) Determinación de la $K_M$ y la $V_{max}$ de la enzima

La determinación de los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  para el ensayo de actividad polimerasa de la proteína WNV NS5 RdRp se realizó de manera similar a como se describe en el apartado 2.4.1 párrafo b) de este capítulo.

En este caso, para el cálculo de las constantes correspondientes al molde, se realizaron reacciones estándar de polimerización utilizando concentraciones crecientes de poli-U (0.5- 30  $\mu$ g/ml) en presencia de 500  $\mu$ M ATP. Para el cálculo de las constantes del ATP, se realizaron ensayos en presencia de concentraciones crecientes de este nucleótido (200-1800  $\mu$ M) fijando la concentración de molde poli-U en 20 ng/ml.

Los valores de cinéticos de la enzima fueron calculados como se describe en el apartado 2.4.1 b) de este capítulo.

### c) Actividad polimerasa en presencia de inhibidores de amplio espectro

Posteriormente al ajuste de las condiciones estándar y el cálculo de los parámetros cinéticos de la enzima, se llevan a cabo diferentes ensayos en presencia de inhibidores tipo de polimerasas.

Para llevar a cabo las reacciones se emplean los componentes de la reacción estándar fijando la concentración de poli-U en 1ng/ml y 500mM de ATP, añadiendo diferentes concentraciones de los inhibidores; HEP (20 ng/ml), 3'dATP (10-100 mM).

Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado, durante 30 min a 30°C.

### d) Actividad en presencia de compuestos potencialmente inhibitorios

Se realizaron ensayos de actividad medida por fluorescencia para el cribado de la quimioteca de compuestos denominada FLA\_IQM. Esta quimioteca está formada por 98 compuestos sin actividad antiviral descrita.

El análisis de estos compuestos se realizó con las condiciones estándar de ensayo, incluyendo en cada pocillo 0.5ml de cada uno de compuestos químicos previamente disueltos en DMSO (concentración final 10 mM) e iniciando la reacción con la incorporación de 1  $\mu$ L de proteína WNV NS5 RdRp (200-300 nM).

El posible efecto inhibitorio de los compuestos se evaluó en presencia de un control positivo y negativo como se ha descrito en el apartado 2.4.1 de este capítulo y por triplicado.

El muestreo de la quimoteca se realizó en diferentes series, en las que se analizaban ocho compuestos cada vez por triplicado. De este modo, el posible efecto inhibitorio producido por la diferencia de tiempo en el llenado queda minimizado.

e) Cálculo de la IC<sub>50</sub> de los inhibidores de WNV NS5 RdRp

El cálculo de los valores de IC<sub>50</sub> de los compuestos con actividad inhibitoria de la actividad de WNV NS5 RdRp, se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado 2.4.1 d) de este capítulo.

### **2.4.3 SARS-CoV-2 nsp12 RdRp, nsp7, nsp8 y nsp7L8**

a) Puesta punto del ensayo con el complejo replicativo transcriptivo formado por SARS-CoV-2 nsp12 RdRp, nsp7, nsp8 y nsp7L8

La reacción de polimerización medida por fluorescencia de la actividad polimerasa de nsp12 RdRp, se realizó utilizando un complejo molde/iniciador de ARN, denominado SS-ARN, y ATP como sustrato. El ensayo estándar contenía tampón 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 μM ATP, 1 mM SS-ARN, 5mM DTT, 0.25 μM SYTO 9®, 1 μL nsp7 y 1 μL nsp128.

Los ensayos se realizaron en 50 μL, iniciando la reacción mediante la adición de 1 μL de nsp12. De este modo, la concentración de cada de una de las proteínas recombinantes, nsp7, nsp8 y nsp12, en el ensayo estándar fue ≈150 nM, ≈300 nM y ≈300 nM, respectivamente. La reacción se monitorizó en tiempo real durante 30 minutos a 37°C.

Las variaciones de este ensayo para estudiar el efecto en la actividad polimerasa del uso de distintas moléculas de ARN, la presencia de distintos componentes en la reacción, o el uso de las proteínas recombinantes nsp7L8 y nsp7-8 en la reacción, como posibles sustitutos de nsp7 y nsp8, se indican específicamente en el apartado correspondiente del capítulo Resultados. Para la representación gráfica de los datos obtenidos, se restó el valor de fluorescencia en el tiempo 0 de reacción de cada uno de los valores medidos durante el ensayo. El análisis y representación gráfica de los resultados se realizaron tal y como se indica en el apartado 2.4.1.a) de este capítulo.

### **2.4.4 HCV NS5b RdRp**

Los ensayos de actividad medida por fluorescencia de las proteínas HCV NS5b-WT RdRp y HCV NS5b-GNN RdRp se realizaron tal y como se describe para la polimerasa de ZIKV en el 2.4.1 a) de este capítulo.

La reacción se inició con la incorporación de 1 μL de enzima recombinante (200-300 nM) y la fluorescencia se monitorizó en tiempo real a 30°C durante 30 minutos.

La representación gráfica de estos resultados de actividad se realizó restando el valor de fluorescencia en el tiempo 0 de reacción de cada uno de los valores medidos durante el ensayo. La representación gráfica de los resultados obtenidos se realizó tal y como se indica en el apartado 2.4.1.a) de este capítulo.

### 2.4.5 FMDV 3D pol RdRp

Los ensayos para la detección de la actividad polimerasa de las proteínas FMDV 3D-WT pol RdRp y FMDV 3D-D338A pol RdRp se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones previamente descritas por (Arias et al., 2005; Ferrer-Orta et al., 2004). En estos experimentos se emplea como molde poli-A, UTP como sustrato y el péptido VPg1 como iniciador de la síntesis de ARNbc.

Para la detección de actividad polimerasa la reacción estándar está compuesta por: (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.6 mM MnCl<sub>2</sub>, 33 mM NaCl, 100 μM UTP, 40 μg/mL poli-A, 8% de glicerol (v v), 150 μM VPg1, 0.1 mg/mL BSA y 0.25 μM de SYTO 9®).

La reacción se inicia con la adición de 1 μL (1 μM) y la fluorescencia se monitorizó en tiempo real a 37 °C durante 30 minutos.

## 2.5 Ensayos de actividad basados en fluorescencia medidos a tiempo final

### 2.5.1 ZIKV NS5 RdRp

Las reacciones fluorométricas medidas a tiempo final se realizaron en placas de 96 pocillos negras de fondo plano. Se llevaron a cabo ensayos utilizando las condiciones de reacción estándar indicados en el apartado 2.4.1 párrafo a) de este capítulo en ausencia de SYTO 9®.

La reacción comenzó con la adición de 1 μL de enzima recombinante (200-300 nM) y se incubó a 30°C en estufa. Transcurridos 60 minutos, la reacción se detuvo añadiendo una solución de parada que contenía 25 mM EDTA y 0.25 mM SYTO 9®, o 4X SYBR Green II, dependiendo del ensayo realizado (el fluoróforo utilizado en cada ensayo se indica en el correspondiente apartado del capítulo Resultados). Esta mezcla se deja incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir la estabilización de los complejos formados entre el ARN y el fluoróforo.

Se llevó a cabo un control en paralelo para medir la fluorescencia basal y compararla con el aumento de fluorescencia producido por la actividad polimerasa. Para ello, se realizó un ensayo en el que la reacción de polimerización es detenida con 25 mM EDTA inmediatamente después de comenzar la reacción. Trascurrida una hora de incubación, se añadió a la muestra 0.25 mM SYTO 9®, o 4X SYBR Green II, tal y como se indica en el párrafo anterior.

Finalmente, la fluorescencia emitida se mide con el fluorímetro, (*Fluostar Optima*; BMG Labtech), empleando como filtros de excitación y emisión los de 485 y 520 nm, respectivamente.

### 2.5.2 WNV NS5 RdRp

En este caso, los ensayos medidos a tiempo final se resuelven en geles de agarosa al 1% con 1X *MIDORIGreen Advance*. Los ensayos de actividad se realizaron tal y como se describe en el 2.4.2 a) de este capítulo, incubando la reacción a 30 °C en una estufa. Transcurrido este tiempo, se añadió a la muestra tampón de carga azul (1X) de bromofenol/xileno-cianol. Los productos de reacción se resolvieron por electroforesis en tampón TBE a 90 V.

Una vez terminada la electroforesis, los geles se visualizaron con el aparato *ChemiDoc XRS* (BioRad).

Las variaciones en este ensayo, como, por ejemplo, la presencia o ausencia distintos reactivos, se indican específicamente en el apartado correspondiente del capítulo Resultados.

## **2.6 Ensayos de actividad basado en radioactividad medidos a tiempo final**

### **2.6.1 ZIKV NS5 RdRp y HCV NS5b RdRp**

Estos experimentos se basan en la síntesis de poliadenilato o poliguanidilato mediante la incorporación de residuos de adenosina-5'-monofosfato guanosina-5'-monofosfato, respectivamente. En estos ensayos se utiliza como molde la reacción una molécula de poli-U o de poli-C, en función de la necesidad de cuantificar la polimerización utilizando residuos de AMP, o GMP, respectivamente.

Los ensayos de radiactividad se realizaron en reacciones de 10  $\mu$ L conteniendo: tampón 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2.5 mM  $MnCl_2$ , 0.1 mg/ml BSA y 500  $\mu$ M ATP, 16 nM [ $\alpha$ - $^{32}P$ ] ATP y 20  $\mu$ g/ml poli-U; o GTP 500  $\mu$ M, 16 nM [ $\alpha$ - $^{32}P$ ] GTP y 20  $\mu$ g / mL poli-C.

Las reacciones se realizaron a 30  $^{\circ}C$  y se iniciaron mediante la adición de 1  $\mu$ L (1  $\mu$ M) de polimerasa recombinante de ZIKV o HCV. La reacción se detuvo en diferentes momentos mediante la adición de 2  $\mu$ L de tampón de carga de formamida (EDTA 10 mM, formamida al 95% (v / v), 0.03% (p/v), xileno-cianol).

Los productos de reacción se resolvieron mediante electroforesis al 20% en geles de poliacrilamida que contenían tampón TBE y urea 8 M, a 30V durante 120 min.

Los polinucleótidos sintetizados *de novo* se detectaron por autorradiografía o mediante el uso de una placa de fósforo fotoestimulable medida en un densitómetro *Phosphorimager BAS-1500* (Fujifilm) usando el programa Tina 2.09 (Raytest Isotopenmessgerate GmbH).

Los ensayos con nucleótidos radiactivos se llevaron a cabo en las Instalaciones del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CBMSO-CSIC) en el laboratorio del Profesor Luis Blanco Dávila.

## **2.7 Análisis de la idoneidad del ensayo de fluorescencia como plataforma de muestreo de alto rendimiento**

Para llevar a cabo este análisis, tanto para la ZIKV NS5 RdRp como para la WNV NS5 RdRp, se realizaron reacciones estándar tal y como se indican en los apartados 2.4.1.y 2.4.2. párrafos a) del capítulo Métodos, respectivamente, por triplicado y en diferentes días.

Como control negativo, se realizaron ensayos por triplicado y en diferentes días con las condiciones de reacción estándar en ausencia de  $MnCl_2$ . Los datos utilizados se analizaron según se indica en (J. H. Zhang, Chung, & Oldenburg, 1999) para calcular el valor  $Z'$ , que determina la idoneidad de un ensayo para poder ser incorporado en una plataforma de muestreo de alto rendimiento.

El valor  $Z'$  se calculó de la siguiente manera:

$$Z' = 1 - [(3DS_{c+} + 3DS_{c-}) / (media_{c+} - media_{c-})]$$

Donde:

$Z'$ : factor Z, determinante de la calidad de un ensayo HTS.

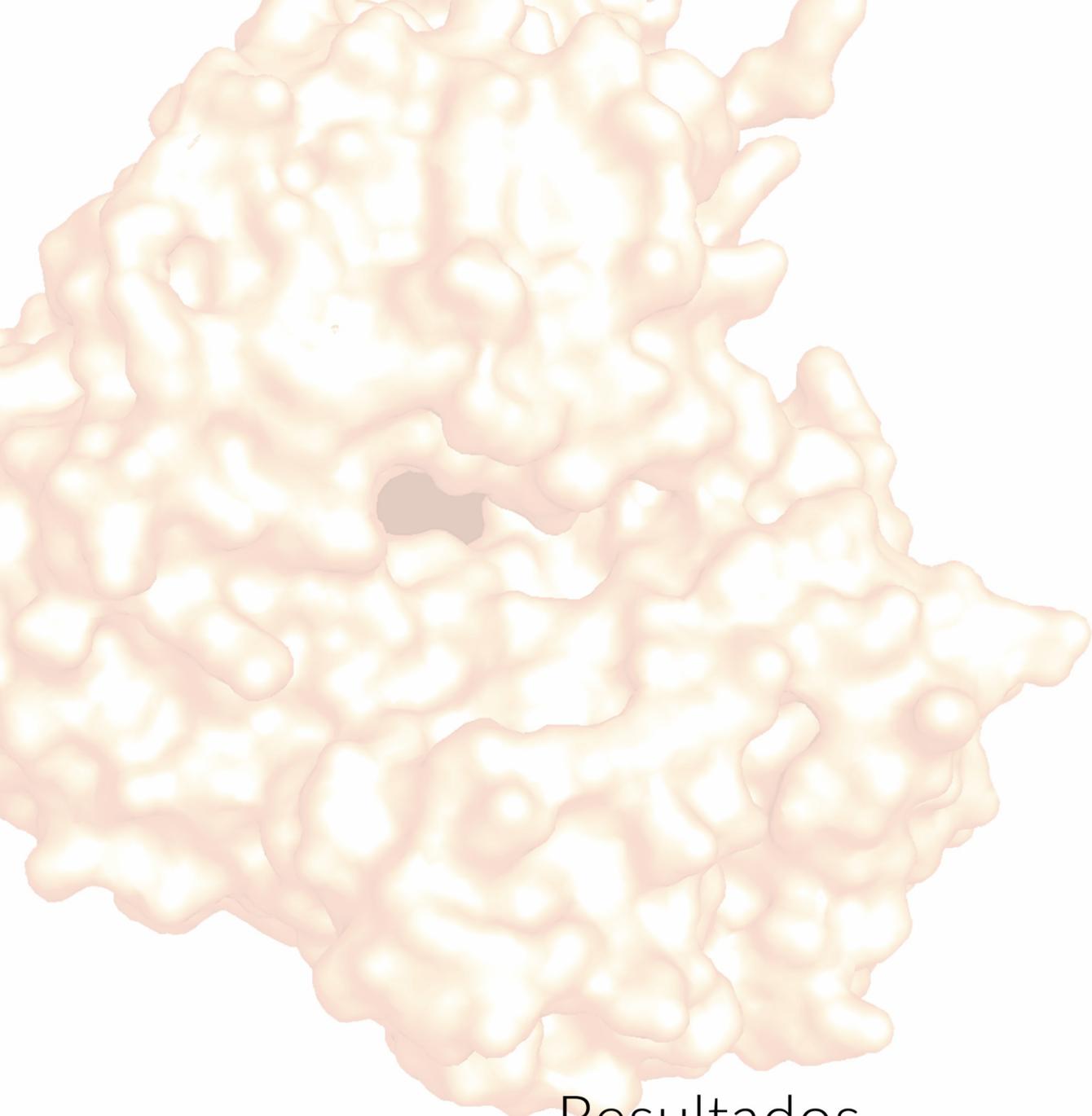
DS: es la desviación estándar.

$c+$ : es la actividad que se encuentra en un ensayo con condiciones estándar.

$c-$ : es la actividad no específica que se encuentra en un ensayo en ausencia del metal  $MnCl_2$ .

Dependiendo del valor  $Z'$  obtenido, se categoriza el nivel de idoneidad del ensayo siguiendo las indicaciones de (J. H. Zhang et al., 1999):

$Z'=1$	→ idoneidad ideal
$Z' = <1$ y $\geq 0,5$	→ idoneidad excelente
$Z' = <0,5$ y $\geq 0$	→ idoneidad baja
$Z'=0$	→ inadecuado



Resultados

## V. RESULTADOS

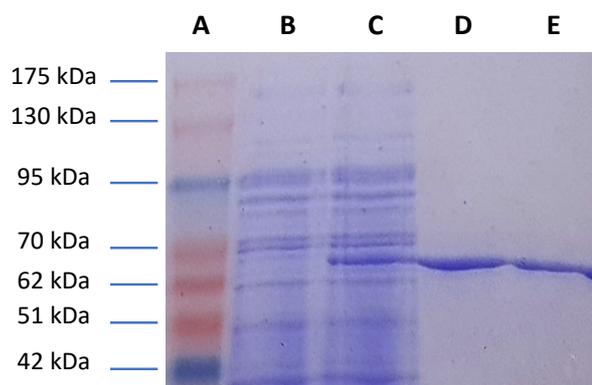
### 1. Virus del Zika

El virus del Zika (ZIKV) es un patógeno emergente que se ha asociado con un gran número de casos de enfermedad neurológica grave, incluido el síndrome de *Guillain-Barré* y la microcefalia. A pesar de su reciente establecimiento como un grave problema de salud pública mundial, no existen terapias autorizadas para controlar este virus. Por consiguiente, existe una necesidad urgente de desarrollar métodos para el cribado de alto rendimiento de agentes antivirales (Plourde & Bloch, 2016). Debido a las propiedades únicas de las RdRp virales que las hacen un potente objetivo terapéutico, estas proteínas son la base fundamental del sistema de fluorescencia presentado, capaz de identificar inhibidores virales.

La polimerasa de ZIKV fue expresada y purificada para caracterizar su actividad y enfrentarla a diferentes compuestos con potencial inhibitorio.

#### 1.1 Purificación y caracterización bioquímica de la ZIKV NS5 RdRp

El dominio RdRp de la proteína NS5 de ZIKV (proteína ZIKV NS5-WT RdRp), y su correspondiente mutante catalíticamente inactivo (proteína ZIKV NS5-GNN RdRp), fueron expresados y purificados como se describe en los apartados 2.2 y 2.3 del capítulo Materiales y Métodos. La pureza de las proteínas obtenidas fue aproximadamente de un 95% a juzgar por los resultados visibles en gel de acrilamida SDS-PAGE y la tinción con Azul Brillante de *Coomassie* R-250 (**Figura 14**).



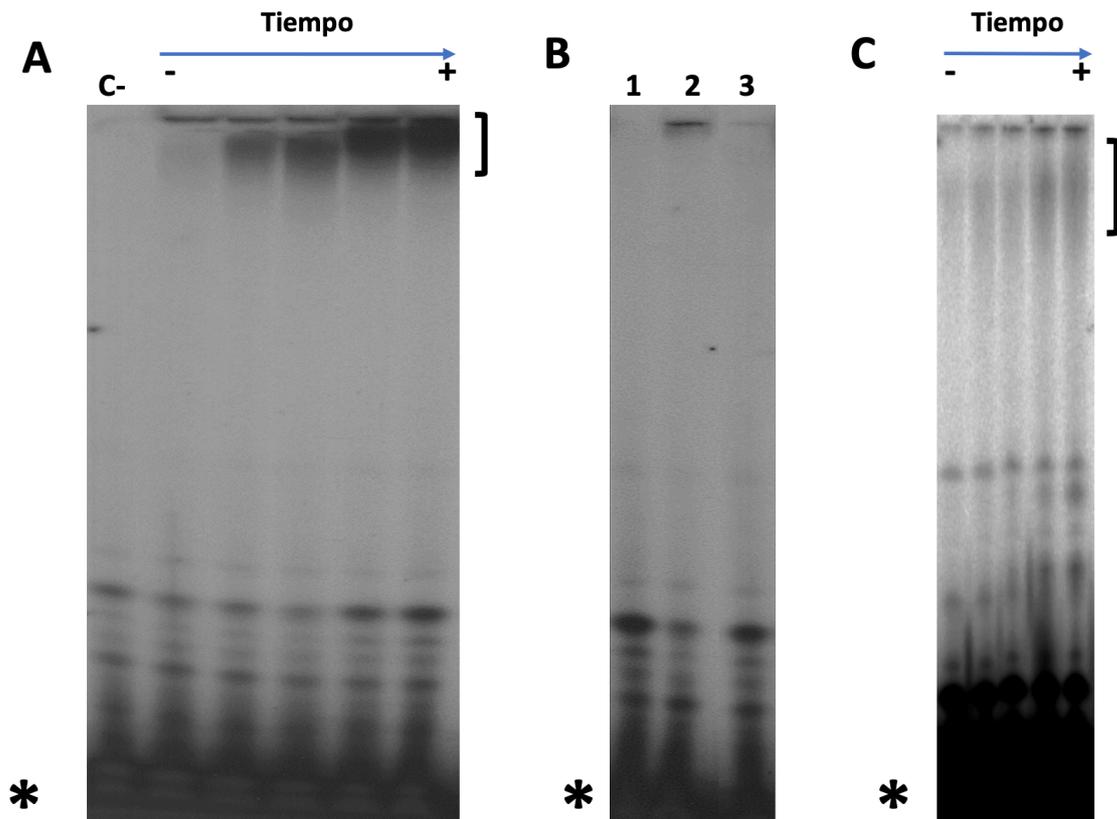
**Figura 14: Expresión y purificación de ZIKV NS5 RdRp.** Resolución en gel de poli-acrilamida al 10%. **A)** Marcador de peso molecular de proteínas "Pink Prestained Protein Marker", **B)** Sobrenadante total del cultivo no inducido **C)** Sobrenadante total del cultivo inducido con IPTG 500mM, donde se puede apreciar la banda correspondiente a la proteína, **D)** Purificación de ZIKV NS5 WT y **E)** Purificación de ZIKV NS5 GNN.

Para la evaluación preliminar de la actividad *in vitro* de la polimerasa, se adaptó un ensayo de polimerización, basado en la detección de nucleótidos radioactivos, los cuales son incorporados por la enzima durante la síntesis del nuevo ARN. Se emplearon moldes de ARN de poliuridina (poli-U) o policisteína (poli-C) en ausencia de iniciador, puesto que esta polimerasa es capaz de iniciar la síntesis *de novo* según se describe en (Butcher et al., 2001; Calmels, Ventura, Aknin, Metifiot, & Andreola, 2017; McKercher et al., 2004; Q. Wang et al., 2012).

Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en el apartado 2.6 del capítulo Materiales y Métodos.

Los productos de polimerización se resolvieron en geles de poliacrilamida al 20%, con 8M urea.

La síntesis de ARN en ausencia de iniciador pudo observarse tanto en presencia de poli-U y [ $\alpha$ - $^{32}$ P] ATP (**Figura 15 A**) como en presencia de poli-C y [ $\alpha$ - $^{32}$ P] GTP (**Figura 15 C**) demostrando que la enzima es capaz de emplear el molde poli-U con mayor eficiencia que el molde de poli-C y que, además, la polimerización es prolongada en el tiempo, pudiendo observar actividad hasta al menos 3 horas después de iniciarse la reacción. Estos resultados muestran que los moldes homopoliméricos, como el poli-C y el poli-U pueden ser empleados por ZIKV para iniciar la replicación *de novo* del ARN, como previamente se ha documentado en (Butcher et al., 2001; Calmels et al., 2017; McKercher et al., 2004; Q. Wang et al., 2012).



**Figura 15:** Electroferogramas representativos de las reacciones de polimerización realizadas por ZIKV NS5 WT en presencia de [ $\alpha$ - $^{32}$ P] ATP, utilizando poli-U como molde y  $MnCl_2$  como donante de metal. **A)** Polimerización de ARN a diferentes tiempos de 0 a 3 horas. “C- “: control negativo sin enzima, **B)** Polimerización de ARN en presencia de  $MgCl_2$  como donante de metal (1), en ausencia de metal (2) o producida por la proteína recombinante ZIKV NS5-GNN RdRp (3) tras 3 horas de ensayo. **C)** Electroferograma representativo de la polimerización de empleando poli-C como molde y [ $\alpha$ - $^{32}$ P] GTP a diferentes tiempos de incubación. “\*” Posición de los nucleótidos marcados no incorporados. La llave superior indica el producto de elongación.

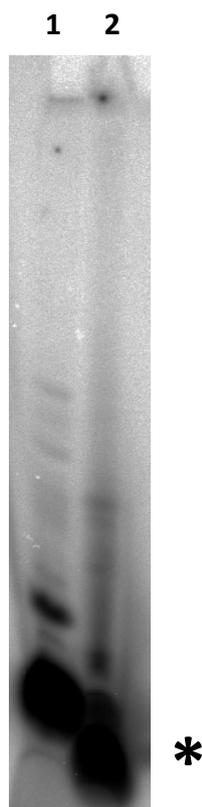
Por otro lado, se observa que la actividad de polimerización *de novo*, es dependiente de la presencia  $Mn^{2+}$ , no detectándose elongación de ARN cuando el metal presente es  $Mg^{2+}$ (comparar **Figura 15 A** con **Figura 15 B**), hecho que coincide con investigaciones previas (H. T. Xu, Hassounah, et al., 2017).

Se realizaron ensayos adicionales en presencia de la proteína recombinante ZIKV\_NS5\_GNN que contiene mutaciones en dos de los aspárticos catalíticos. En este caso no se observó producto de reacción tras 3 horas de reacción (**Figura 15 B**: Carril 3).

Por lo tanto, estos resultados demuestran que la proteína recombinante ZIKV NS5-WT RdRp presenta actividad ARN polimerasa dependiente de ARN. Además, los moldes homopoliméricos, como el poli-C y el poli-U, pueden ser empleados por esta enzima para iniciar la replicación *de novo* del ARN.

Para valorar si la síntesis de ARN observada en los experimentos de la **Figura 15**, proviene de la síntesis de la nueva hebra creada a partir de un mecanismo *de novo*, o sin embargo pudiera deberse a la actividad transferasa terminal ya descrita para otras RdRps (Calmels et al., 2017; Potisopon et al., 2014; J. Wu, Lu, Zhang, & Gong, 2015) se llevaron a cabo experimentos adicionales.

Se realizaron ensayos de síntesis utilizando poli-U y poli-C como molde, en presencia de [ $\alpha$ - $^{32}$ P] GTP y [ $\alpha$ - $^{32}$ P] ATP, respectivamente. Se asumió que la posible actividad transferasa permitiría la incorporación, no dirigida por molde, de estos nucleótidos en el extremo 3' del poli-U o el poli-C, respectivamente. Como se puede ver en la **Figura 16**, no se detectó producto de elongación con estas condiciones.



**Figura 16:** Electroferograma representativo de la actividad de transferasa terminal de ZIKV NS5-WT RdRp en presencia de poli-U y [ $\alpha$ - $^{32}$ P] GTP (carril 1) o poli-C [ $\alpha$ - $^{32}$ P] ATP (carril 2). \* Posición de los nucleótidos marcados no incorporados.

Este resultado respalda la idea de que la actividad detectada se ha debido a la síntesis *de novo* y no a una posible actividad ribonucleotidil transferasa terminal.

## **1.2 Detección de la actividad polimerasa de ZIKV RdRp mediante ensayos fluorimétricos a tiempo real.**

De acuerdo con los resultados anteriores, se decidió poner a punto un método de polimerización más rápido y económico, que permitiera observar el proceso de polimerización en tiempo real.

Para ello, se realizó una adaptación de un método de detección de síntesis de ADNbc por la primasa-polimerasa PrimPol humana descrito anteriormente (Agudo et al., 2017). Este método se basa en la cuantificación de la síntesis de ácidos nucleicos mediante el incremento la fluorescencia emitida por un fluoróforo, el cual se intercala en la doble cadena de nueva síntesis producida por la polimerasa.

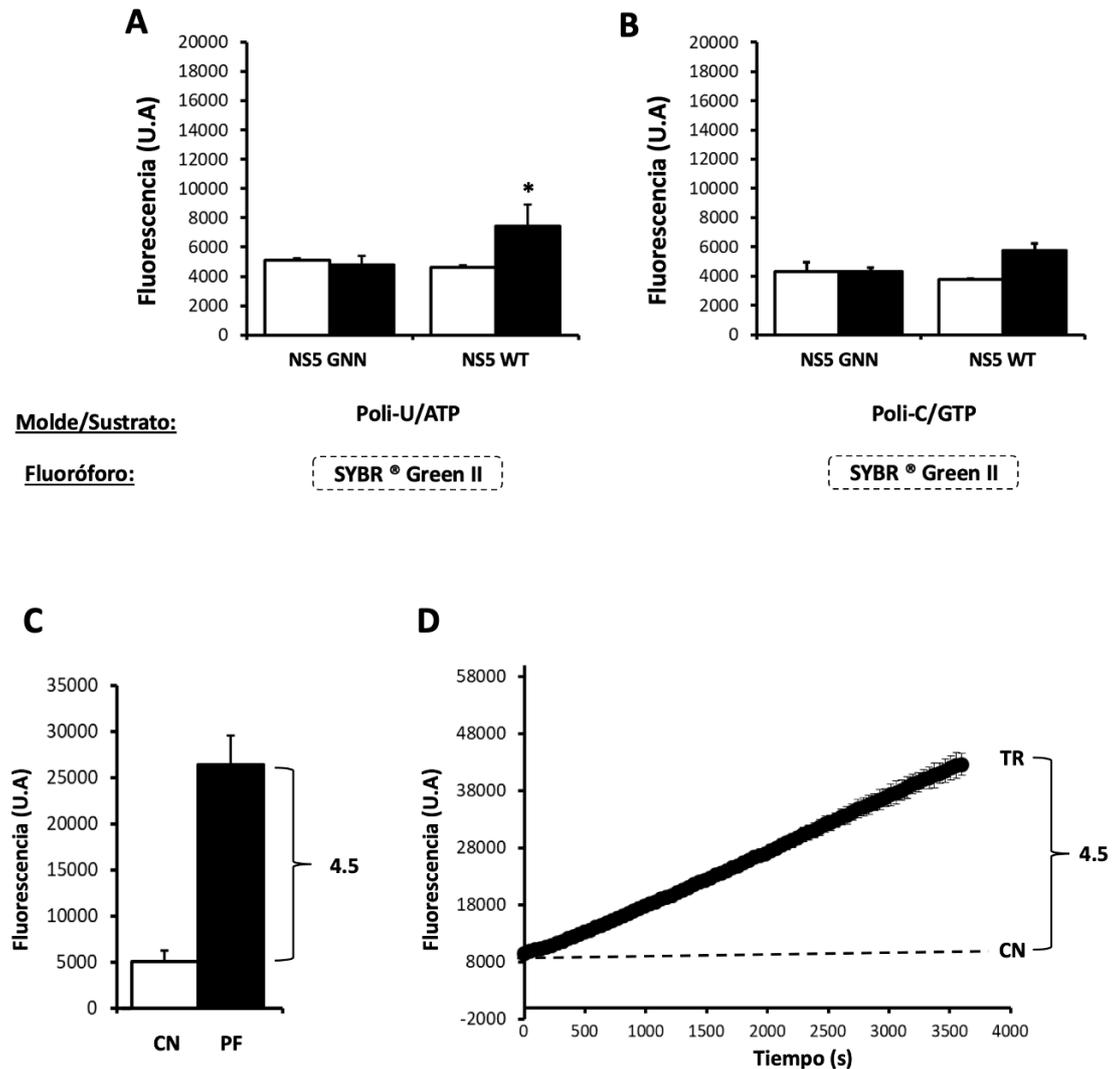
Inicialmente, el fluoróforo que se decidió emplear fue el SYBR Green II, el cual tiene mayor afinidad por el ARN que por el ADNbc. Sin embargo, los ensayos preliminares indicaron que, este colorante, apenas permite visualizar el incremento de fluorescencia en ensayos medidos a tiempo final (agregando el agente intercalante una vez finalizada la reacción (**Figura 17 A y B**). Por lo tanto, se decidió buscar una alternativa a este compuesto.

Estudios anteriores determinaron que el colorante SYTO 9<sup>®</sup>, una molécula con afinidad por ácidos nucleicos, especialmente por aquellos de doble banda, permite la medida de la síntesis de ADNbc en tiempo real (Gudnason, Dufva, Bang, & Wolff, 2007; Monis, Giglio, & Saint, 2005). Por lo tanto, se decidió evaluar su posible uso en el ensayo de fluorescencia para medir ARNbc.

Se realizaron ensayos estándar de actividad medidos a tiempo real y a tiempo final utilizando este fluoróforo y se compararon los resultados obtenidos (**Figura 17 C y D**).

El aumento relativo de la fluorescencia emitida (definido como; la relación entre los valores de fluorescencia obtenidos, después de una reacción a 60 minutos y el valor de fondo observado a tiempo 0), resultó similar en ambos tipos de reacción (obteniéndose un aumento relativo de 4.5 veces en ambos casos).

Además, se observó una gran reproducibilidad entre las diferentes muestras, tanto en el caso de los ensayos medidos en tiempo final, como los medidos en tiempo real (**Figura 17 C y D**). Estos datos sugieren que la unión del SYTO 9<sup>®</sup> no inhibe la actividad de ZIKV RdRp durante la síntesis de ARNbc, y, por lo tanto, es apto para la detección de la actividad polimerasa a tiempo real. Esta reproducibilidad entre las diferentes muestras experimentales favoreció la puesta a punto de ensayos para monitorizar las diferencias entre la emisión de fluorescencia a tiempo final y en tiempo real, empleando poli-U como molde.

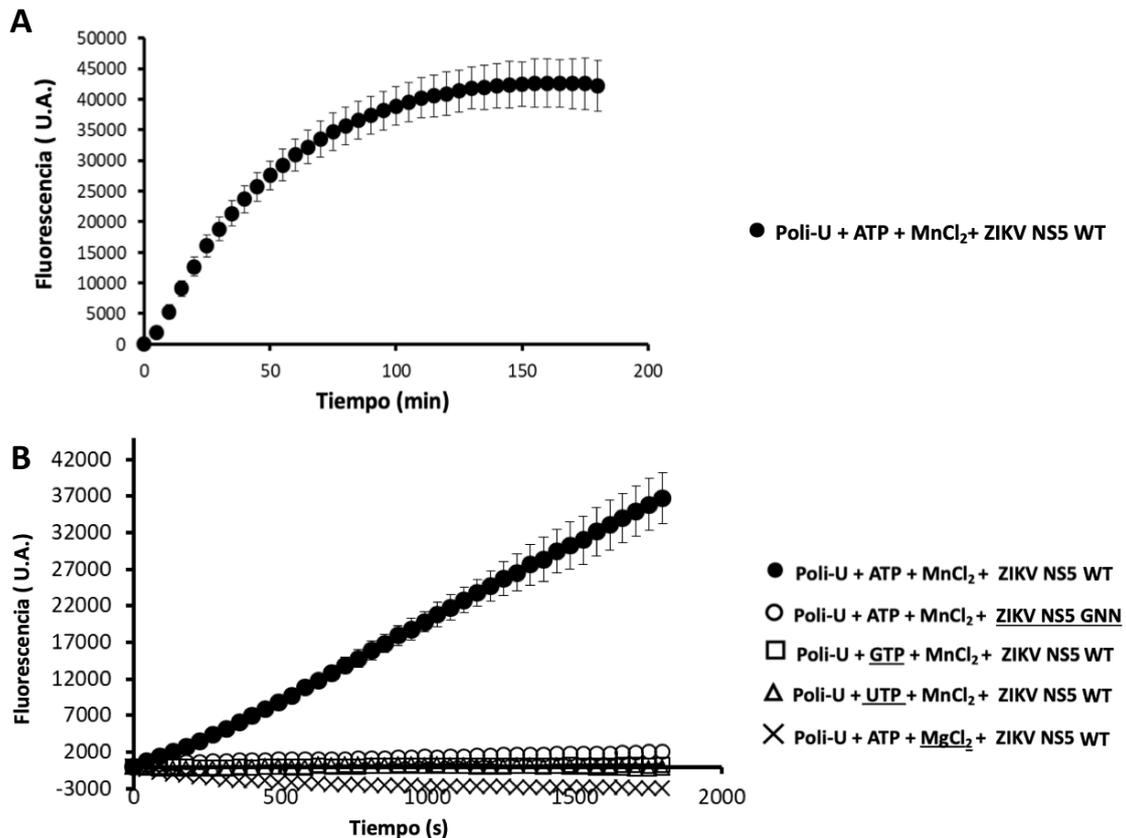


**Figura 17:** Ensayo de polimerización de ZIKV NS5 RdRp (GNN y WT) en presencia de diferentes moldes de ARN y fluoróforos. **A)** y **B)** Fluorescencia obtenida en un ensayo medido a tiempo final tras 60 min de reacción (barras negras), comparada con la fluorescencia a tiempo 0 de reacción (barras blancas), utilizando ZIKV NS5-GNN (NS5-GNN) y ZIKV NS5-WT (NS5-WT) en presencia de SYBR Green II. Se muestran los resultados de un ensayo con ATP y Poli-U (A), y un ensayo con GTP y Poli-C (B). Las diferencias estadísticamente significativas entre la fluorescencia registrada a 60 min y 0 min de reacción se indican mediante “\*” (\* P < 0,01). **C)** Relación entre la fluorescencia tras 60 min de reacción (PF, barras negras) y la fluorescencia a tiempo 0 (CN, barras blancas) en un ensayo medido a punto final. **D)** Relación entre la fluorescencia medida en tiempo real registrada durante 1 h (TR) en un ensayo estándar de polimerización con respecto a la fluorescencia obtenida en un ensayo en ausencia de enzima (CN). En (C) y (D) se utilizó SYTO 9® como fluoróforo. Los valores representados en todos los casos corresponden al promedio de cuatro experimentos independientes. El aumento relativo de fluorescencia se indica al lado derecho de la llave en (C) y en (D).

Posteriormente, se llevaron a cabo diferentes experimentos para determinar los requerimientos básicos del ensayo basado en la determinación de fluorescencia. Se observó que la síntesis de ARNbc fue lineal hasta 60 min alcanzando una acumulación máxima del producto, en el intervalo de tiempo comprendido entre los 150-180 min

(Figura 18 A). Se demostró que la actividad de ZIKV NS5 WT es dependiente de la presencia de  $Mn^{2+}$  en el ensayo.

También se pudo demostrar que: la alteración del sitio catalítico de la polimerasa (ZIKV NS5 GNN), el uso de nucleótidos diferentes al ATP, así como el uso de  $Mg^{2+}$  como metal catalítico, supone la pérdida completa de la actividad polimerasa (Figura 18 B). Todos estos resultados concuerdan con observaciones previas obtenidas en los ensayos basados en radioactividad (Figura 15 B).

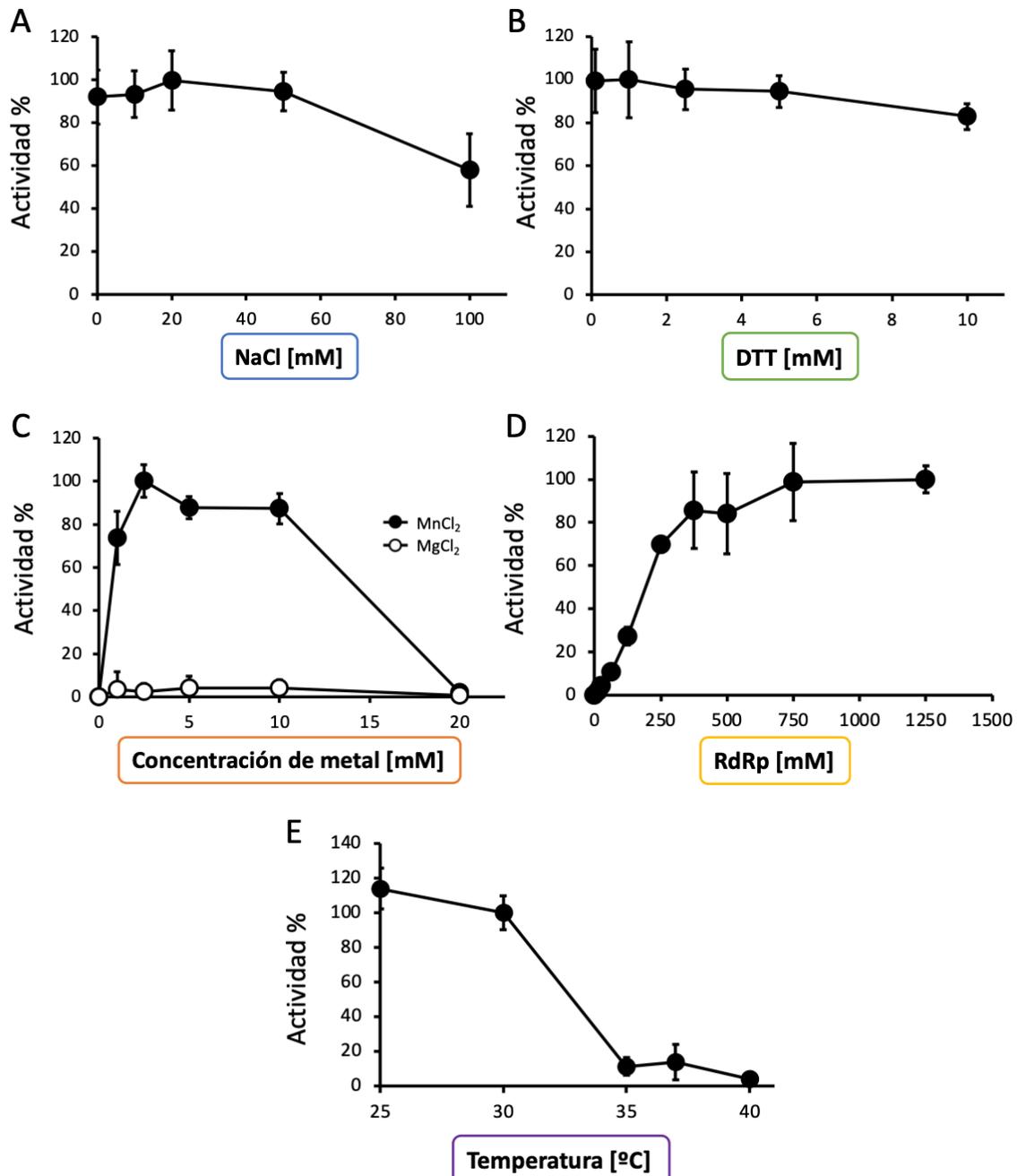


**Figura 18:** Representaciones gráficas de emisión de fluorescencia medida en tiempo real producida por ZIKV NS5. **A)** La actividad de polimerización se registró como el aumento relativo de la fluorescencia durante 180 min en un ensayo estándar utilizando ZIKV NS5 WT. Los valores representados están obtenidos a partir de tres experimentos independientes. **B)** Ensayo de polimerización medido por fluorescencia en ausencia o presencia de distintos componentes de la reacción. En la leyenda se indica subrayados los componentes, que, en cada caso, difieren de aquellos que se encuentran en la reacción estándar representada (circunferencias negras). Los valores representados están obtenidos a partir de tres experimentos independientes.

### 1.3 Optimización del ensayo de detección basado en fluorescencia

Una vez determinados los requerimientos básicos para el ensayo de fluorescencia, se llevaron a cabo experimentos para ajustar las condiciones óptimas del ensayo. Para este fin, se realizaron diferentes experimentos en donde se varió de la concentración de

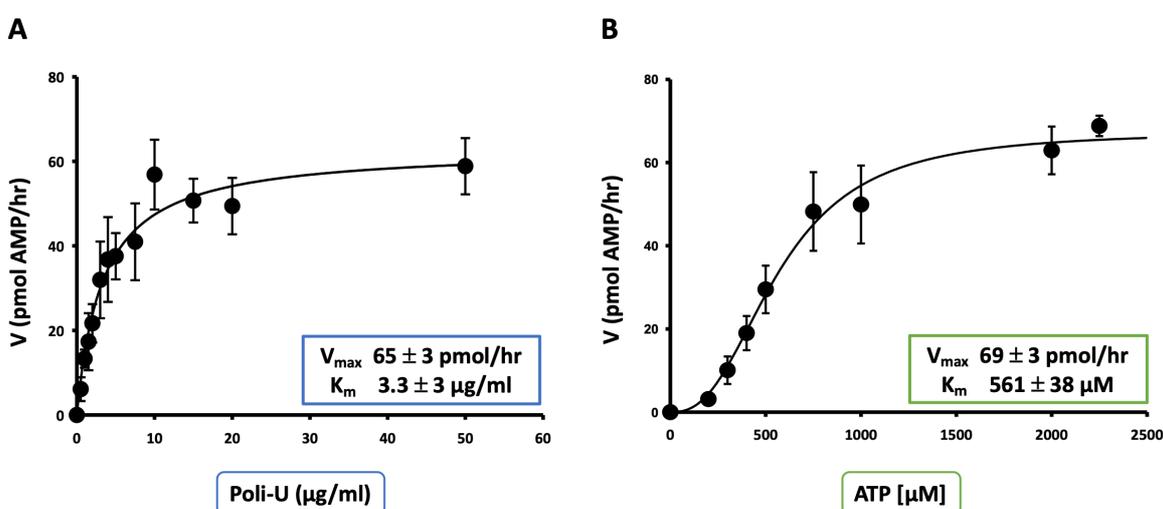
NaCl, DTT, MnCl<sub>2</sub> y enzima, manteniendo en cada caso el resto de los parámetros constantes.



**Figura 19: Optimización de las condiciones bioquímicas para el ensayo basado en fluorescencia para ZIKV NS5 RdRp.** Se examinó el efecto de las variaciones en la concentración de diferentes reactivos en el ensayo: **A)** Actividad en presencia de diferentes concentraciones de NaCl, **B)** Actividad en presencia de diferentes concentraciones de DTT, **C)** Actividad en presencia de diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub> o MnCl<sub>2</sub> (En el caso de un ensayo en presencia de MgCl<sub>2</sub>, la actividad fue relativa a una reacción estándar en presencia de 2.5 mM de MnCl<sub>2</sub>.) y **D)** Actividad en presencia de diferentes concentraciones de RdRp. Se representa en todos los casos la media y desviación estándar de tres experimentos independientes.

Se observó que la presencia o ausencia de NaCl y DTT, no tuvo un efecto significativo en la síntesis de ARNbc, la cual solo se vio ligeramente impedida a altas concentraciones (**Figura 19 A y B**). La actividad máxima de la enzima se registró con una concentración de 2.5 mM de  $MnCl_2$ , mientras que altas concentraciones de este metal inhibían la reacción, como ocurre en reacciones con presencia de cualquier concentración de  $MgCl_2$  utilizada (**Figura 19 C**). Por otro lado, la determinación de la velocidad de la reacción demostró una correlación lineal con el aumento de la concentración de la enzima dentro del rango de 10-250 nM, lográndose la velocidad máxima a una concentración de 750 nM de ZIKV NS5 WT (**Figura 19 D**).

Finalmente, se calcularon los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  del ATP y del poli-U, obteniéndose los siguientes valores:  $K_m$   $561 \pm 38 \mu M$  y  $V_{max}$   $69 \pm 3$  pmol/h para el ATP y una  $K_m$  de  $3.3 \pm 3 \mu g/mL$  y  $V_{max}$   $65 \pm 3$  pmol/h para el poli-U (**Figura 20**).



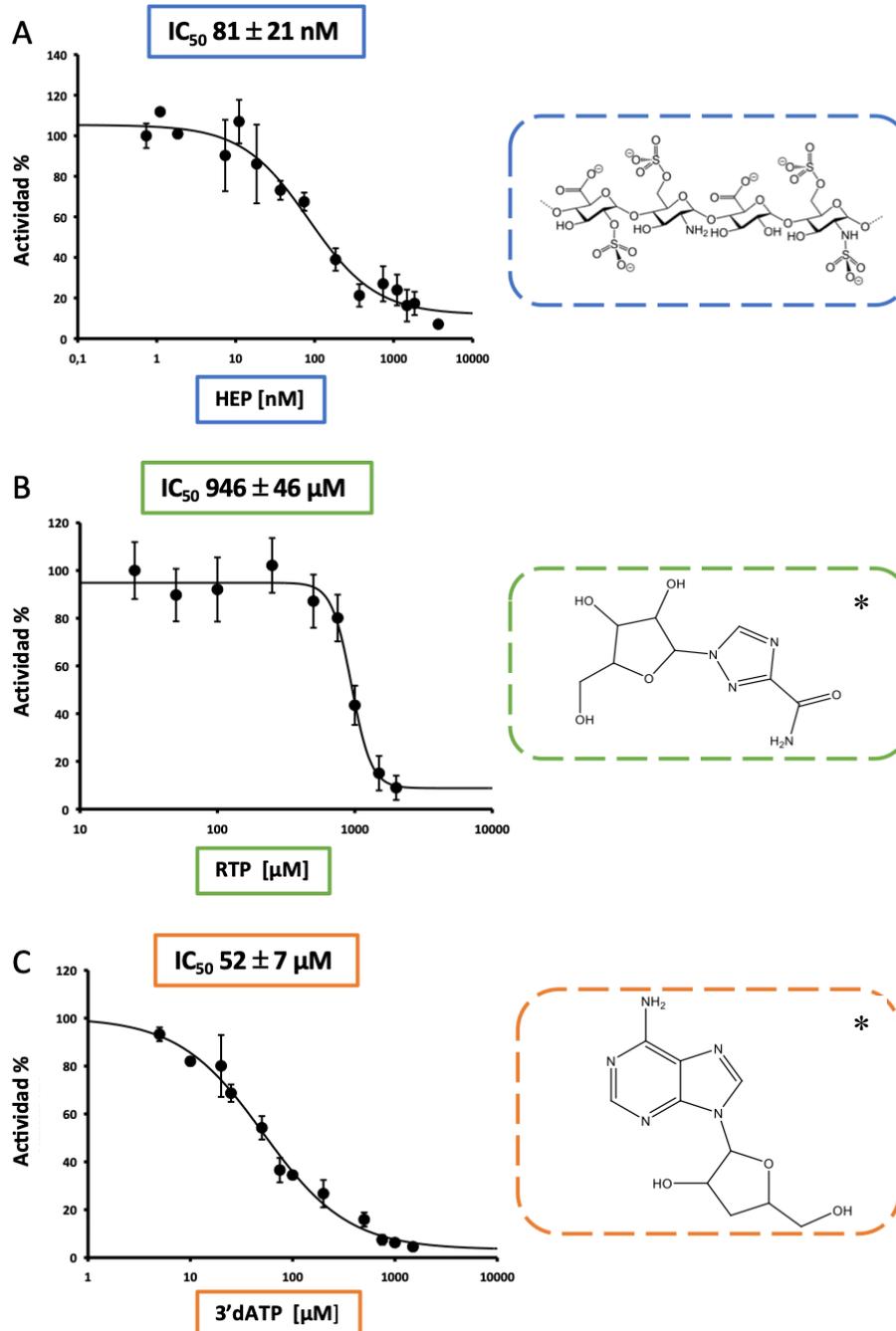
**Figura 20: Cinética de Michaelis-Menten (estado estacionario) de ZIKV NS5 RdRp usando un método basado en fluorescencia.** Cada valor ha sido obtenido mediante la medición de tres ensayos independientes. **A)** Representación gráfica para el cálculo de los parámetros cinéticos  $V_{max}$  y  $K_m$  para el molde de poli-U y **B)** Representación gráfica para el cálculo de los parámetros cinéticos  $V_{max}$  y  $K_m$  para ATP como sustrato. El procedimiento experimental para el cálculo de estas constantes se describe en Métodos.

Por lo que las condiciones óptimas del ensayo de fluorescencia para ZIKV NS5 WT son 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 2.5 mM  $MnCl_2$ , 500  $\mu M$  ATP, 1  $\mu g/mL$  poly-U, 0.1 mg/mL BSA y 0.25  $\mu M$  SYTO 9<sup>®</sup> (solución stock a 50  $\mu M$  en tampón TE pH 7.5).

#### 1.4 Adaptación del ensayo fluorométrico para la detección de compuestos con potencial inhibitorio de la polimerasa de ZIKV.

A partir de los resultados obtenidos, se planteó la hipótesis de que este ensayo de actividad pudiera ser útil para el desarrollo de métodos de cribado para la identificación de inhibidores frente a la polimerasa de ZIKV. Con este fin, se realizaron ensayos de actividad en presencia de diferentes moléculas que han sido previamente catalogadas como; IAN (inhibidor análogo de nucleótido) e INAN (inhibidor no análogo de nucleótido) de otras polimerasas. En estos experimentos, se calculó la concentración necesaria para inhibir 50% de la actividad enzimática medida como incremento de fluorescencia (IC50) (**Figura 21 A**).

Como INAN, se utilizó heparina, conocida por ser un inhibidor universal de polimerasas (Bai, Fischer, Keshavjee, & Liu, 2000; Beutler, Gelbart, & Kuhl, 1990). La adición de este compuesto dio lugar a la total anulación de la actividad polimerasa a concentraciones muy bajas, obteniendo una  $IC_{50}$  de  $81 \pm 21$  nM (**Figura 21 A** y **Figura 22 B**).

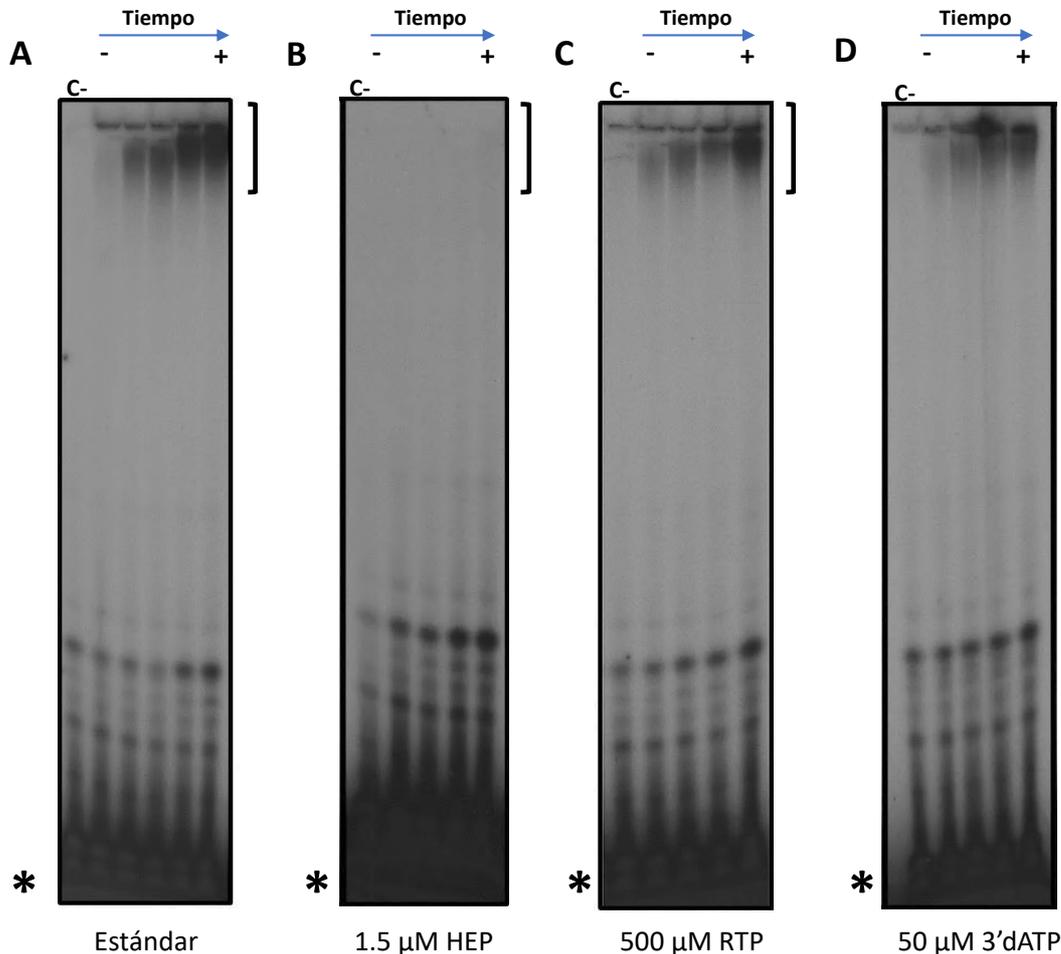


**Figura 21: Actividad enzimática de ZIKV NS5 RdRp en presencia de compuestos inhibidores en tiempo real. A)** Actividad enzimática en presencia de heparina (HEP). **B)** Actividad enzimática en presencia de ribavirina trifosfato (RTP). **C)** Actividad enzimática en presencia de cordicepina trifosfato (3'dATP). \*Todos los compuestos fueron añadidos en forma trifosfato. Los valores de actividad mostrados son el valor promedio y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes.

Asimismo, se evaluaron dos compuestos catalogados como IAN: cordicepina 5'-trifosfato (3'dATP; análogo de ATP terminador de cadena (Arnold, Smidansky, Moustafa, & Cameron, 2012; Izuta, Kohsaka-Ichikawa, Yamaguchi, & Saneyoshi, 1996; Rose, Bell, & Jacob, 1977) y ribavirina 5'-trifosfato (RTP; un análogo de purina con capacidad inhibitoria, pero que permite la elongación del ARN durante la replicación viral (Arias et al., 2008; Crotty et al., 2000; Maag, Castro, Hong, & Cameron, 2001; Sierra et al., 2007)).

Ambos compuestos inhibieron la actividad de polimerización en diferente medida, resultando 20 veces mejor inhibidor el 3'dATP ( $IC_{50} = 54 \pm 7 \mu M$ ) con respecto a la RTP ( $IC_{50} = 946 \pm 46 \mu M$ ), probablemente debido a que la estructura del 3'dATP se asemeja más al sustrato natural ATP que la RTP ( **Figura 21 B y C**).

Para confirmar estos resultados, se realizaron ensayos adicionales empleando poli-U como molde, y  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP como sustrato. El resultado de las reacciones (llevadas a cabo durante 3 horas) se resolvió en geles de poliacrilamida al 20% con 8M urea.



**Figura 22: Electroferogramas de la actividad enzimática de ZIKV NS5 RdRp en presencia de compuestos inhibitorios medida en diferentes tiempos (de 0 a 3 h).** A) Actividad enzimática en reacción estándar, B) Actividad enzimática en presencia de heparina (HEP) C) Actividad enzimática en presencia de ribavirina trifosfato (RTP) y D) Actividad enzimática en presencia de cordicepina trifosfato (3'dATP). \*Posición de los nucleótidos radioactivos no incorporados. La llave superior indica el producto de elongación. En la parte inferior de cada electroferograma se indica la concentración de inhibidor utilizada en cada caso. "C-" "control negativo en ausencia de enzima.

Como se puede observar, el comportamiento de la enzima en presencia de los diferentes tipos de inhibidores se correlacionó con lo previamente visto en el ensayo de fluorescencia, reafirmando así que el método basado en fluorescencia es apto para medir en tiempo real la actividad polimerasa en presencia de un inhibidor (**Figura 22**).

La utilización de un ensayo como método de cribado rápido y fiable de compuestos con un potencial efecto inhibitorio, requiere que pueda establecerse como una plataforma de alto rendimiento, o *High-throughput* (HTP).

Por lo tanto, se decidió estudiar si en el ensayo de fluorescencia medido a tiempo real presentaba las características necesarias para ser catalogado como un método HTP. Para ello, se determinó el valor  $Z'$  del ensayo. Este parámetro, es una medida estadística estándar para evaluar la calidad de las plataformas HTP descrito por (J. H. Zhang et al., 1999). Se llevaron a cabo 8 experimentos en presencia, o ausencia de  $ClMn_2$  (ensayos denominados positivo y negativo, respectivamente) realizados por triplicado y en días independientes (ver Materiales y Métodos Apartado 2.4.1.c).

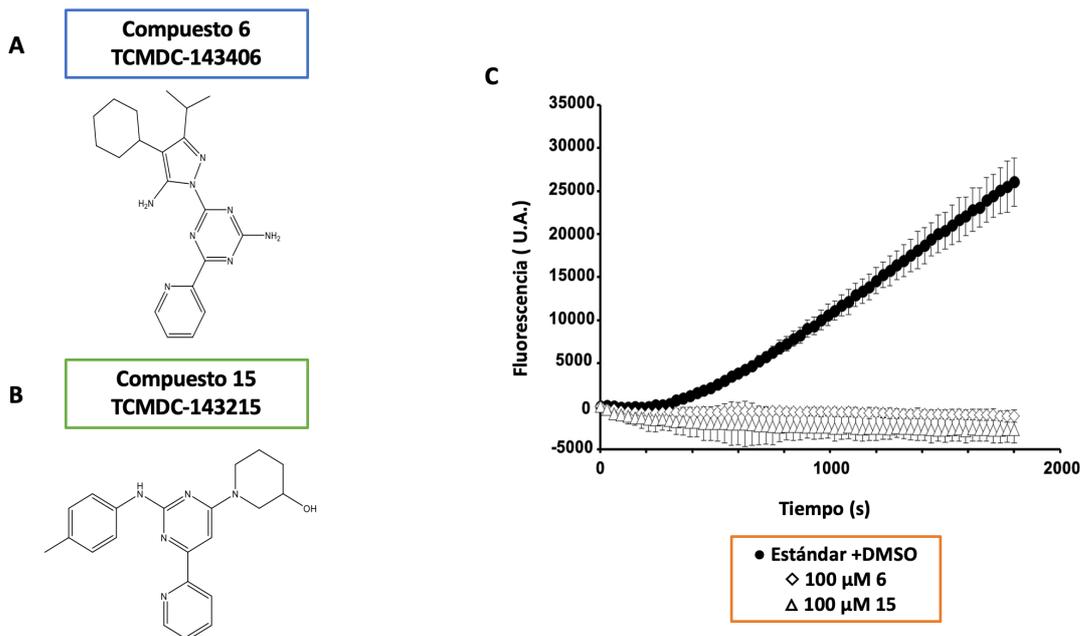
Los valores de actividad relativa se determinaron como la velocidad de polimerización registrada durante los primeros 10 min de la reacción. El valor de  $Z'$  obtenido fue 0.62, que, al ser mayor de 0.5, califica el método como un ensayo “excelente” para aplicaciones de cribado de alto rendimiento, según (J. H. Zhang et al., 1999)

### **1.5 Búsqueda de nuevos inhibidores en quimiotecas comerciales**

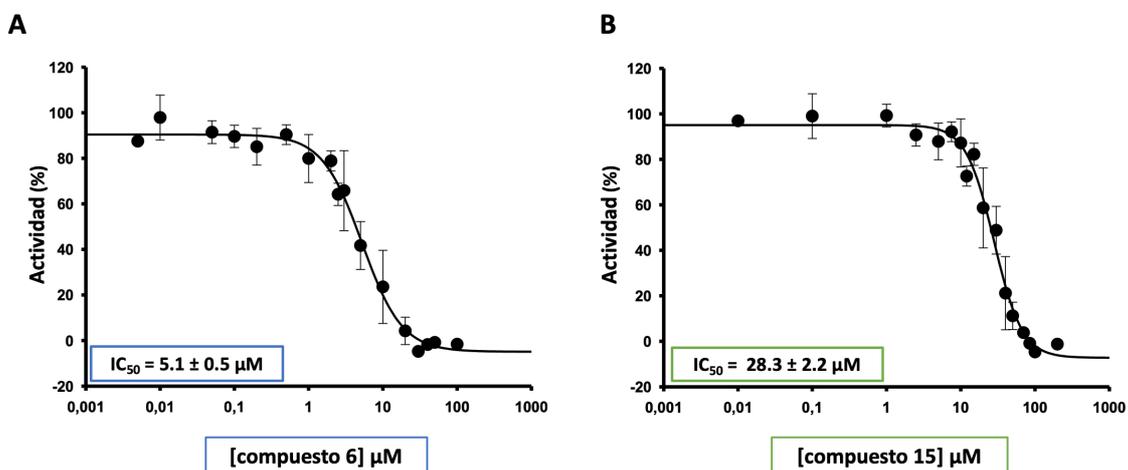
Una vez demostrada la idoneidad de este ensayo de fluorescencia como un sistema HTP de detección de inhibidores de polimerasa, se decidió realizar una prueba de concepto mediante su utilización en el análisis de la quimioteca de acceso abierto previamente desarrollada para kinetoplástidos de la empresa GlaxoSmithKline (GSK) (Peña et al., 2015).

Después de un cribado inicial de 592 compuestos por triplicado, se identificaron dos posibles inhibidores para la ZIKV NS5 RdRp: TCMDC-143406, CID Pubchem 91800701 (denominado compuesto “6”) y TCMDC-143215, CID Pubchem 91800580 (denominado compuesto “15”) (**Figura 23 A y B**). A una concentración de 100 mM, estos compuestos exhibieron una inhibición total de la actividad asociada a la fluorescencia en comparación con un control en presencia del disolvente DMSO (**Figura 23 C**).

Para caracterizar más profundamente el efecto inhibitorio de estos compuestos, se calculó el valor  $IC_{50}$  de cada uno de ellos. Ambos compuestos fueron activos en concentraciones de  $\mu M$ , ejerciendo el compuesto 6 una inhibición aproximadamente seis veces más potente que el compuesto 15, como así lo reflejan los valores obtenidos de  $IC_{50}$  (5,21  $\mu M$  y 28,32  $\mu M$ , respectivamente) (**Figura 24**).

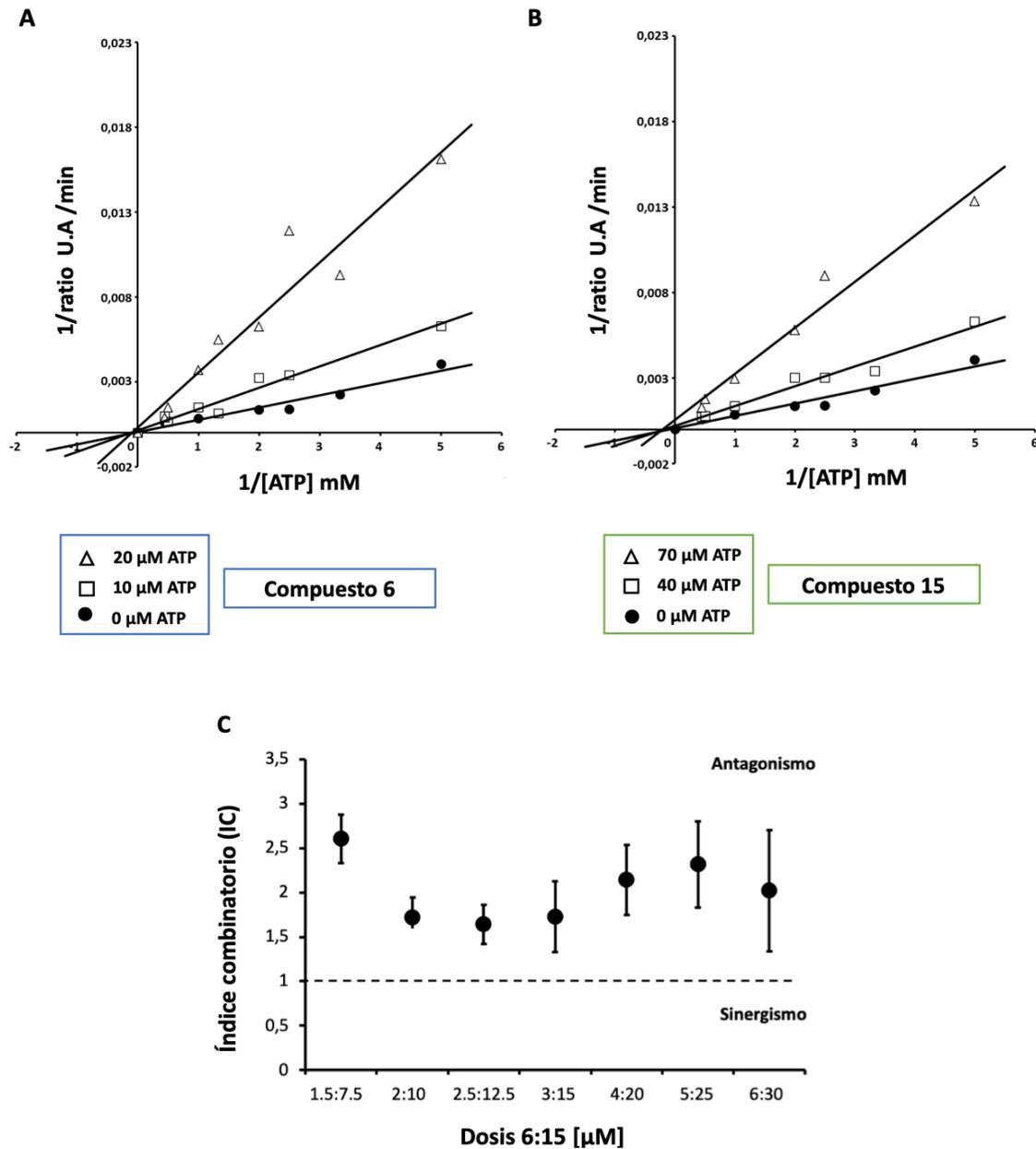


**Figura 23:** *Compuestos con potencial efecto inhibitorio sobre ZIKV NS5 RdRp. A) Estructura química del compuesto 6, B) Estructura química del compuesto 15, C) Representación gráfica de la actividad basada en fluorescencia de ZIKV NS5 WT, en ausencia (círculos negros) y en presencia de los compuestos 6 y 15. Los valores mostrados son la media y desviación estándar de tres experimentos independientes.*



**Figura 24:** *Representación gráfica de parámetros cinéticos de ZIKV NS5 RdRp en presencia de los compuestos 6 y 15 (I). A) Representación gráfica para el cálculo de  $IC_{50}$  del compuesto 6, B) Representación gráfica para el cálculo de  $IC_{50}$  del compuesto 15. Los valores mostrados son la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.*

Se realizaron ensayos adicionales para caracterizar mejor el tipo de inhibición ejercida por estos compuestos. Para ello, se calculó la velocidad de la reacción en presencia de concentraciones crecientes de ATP y de los compuestos 6 y 15. Los resultados obtenidos se representaron mediante gráficas de Lineweaver-Burk (**Figura 25 A y B**).



**Figura 25: Representación gráfica de parámetros cinéticos de ZIKV NS5 RdRp en presencia de los compuestos 6 y 15 (II).** **A)** Representación gráfica de Lineweaver-Burk de la actividad de ZIKV NS5 WT. Se muestran los resultados de actividad en presencia de concentraciones crecientes de ATP y en ausencia (círculos negros), o presencia de 40 μM (cuadrados blancos), o 70 μM (triángulos blancos), de compuesto 6. **B)** Igual que A utilizando 10 μM (cuadrados blancos), o 20 μM (triángulos blancos), de compuesto 15. Para cada valor, se representan los valores medios de tres medidas independientes, **C)** Representación gráfica de las posibles interacciones entre compuestos con potencial inhibitorio. El eje x representa las concentraciones de compuesto 6 y compuesto 15, respectivamente, en la mezcla utilizada en cada ensayo. La línea discontinua de puntos indica el límite entre sinergismo y antagonismo. Se representan los valores medios y desviaciones estándar de 4 experimentos independientes.

El lugar de corte de las rectas de velocidad obtenidas en el eje de abscisas, indicó que el tipo de inhibición corresponde con una inhibición no competitiva de los compuestos sobre la enzima.

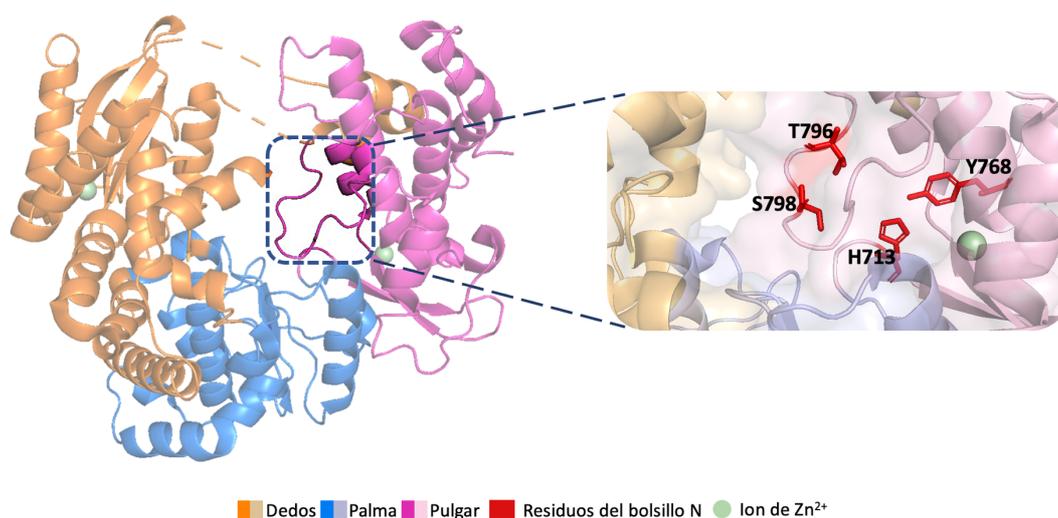
Por último, se abordó la posible interacción entre los dos compuestos mediante ensayos de inhibición con mezclas diferentes de 6 y 15 en la reacción. A partir de los resultados obtenidos, se calculó el índice combinatorio (IC) de los compuestos en estos experimentos. En este tipo de ensayos, el valor que tome el IC ( $< 1$ ,  $=1$  o  $>1$ ), determina si la interacción de los compuestos es sinérgica, aditiva o antagónica, respectivamente (Chou, 2006). El IC observado en todos los ensayos de combinación fue superior a 1, lo que sugirió que los compuestos ejercían actividad antagónica inhibitoria entre ellos (**Figura 25**).

Los resultados obtenidos en los ensayos de tipo de inhibición e interacción son compatibles con que ambos compuestos reconocen y compiten por unirse al mismo sitio alostérico de la enzima (ver capítulo Discusión).

### 1.6 Construcción de mutantes para la polimerasa de ZIKV

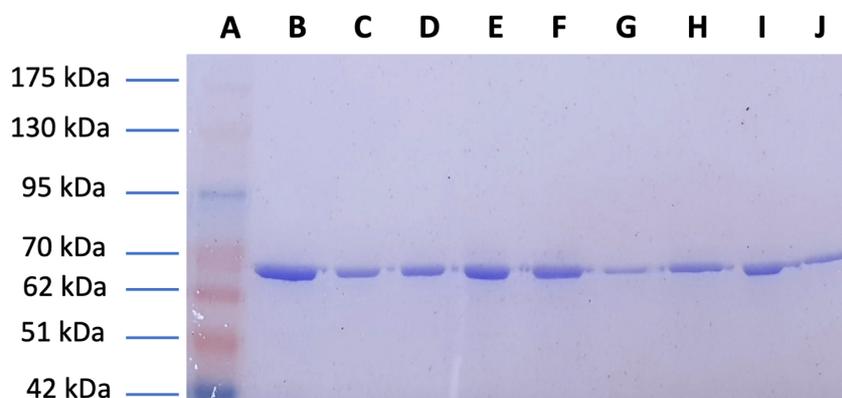
Para determinar la posible interacción de los compuestos con la polimerasa, se llevó a cabo un ensayo *in silico*, en colaboración con el grupo de la Dra. María Jesús Pérez Pérez, del instituto de química médica del CSIC (IQM-CSIC).

El análisis bioinformático se basó en la existencia de un sitio alostérico, denominado bolsillo N. Este bolsillo ha sido localizado previamente en la polimerasa de ZIKV y otras RdRp de la misma familia (Gharbi-Ayachi et al., 2020; Godoy et al., 2017; Kamiyama et al., 2017). Utilizando como sustrato modelo el compuesto 6, se seleccionaron distintos residuos que podrían estar implicados en la unión del compuesto en la región alostérica del bolsillo N de la polimerasa (**Figura 26**).



**Figura 26:** Representación gráfica del bolsillo N en ZIKV. La imagen muestra en detalle el interior del bolsillo N en la estructura tridimensional de la RdRp (recuadro azul con líneas discontinuas). Se indican en rojo los residuos seleccionados del bolsillo N que podrían estar implicados en la interacción ZIKV NS5 RdRp WT con el compuesto 6 según el estudio bioinformático desarrollado por el grupo de la Dra. María Jesús Pérez Pérez (IQM-CSIC). Figura realizada a partir del PDB 5wz3.

Para evaluar el papel de estos residuos en la unión del compuesto 6 con la polimerasa, se construyeron distintas proteínas mutantes que contenían cambios en alguna o varias de estas posiciones. Estas proteínas se expresaron y purificaron siguiendo los protocolos descritos en los puntos 2.2.1 y 2.3.1 del capítulo Materiales y Métodos.



**Figura 27: Expresión y purificación de mutantes para ZIKV NS5 RdRp.** Resolución en gel de poliacrilamida al 10%. **A)** Marcador de peso molecular de proteínas “Pink Prestained Protein Marker”, **B)** ZIKV NS5 WT, **C)** ZIKV NS5 H713A, **D)** ZIKV NS5 H713W, **E)** ZIKV NS5 H713A-Y768A, **F)** ZIKV NS5 H713A-Y768W, **G)** ZIKV NS5 H713W-Y768W, **H)** ZIKV NS5 Y768A, **I)** ZIKV NS5 Y768W, **J)** ZIKV NS5 Y798F. \*El mutante para la posición T796 no pudo ser purificado debido a su baja expresión.

Se llevaron a cabo experimentos para determinar la actividad siguiendo el protocolo y las condiciones establecidas anteriormente para ZIKV NS5 WT. Se realizaron ensayos de polimerización medidos por fluorescencia y se observó que la mayoría de las enzimas mutantes eran inactivas. Sólo las Proteínas ZIKV NS5 H713A y ZIKV NS5 Y768A mostraron actividad medible en un ensayo estándar (**Tabla 9**). Sin embargo, el bajo nivel de actividad basal de estas enzimas impidió obtener valores de inhibición confiables en los ensayos realizados en presencia del compuesto 6.

**Tabla 9: Actividad de los mutantes de ZIKV NS5 en ensayo estándar de fluorescencia medido en tiempo real.** Se indica la actividad relativa de cada uno de los mutantes purificados con respecto a ZIKV NS5 WT. Se le otorgó un valor arbitrario de 100% a la actividad de ZIKV NS5 WT en estos ensayos. “-” indica que no se observó actividad con ese mutante. “N.A.” indica que no se determinó la actividad de ese mutante por el bajo rendimiento obtenido durante su purificación. Se muestra la media y desviaciones estándar de 3 experimentos independientes

Mutante	Actividad %
ZIKV NS5 WT	100±10
ZIKV NS5 H713A	26±8
ZIKV NS5 H713W	-
ZIKV NS5 H713A-Y768A	-
ZIKV NS5 H713A-Y768W	-
ZIKV NS5 H713W-Y768W	-
ZIKV NS5 Y768A	13±6
ZIKV NS5 Y768W	-
ZIKV NS5 Y798F	N.D.

## 2. Virus del Nilo Occidental

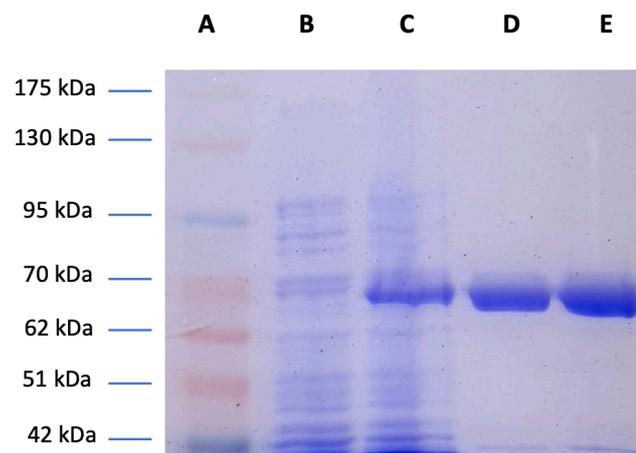
Debido a los resultados obtenidos con la puesta a punto de la plataforma para ZIKV NS5 RdRp, se decidió llevar a cabo nuevos experimentos que permitieran emplear una técnica similar para utilizar la polimerasa de otro Flavivirus con alta importancia clínica, como es el virus del Nilo Occidental (WNV).

El virus del Nilo Occidental es responsable de numerosos casos de morbilidad y mortalidad en aves, equinos y seres humanos. Las epidemias que se han reportado hasta el día de hoy se han localizado en Europa, África, Oriente Medio y partes de Asia. A finales de la década de 1990, el virus se volvió más virulento, extendiéndose a América del Norte (Mackenzie et al., 2004). En los seres humanos la presentación clínica varía, pudiendo ser desde asintomática (observada con una mayor frecuencia), hasta causar encefalitis/parálisis y en algunos casos la muerte. Actualmente no existe una vacuna autorizada para uso humano, y su único tratamiento se basa en paliar la sintomatología junto con los cuidados paliativos del paciente en casos con mayor gravedad (Ulbert, 2019). Por lo tanto, como en el caso de ZIKV, encontrar moléculas inhibitorias de la replicación viral, es urgente para parar la expansión y diseminación del virus.

### 2.1 Expresión y purificación WNV NS5 RdRp

El crecimiento y sobreexpresión de la región RdRp de NS5 del virus WNV NS5 (WNV NS5 WT), así como la correspondiente obtención de un mutante catalíticamente inactivo (WNV NS5 GNN), se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que ZIKV NS5 RdRp. (Véase el apartado 1.1 del capítulo Resultados).

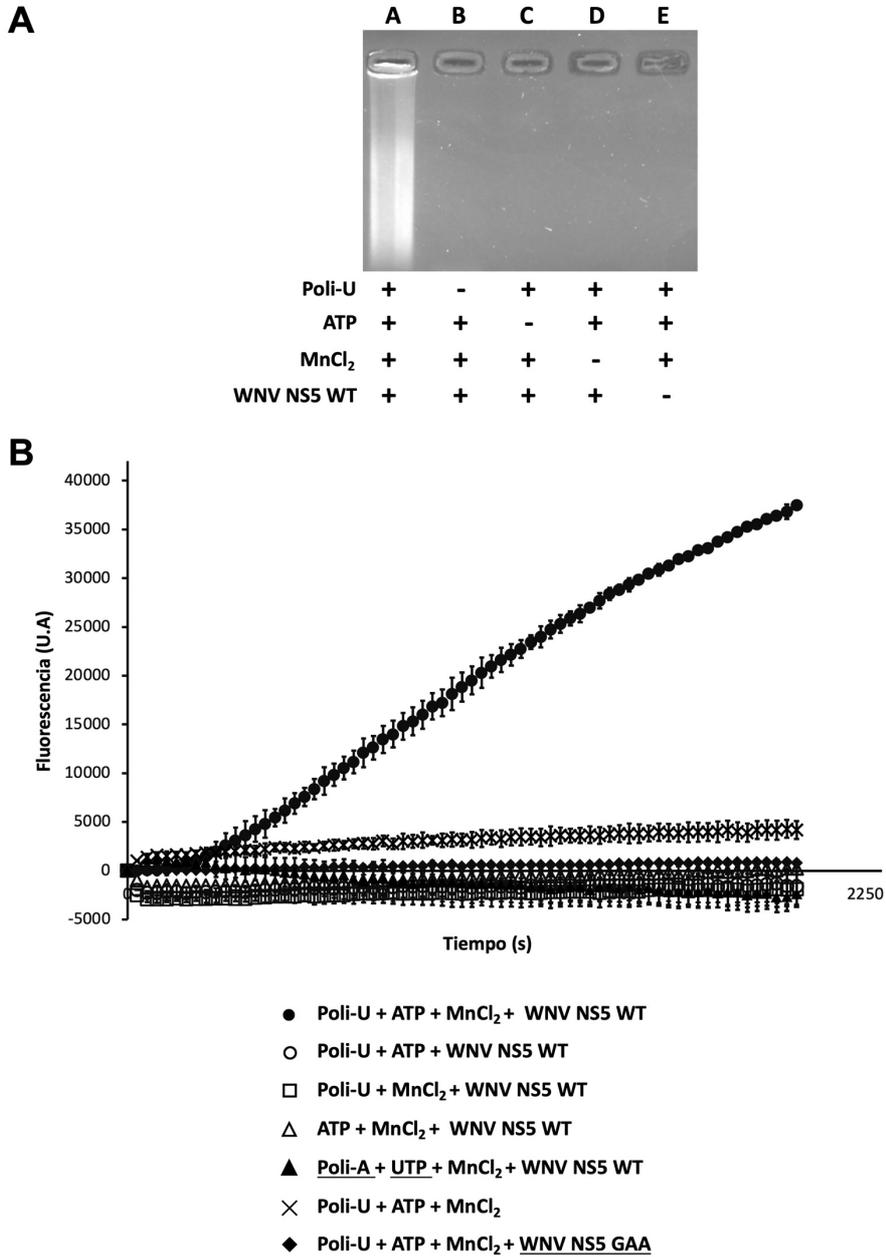
Tras el proceso de purificación (apartado 2.3.2. del capítulo Materiales y Métodos), el grado de pureza de las proteínas obtenidas fue  $\geq 95\%$ , según los resultados visibles por electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE (**Figura 28**).



**Figura 28:** *E* Expresión y purificación de WNV NS5 RdRp. Resolución de las proteínas recombinantes purificadas en gel de poliacrilamida al 10%. **A)** Marcador de peso molecular de proteínas "Pink Prestained Protein Marker". **B)** y **C)** Extracto soluble de cultivo de bacterias transformadas con plásmido pET16b-ZIKV-NS5RdRp sin inducir (**B**), o tras 24 h de inducción con IPTG 500 μM (**C**). **D)** proteína WNV NS5 WT purificada. **E)** Proteína WNV NS5 GNN purificada.

## 2.2 Detección de la actividad polimerasa a tiempo real

Para el desarrollo de un ensayo que permitiese medir por fluorescencia la actividad de WNV NS5, como punto de partida, se utilizaron las condiciones estándar previamente utilizadas en el ensayo de fluorescencia medida a tiempo real con ZIKV NS5 (apartado 2.4.1 del capítulo Materiales y Métodos), incluyendo el uso de SYTO 9® como fluoróforo.



**Figura 29: Representaciones gráficas de emisión de fluorescencia medida en tiempo real utilizando WNV NS5 WT. A)** Ensayo de polimerización medido por fluorescencia en ausencia, o presencia, de distintos componentes. En la leyenda se indica subrayados los componentes, que, en cada caso, difieren de aquellos que se encuentran en la reacción estándar (circunferencias negras). Los valores representados están obtenidos a partir de cinco experimentos independientes. Aquellos componentes no indicados no estaban presentes en la reacción correspondiente, **B)** Ensayo de actividad estándar con WNV NS5 WT revelado en gel de agarosa. Gel representativo de un ensayo en presencia (+), o en ausencia (-) de distintos componentes (indicados a la izquierda) presentes en la reacción de polimerización.

Inicialmente, se determinaron los requerimientos básicos del ensayo de fluorescencia, de manera análoga a lo previamente realizado para ZIKV NS5 RdRp. Para ello, se realizaron diferentes experimentos en los que uno de los componentes de la reacción es cambiado o eliminado (**Figura 29 B**). Sólo se observó incremento de fluorescencia cuando todos los componentes principales de la reacción estaban presentes.

Se realizaron ensayos de polimerización con WNV NS5 WT medidos a tiempo final mediante su visualización en geles de agarosa, tal y como se indica en el apartado 2.5.2. del capítulo Materiales y Métodos. La combinación de todos los componentes principales de la reacción permitió observar en el gel de agarosa una mancha continua compatible con la polimerización de ácidos nucleicos sobre un molde de tamaño variable, como es el caso del poli-U utilizado (**Figura 29 A** carril A). Sin embargo, los experimentos realizados en ausencia de cualquier de estos componentes, no mostraron ningún producto de elongación (**Figura 29 A** carriles B-E). Estos resultados confirman que el incremento de fluorescencia observado en ellos ensayos de fluorescencia se deben a la síntesis de ARNbc por parte de WNV NS5 WT.

De una manera similar a lo ocurrido con ZIKV NS5 WT, los resultados obtenidos, indican que el  $MnCl_2$ , pero no el  $MgCl_2$ , es capaz de sustentar la actividad polimerasa medida como un incremento de la fluorescencia. Además, el incremento de la fluorescencia no es observable en ausencia de molde o nucleótidos o cuando se añade el mutante catalíticamente inactivo WNV NS5 GNN en presencia del resto de componentes (**Figura 29**).

Se ha descrito previamente que la polimerasa de WNV, como otras polimerasas del género *Flaviviridae*, tiene preferencia por comenzar la síntesis *de novo* utilizando purinas en el extremo 3' del molde de ARN (Malet et al., 2008; Selisko et al., 2006) Esta observación concuerda con los resultados obtenidos con WNV NS5 WT en el ensayo de fluorescencia, puesto que sólo el molde poli-U, pero no el poli-A, permitió observar un incremento de fluorescencia en la reacción de polimerización. (**Figura 29 B**).

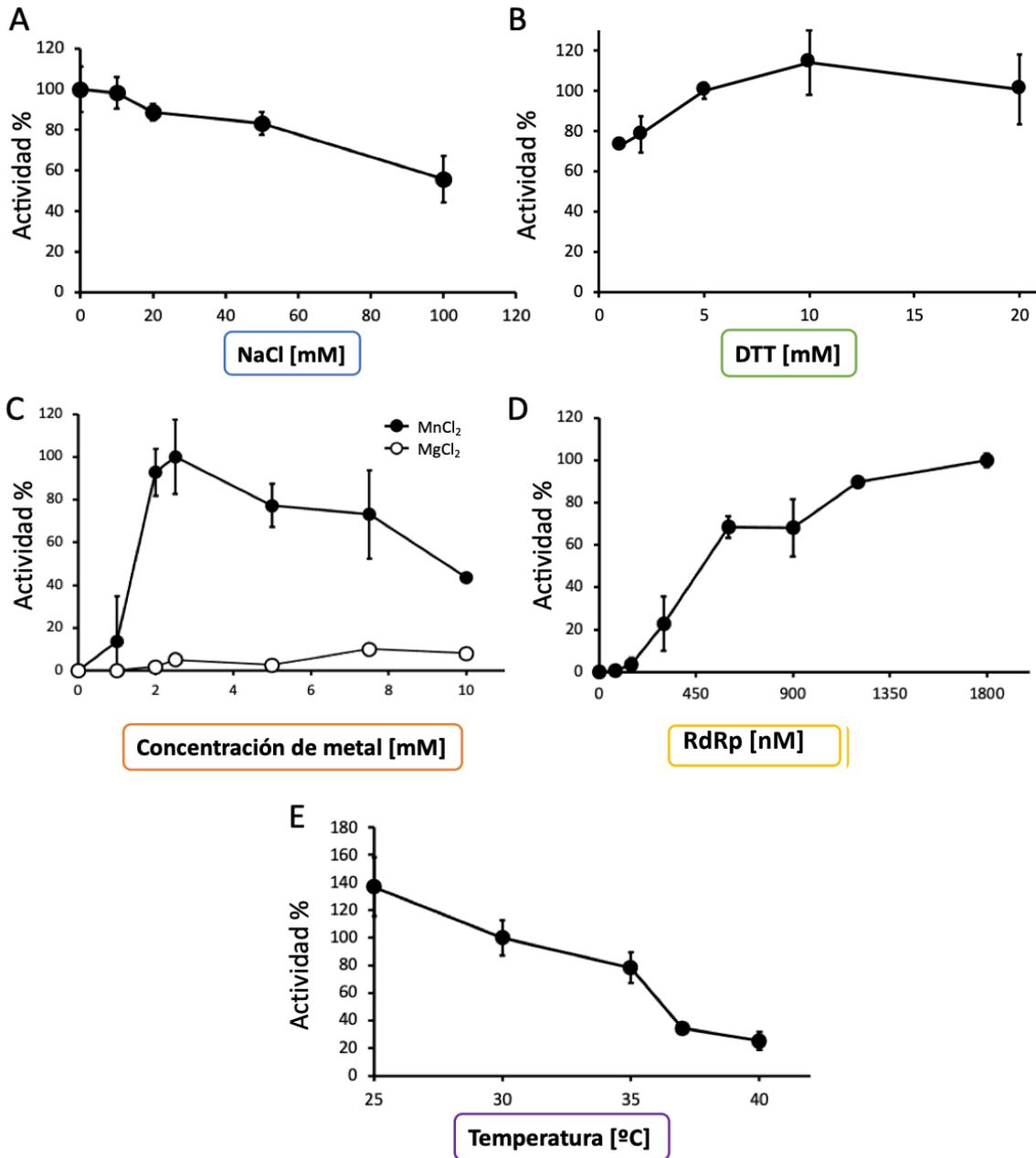
### 2.3 Optimización del ensayo de detección basado en la fluorescencia

Con el fin de optimizar el ensayo estándar de fluorescencia utilizando la WNV NS5 WT, se llevaron a cabo ensayos variando diferentes parámetros. Se varió la temperatura y concentraciones de los componentes de la reacción ( $NaCl$ , DTT,  $MnCl_2$  y enzima), manteniendo en cada caso, el resto de las condiciones fijas, de manera análoga a lo realizado con la proteína recombinante ZIKV NS5 WT.

La máxima actividad se obtuvo utilizando 2.5 mM de  $MnCl_2$ , mientras que ninguna de las concentraciones de  $MgCl_2$  utilizadas fue capaz de sustentar la actividad polimerasa medida como un aumento de fluorescencia (**Figura 30 C**) tal como sucedió previamente con ZIKV NS5 (**Figura 19 C**).

La presencia de  $NaCl$  sólo afectó ligeramente la actividad a altas concentraciones (**Figura 30 A**). Por otro lado, la presencia de DTT favorece la acción polimerasa de la enzima, exhibiendo su máxima actividad a 10 mM (**Figura 30 B**). Además, se estudió la importancia de la temperatura a la que se desarrolla el ensayo, demostrando afectar gravemente cuando se superan los 25°C (**Figura 30 E**). Se observó una correlación lineal

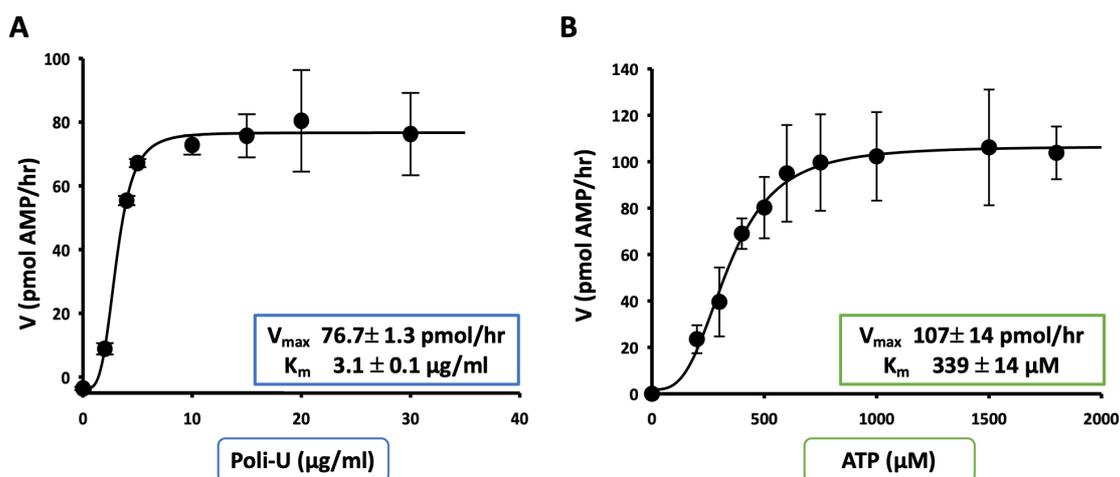
entre la velocidad de reacción y el aumento de la concentración de la enzima dentro del rango de 100-600 nM, alcanzándose la velocidad máxima en presencia de 180 nM de WNV NS5 WT (**Figura 30 D**).



**Figura 30:** Optimización de las condiciones bioquímicas para el ensayo basado en fluorescencia para WNV NS5 RdRp. Se examinó el efecto de las variaciones en la concentración de diferentes reactivos en el ensayo: **A)** Actividad en presencia de diferentes concentraciones de NaCl, **B)** Actividad en presencia de diferentes concentraciones de DTT, **C)** Actividad en presencia de diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub> o MnCl<sub>2</sub> (En el caso de un ensayo en presencia de MgCl<sub>2</sub>, la actividad fue relativa a una reacción estándar en presencia de 2.5 mM de MnCl<sub>2</sub>.) y **D)** Actividad en presencia de diferentes concentraciones de RdRp. Se representa en todos los casos la media y desviación estándar de tres experimentos independientes.

Finalmente, se realizaron ensayos de velocidad a concentraciones variables de poli-U y ATP para determinar los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  de WNV. Los resultados mostraron unos valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  para poli-U de  $3.1 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$  y  $76.7 \pm 1.3 \text{ pmol/h}$  respectivamente y unos valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  para ATP de  $339 \pm 14 \mu\text{M}$  y  $107 \pm 14 \text{ pmol/h}$  respectivamente (**Figura 31 A y B**).

Por lo que las condiciones óptimas del ensayo de fluorescencia para WNV NS5 WT son 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 2.5 mM  $\text{MnCl}_2$ , 500  $\mu\text{M}$  ATP, 1  $\mu\text{g/mL}$  poly-U, 0.1 mg/mL BSA, 10mM DTT y 0.25  $\mu\text{M}$  SYTO 9® (solución stock a 50  $\mu\text{M}$  en tampón TE pH 7.5).



**Figura 31:** Cinética de Michaelis-Menten (estado estacionario) de WNV RdRp usando un método basado en fluorescencia. (A) Representación gráfica para el cálculo de los parámetros cinéticos  $V_{max}$  y  $K_m$  del molde poli-U y (B) Representación gráfica para el cálculo de los parámetros cinéticos  $V_{max}$  y  $K_m$  del ATP. Cada valor representado, así como la desviación estándar se obtuvo mediante la medición de tres ensayos independientes. El procedimiento experimental para el cálculo de estas constantes se describe en el capítulo Materiales y Métodos.

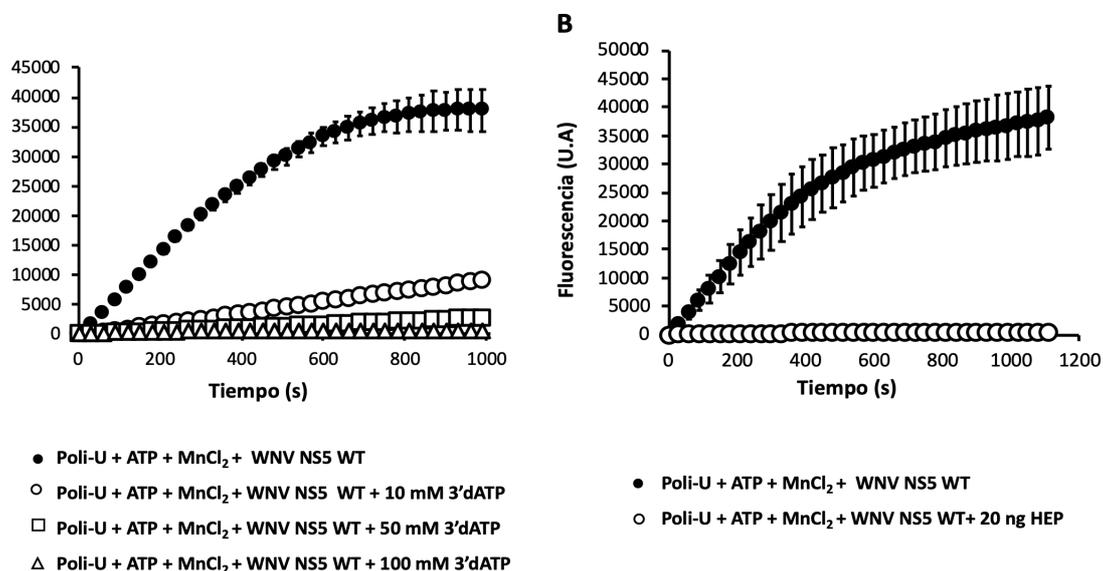
## 2.4 Actividad polimerasa en presencia de antivirales de amplio espectro

La sencillez y a la rapidez del método para determinar el potencial inhibitorio de un compuesto que reflejaron los resultados obtenidos con ZIKV NS5 RdRp (punto 1.4 de este capítulo) animó a poner a punto un sistema similar con la RdRp recombinante de WNV.

De manera similar a como se había realizado en el caso de ZIKV NS5 WT, inicialmente se llevaron a cabo ensayos de actividad con WNV NS5 WT en presencia de diferentes inhibidores modelo de polimerasa. Para agilizar el proceso, en este caso sólo se evaluó someramente la capacidad inhibitoria de la heparina y el 3'dATP. Se pudo observar que 3'dATP posee un efecto inhibitorio dependiente directamente de la concentración (**Figura 32 A**). En el caso de la heparina, se evaluó una única concentración (20 ng), que causó la total inhibición de la reacción (**Figura 32 B**).

Finalmente, se valoró el potencial de este ensayo para adaptarse a métodos de HTS para el cribado de posibles inhibidores de WNV NS5 RdRp. Para ello, se calculó valor  $Z'$  del ensayo, mediante la realización de 8 mediciones de actividad por triplicado y en días independientes, tal y como se describe en el punto 2.7 del capítulo Materiales y

Métodos. Tras los cálculos realizados a partir de los resultados obtenidos, se obtuvo un valor  $Z' = 0.65$ . Este valor, al ser mayor de 0.5 (J. H. Zhang et al., 1999), demuestra la idoneidad de este método fluorimétrico como un sistema adaptable a HTS para el cribado de compuestos con efecto inhibitorio frente a RdRp de WNV.



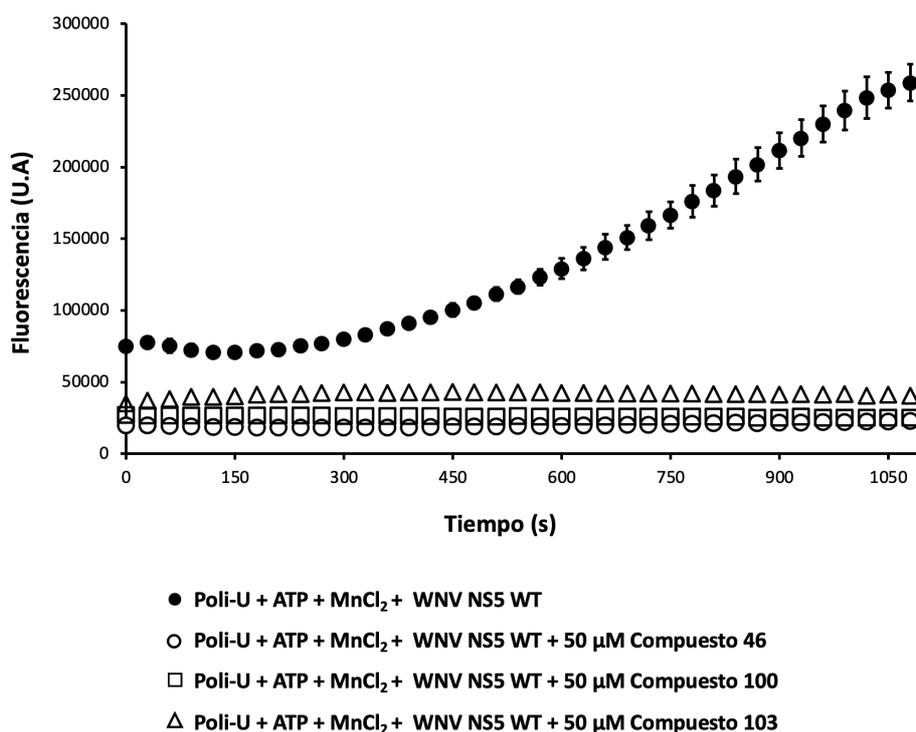
**Figura 32:** Representación gráfica de la actividad polimerasa de WNV NS5 RdRp en presencia de inhibidores tipo. **A)** Actividad de WNV NS5 WT en presencia de diferentes concentraciones crecientes de 3'dATP (10-100mM) comparadas con la reacción estándar (círculos negros). **B)** Actividad de WNV NS5 RdRp en presencia de 20 ng de heparina (círculo blanco) comparada con la reacción estándar (círculos negros). Se representan en todos los casos el valor medio y desviación estándar de tres replicas experimentales independientes.

## 2.5 Actividad polimerasa en presencia de los compuestos provenientes de la librería FLA-IQM

Para evaluar el potencial HTP de este ensayo, como prueba de concepto se sometió a muestreo la batería de compuestos "IQM\_FLA" cedidos por la Dra. María Jesús Pérez Pérez del "Grupo de Nucleósidos y Análogos" del Instituto de Química Médica (IQM-CSIC). Esta quimioteca se compone de 98 sintetizados para diversos fines no relacionados con la búsqueda de antivirales (Cuartas et al., 2019; Jiménez et al., 2018)

Durante el muestreo inicial, se midió el efecto inhibitorio de cada compuesto de la quimioteca FLA\_IQM a una concentración de 50  $\mu\text{M}$ . Tras el análisis, se seleccionaron 11 compuestos que inhibieron el incremento de fluorescencia durante el desarrollo completo de la reacción. Se realizó entonces un estudio pormenorizado de la capacidad inhibitoria de cada compuesto, utilizando el rango de concentraciones comprendido entre 1 y 50  $\mu\text{M}$ . En este segundo análisis se escogieron los tres compuestos que ejercieron la inhibición más potente: "IQM\_FLA\_43" (compuesto 43), "IQM\_FLA\_100" (compuesto 100) e "IQM\_FLA\_103" (compuesto 103) (**Figura 33**).

Posteriormente, se caracterizó el potencial inhibitorio de estos compuestos calculado sus  $\text{IC}_{50}$ . Los valores obtenidos fueron los siguientes:  $7.5 \pm 0.7 \mu\text{M}$  para el compuesto 46,  $7.2 \pm 0.7 \mu\text{M}$  para el compuesto 100, y  $7.2 \pm 0.7 \mu\text{M}$  para el compuesto 103.



**Figura 33:** Representación gráfica de la actividad polimerasa de WNV NS5 RdRp en presencia de los tres compuestos con mayor efecto inhibitorio de la quimioteca "IQM\_FLA". Se muestran las cinéticas de inhibición de los compuestos FLA\_046, FLA\_100 y FLA\_103 sobre la actividad enzimática de WNV NS5 WT en comparación con el ensayo estándar en ausencia de inhibidor (círculo negro). Los valores y desviaciones estándar representados son el resultado de tres medidas independientes.:

## 2.6 Actividad polimerasa en presencia de los compuestos 6 y 15

Teniendo en cuenta la alta homología de secuencia existente entre las polimerasas de *Flavivirus*, se decidió evaluar el posible efecto inhibitorio de los compuestos inhibitorios de ZIKV NS5 WT, 6 y 15, sobre la polimerasa de WNV NS5 WT. Para ello se calcularon las  $IC_{50}$  de estos compuestos, obteniéndose unos valores mayores que los obtenidos anteriormente ( $43.5 \pm 3.7 \mu M$  y  $81.3 \pm 13.4 \mu M$  para los compuestos 6 y 15, respectivamente).

### **3. Validación del método en otras polimerasas de interés clínico.**

#### **3.1 Virus de la Hepatitis C y Virus de la Fiebre aftosa**

A partir de la experiencia obtenida con la puesta a punto del sistema fluorimétrico para medir la actividad de dos polimerasas de *Flavivirus*, se decidió estudiar la versatilidad del método adaptándolo para la monitorizar la actividad de otras RdRps virales. Se eligieron polimerasas capaces de utilizar moldes homopoliméricos de ARN *in vitro* y pertenecientes a virus de alto interés clínico.

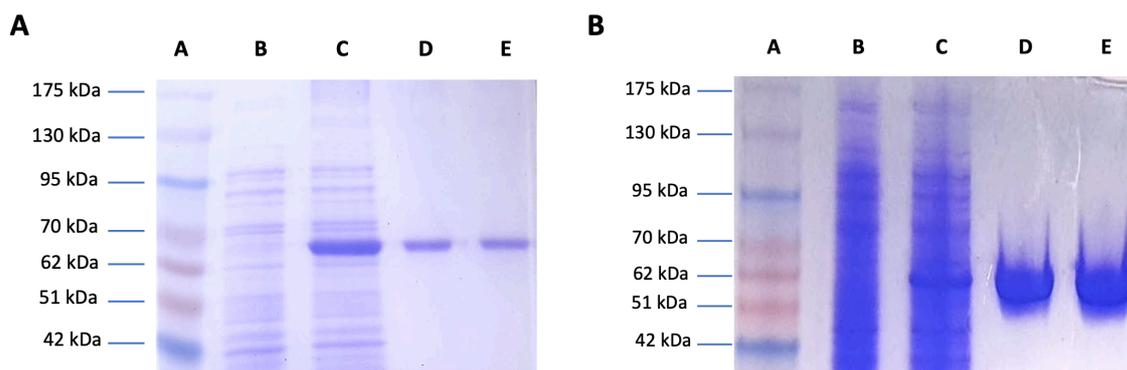
Una de esas RdRps fue la denominada NS5b, del virus de la Hepatitis C (HCV). Este virus pertenece a la misma familia vírica que el virus ZIKV y WNV, y su polimerasa comparte con ellas muchas características estructurales y bioquímicas, como la capacidad de síntesis de ARN *de novo* (Ferrari, He, Palermo, & Huang, 2008). Por lo tanto, se pensó que los requerimientos del ensayo de fluorescencia serían similares en ambos casos, lo que facilitaría su puesta a punto.

Para determinar la capacidad de la plataforma para medir actividad polimerasa en proteínas que no son capaces de realizar la síntesis *de novo*, se trabajó con la RdRp del virus de la fiebre aftosa (FMDV). Este virus perteneciente a la familia *Picornaviridae* tiene un alto impacto veterinario. Provoca la enfermedad denominada fiebre aftosa en animales de pezuña hendida, la cual se manifiesta con aftas o llagas en las pezuñas y boca del animal (Diaz-San Segundo, Medina, Stenfeldt, Arzt, & de Los Santos, 2017). Aunque la mortalidad de este virus no es muy alta, si lo es su morbilidad. Esto supone grandes pérdidas al sector ganadero de varios millones de euros (Knight-Jones & Rushton, 2013) puesto que actualmente no hay un tratamiento efectivo para detener la infección. Una de las principales características de la polimerasa de este virus es que es dependiente de iniciador proteico, denominado VPg. La polimerasa de FMDV, denominada 3D pol, cataliza la unión covalente de residuos UMP al péptido iniciador. Esto permite a la VPg ser utilizada como cebador de la reacción de síntesis mediante el reconocimiento de residuos de AMP en el extremo 3' del molde de ARN (Paul et al., 1998; Paul et al., 2003).

Con el fin de obtener la RdRp de HCV y la 3D pol de FMDV, se purificaron las proteínas recombinantes HCV NS5b WT y HCV NS5b GNN, así como la 3D-WT pol RdRp y 3D-D338A pol RdRp a partir de la sobreexpresión en células de *E. Coli* transformadas con los plásmidos pET16a-NS5bHCV y pET16a-NS5bHCV-GNN (**Figura 34 A**) y pET28a-NS5bHCV y pET28a-NS5bHCV-GNN (**Figura 34 B**).

La sobreexpresión y purificación de las proteínas codificantes para el dominio RdRp de HCV se realizaron siguiendo el protocolo empleado para ZIKV NS5 RdRp, tal y como se describe en los apartados 2.2.4 y 2.3.4 del capítulo Materiales y Métodos.

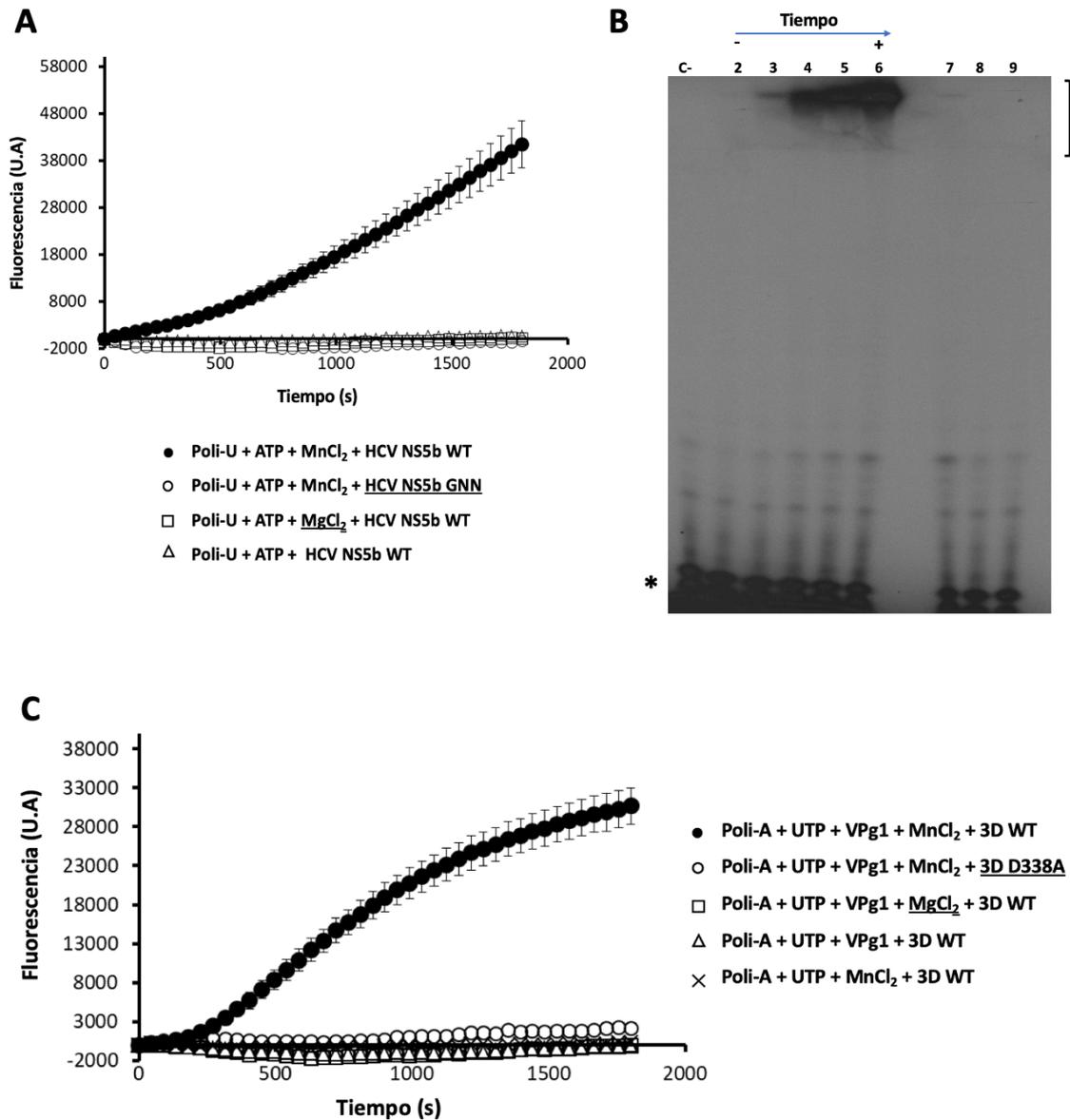
Por otro lado, La sobreexpresión y purificación de las proteínas correspondientes a la 3D pol RdRp de FMDV, se llevaron a cabo como se describe en los apartados 2.2.5 y 2.3.5 del capítulo Materiales y Métodos.



**Figura 34: Purificación de las polimerasas virales de HCV y FMDV. I) Expresión y purificación de HCV NS5b RdRp.** Resolución en gel de poliacrilamida al 10%. **A)** Marcador de peso molecular de proteínas "Pink Prestained Protein Marker", **B)** Sobrenadante total del cultivo no inducido **C)** Sobrenadante total del cultivo inducido con IPTG 500 $\mu$ M, donde se puede apreciar la banda correspondiente a la proteína, **D)** Purificación de HCV NS5b y **E)** Purificación de HCV NS5b GNN. **II) Expresión y purificación de 3D RdRp de FMDV.** Resolución en gel de poliacrilamida al 10%. **A)** Marcador de peso molecular de proteínas "Pink Prestained Protein Marker", **B)** Sobrenadante total del cultivo no inducido **C)** Sobrenadante total del cultivo inducido con IPTG 500 $\mu$ M, donde se puede apreciar la banda correspondiente a la proteína, **D)** Purificación de 3D WT pol y **E)** Purificación de 3D D338A pol.

Para medir la actividad polimerasa de la HCV NS5b WT, se realizó un ensayo con las condiciones estándar descritas para ZIKV NS5 WT (apartado 2.4.4. del capítulo Materiales y Métodos). En el caso de 3D WT, las condiciones de ensayo se ajustaron a partir de las descritas previamente (apartado 2.4.5. del capítulo Materiales y Métodos).

Como se observa en la **Figura 35** en los ensayos realizados con ambas polimerasas, la actividad solo pudo ser registrada cuando todos los componentes necesarios para la reacción se encuentran presentes, incluyendo la presencia del péptido VPg en el caso de 3D WT. Sin embargo, no se registró actividad cuando se utilizaron los mutantes catalíticamente inactivos de cualquiera de las dos RdRp recombinantes (HCV NS5b GNN y 3D D338A).



**Figura 35:** Representaciones gráficas de emisión de fluorescencia medida en tiempo real producida por HCV NS5b RdRp y FMDV 3D pol. **A)** Ensayo de polimerización medido por fluorescencia realizado con HCV NS5b RdRp. En la leyenda se indican subrayados los componentes, que, en cada caso, difieren de aquellos que se encuentran en la reacción estándar (circunferencias negras). Los valores representados están obtenidos a partir tres experimentos independientes. Aquellos componentes no indicados no estaban presentes en la reacción correspondiente. El resultado mostrado es la media y desviaciones estándar obtenidas a partir de tres experimentos independientes. **B)** Actividad de polimerasa de novo realizada por HCV NS5b RdRp recombinante en presencia de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP usando poli-U como molde. Cada carril representa una reacción detenida en un momento diferente (de 0 a 2 horas; carriles 2 a 6). Los ensayos de polimerización en presencia de MgCl<sub>2</sub> (carril 7), en ausencia de cualquier donante de metal (carril 8) o usando GNN mutante inactivo (carril 9) no mostraron actividad detectable. El carril 1 representa una reacción de control negativo en ausencia de enzima. La posición del nucleótido no incorporado marcado se indica (\*). **C)** Igual que A) con FMDV 3D pol.

### **3.2 Virus SARS-CoV-2**

El SARS-CoV-2 es un virus de la familia de los coronavirus humanos. Es causante de patologías gastrointestinales y respiratorias, las cuales pueden evolucionar a graves problemas respiratorios que comprometen la vida del paciente. La falta de información sobre el efecto de la vacunación a largo plazo por un lado, y de un tratamiento terapéutico aprobado hasta la fecha, por otro, hacen que el desarrollo de nuevos fármacos y el reposicionamiento de los existentes, sea una prioridad para combatir la pandemia mundial (V'kovski, Kratzel, Steiner, Stalder, & Thiel, 2021).

Como en la mayoría de los virus de ARN, SARS-CoV-2 posee una ARN polimerasa dependiente de ARN que es capaz de transcribir y replicar su genoma. Como otras muchas replicasas virales, la RdRp de los coronavirus forma complejos heteropoliméricos con otras proteínas no estructurales, creando el denominado complejo de replicación-transcripción (RTC), que son necesarios para llevar a cabo su función.

La proteína no estructural nsp12 es la RdRp de los coronavirus (Ahn, Choi, Taylor, & Oh, 2012) y es capaz de realizar la reacción de polimerización con una eficiencia extremadamente baja por sí sola, mientras que su unión con las proteínas accesorias nsp7 y nsp8 con las que forma el RTC, provoca un alto estímulo en su actividad, mejorando su rendimiento (Subissi et al., 2014).

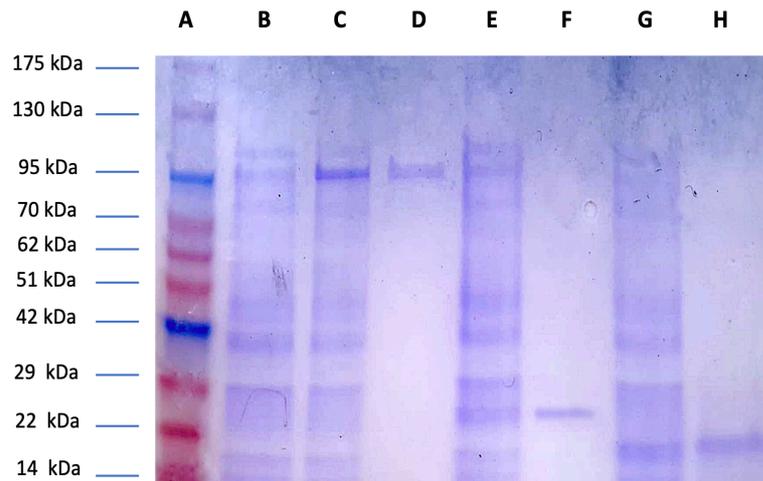
Así, la asociación de las proteínas nsp12, nsp7 y nsp8, conformaría el complejo replicativo mínimo con capacidad de producir la síntesis de ARN *in vitro*. Sin embargo, para lograr la transcripción y la replicación completa del genoma viral, se requieren otras proteínas no estructurales formando parte del RTC, como la nsp9, nsp10, nsp13, nsp14 y NSP16. Todas estas proteínas se ensamblan en el complejo RTC, formando una intrincada red de interacciones con diversas funciones (apartado 4.4 del capítulo Introducción), muchas de las cuales, se encuentran en estudio (Adedeji et al., 2012; Lehmann et al., 2015; Sevajol, Subissi, Decroly, Canard, & Imbert, 2014; Ziebuhr, 2005).

Como en otros virus de ARN, la RdRp de SARS-CoV-2 es altamente prometedora como diana de fármacos antivirales. Más aun teniendo en cuenta su alto grado de conservación, en comparación con las proteínas de membrana o de superficie del virus, que presentan mucha más variabilidad (Peng et al., 2020).

Por lo tanto, como objetivo adicional de esta Tesis doctoral, se decidió desarrollar un sistema de detección rápida por fluorescencia de la actividad polimerasa de SARS-CoV-2 para su posterior uso como plataforma de cribado de compuestos con potencial efecto antiviral.

### **3.3 Expresión y purificación del complejo replicativo de SARS-CoV-2**

La sobreexpresión y purificación de las proteínas recombinantes de del SARS\_CoV\_2 NSP12, NSP7 y NSP8 se realizó como se describe en el apartado 2.2.3 del capítulo Materiales y Métodos (**Figura 36**).



**Figura 36: Expresión y purificación del complejo replicativo de nsp7, nsp8 y nsp12 de SARS-CoV-2.** Resolución de las proteínas recombinantes purificadas en gel de poliacrilamida al 10%. **A)** Marcador de peso molecular de proteínas "Pink Prestained Protein Marker". **B)** y **C)** Extracto soluble de cultivo de bacterias transformadas con plásmido pET28a-SARS-CoV2-Nsp12 sin inducir (**B**), o tras 24 h de inducción con IPTG 500  $\mu\text{M}$  (**C**). **D)** proteína nsp12 purificada. **E)** Extracto soluble de cultivo de bacterias transformadas con plásmido pET28a-SARS-CoV2-Nsp8 tras 24 h inducido con IPTG 500  $\mu\text{M}$ . **F)** Proteína nsp8 purificada. **G)** y **H)** Igual que (**E**) y (**F**) utilizando pET28a-SARS-CoV2-nsp7 y nsp7, respectivamente.

### 3.4 Detección de la actividad polimerasa a tiempo real

En la puesta a punto de un sistema de detección de la actividad polimerasa de NSP12 basado en fluorescencia, se tuvo en cuenta su necesidad de utilizar proteínas accesorias para mostrar actividad *in vitro* (Subissi et al., 2014) y que además, esta actividad es dependiente de un ARN iniciador (te Velthuis et al., 2010). Por lo tanto, se tuvieron que realizar ciertas modificaciones con respecto a los ensayos con moldes homopoliméricos empleados para medir la síntesis de ARN en la presente Tesis Doctoral.

Para minimizar el efecto de la fluorescencia basal producida por la presencia de un complejo molde-iniciador de ARN<sub>bc</sub> en el ensayo y optimizar el incremento de fluorescencia debido a la síntesis, se escogió un complejo denominado sym/sub (SS) (Arnold & Cameron, 2000). Se trata de moléculas de ARN que, por secuencia, aparean con otras igual que ellas. De este modo, generan una estructura de doble cadena, que puede ser utilizada como complejo molde-iniciador, con dos extremos de cadena sencilla, que pueden ser elongados (**Figura 37**).

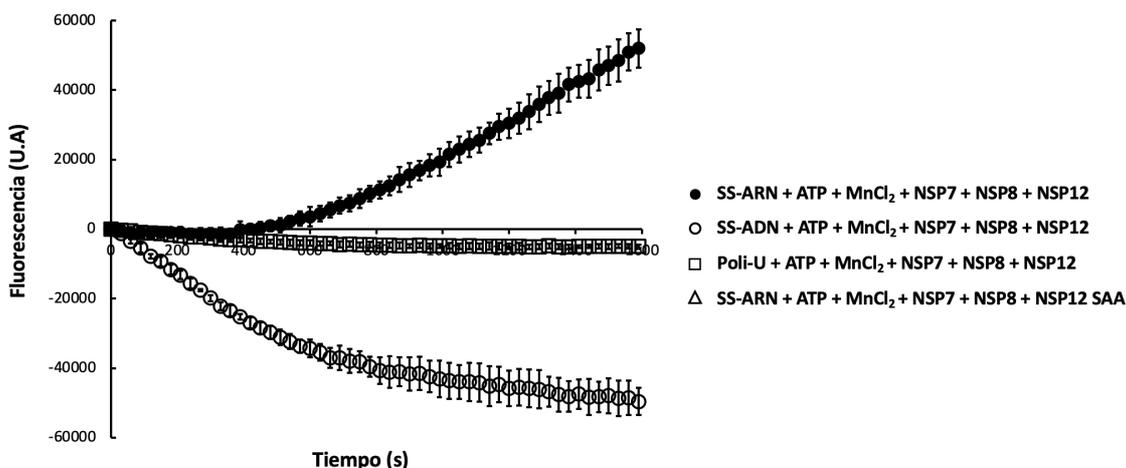
El SS de ARN (SS-ARN) empleado contiene dos trectos de 21 residuos de uridina, lo cual lo hace semejante a los moldes homopolimérico empleados tanto para ZIKV NS5 como para WNV NS5. De esta manera, se pretendió mantener unas condiciones similares en el uso de componentes entre los diferentes ensayos.



Para evaluar la dependencia de la RdRp nsp12 SARS-CoV-2 de un complejo molde-iniciador de ARN para ejercer su actividad polimerasa, se realizaron ensayos adicionales con distintos moldes de ácidos nucleicos. El uso de un molde homopolimérico de poli-U no permitió la detección de fluorescencia del complejo NSP12-NSP7-NSP8, tanto en presencia de  $Mg^{2+}$ , como de  $Mn^{2+}$  (**Figura 39**). Adicionalmente, se realizó un ensayo de polimerización en presencia de un molde SS con la misma secuencia que el SS-ARN (anteriormente descrito), pero compuesto por desoxirribonucleótidos (SS-ADN) (**Figura 39**). Como resultado, no se observó incremento de fluorescencia en presencia de este molde-iniciador de acuerdo con los resultados obtenidos previamente con la polimerasa de SARS-CoV-1 por (te Velthuis et al., 2010).

Finalmente, para comprobar que el aumento de fluorescencia se debía específicamente a la actividad enzimática de la nsp12, se realizó un ensayo utilizando una proteína recombinante nsp12 con los cambios D760A y D761A (enzima nsp12-SAA), que modifican los dos residuos catalíticos del motivo C de la polimerasa nsp12. De acuerdo con lo esperado, no se observó ningún incremento de fluorescencia durante todo el tiempo de ensayo (**Figura 39**).

Todos estos resultados indican que el incremento de fluorescencia observado en los ensayos realizados complejos molde-iniciador de ARN y las proteínas nsp12, nsp7 y nsp8, se debe a la actividad ARN polimerasa dependiente de ARN de la proteína nsp12.



**Figura 39:** Representación gráfica de la cinética de emisión de fluorescencia en presencia de distintos componentes. Ensayo de polimerización estándar medido por fluorescencia realizado con proteínas recombinantes de SARS-CoV-2. En la gráfica se representa el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes de actividad en presencia de los reactivos mostrados de la leyenda

Se realizaron ensayos adicionales de actividad medida por fluorescencia en presencia de  $MgCl_2$  para comprobar si el  $Mg^{2+}$  pudiera ser utilizado como metal catalítico en la reacción. se comprobó que sí que existía un incremento de fluorescencia con respecto al tiempo, a diferencia de lo que ocurre con las RdRp recombinantes de ZIKV y WNV. Con el objetivo de fijar las condiciones óptimas de reacción, se llevaron a cabo ensayos en presencia de diferentes concentraciones de  $MnCl_2$  y  $MgCl_2$ . Las concentraciones ensayadas de  $Mn^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  en las que se observó un mayor incremento de fluorescencia

fueron 1 y 2 mM, respectivamente. En ambos casos las concentraciones altas de metal provocan disminuciones en la actividad.

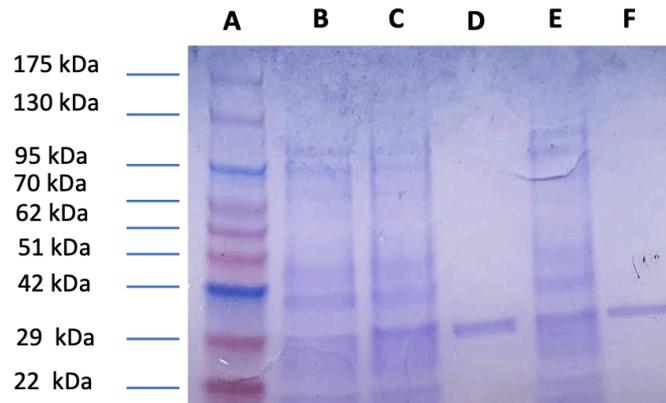
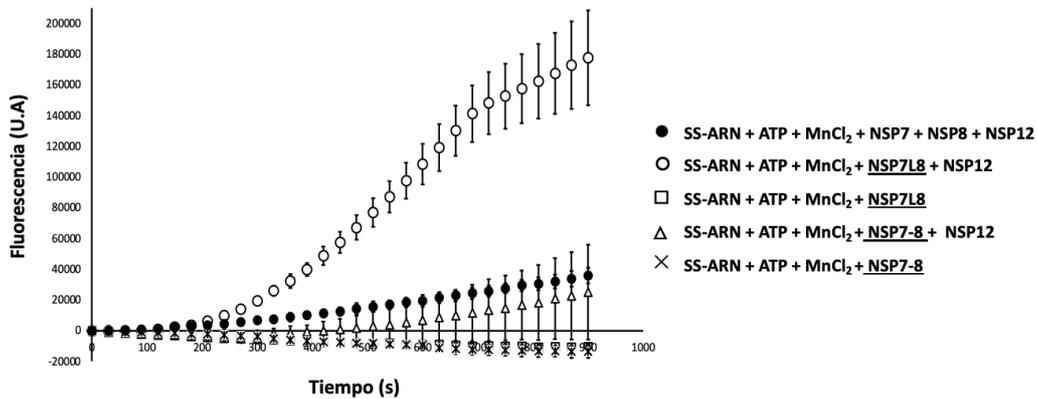
Estudios previos realizados con proteínas recombinantes de SARS-CoV (Subissi et al., 2014) sugieren que el hecho de necesitar un complejo replicativo mínimo formado por tres proteínas diferentes (nsp12, nsp7 y nsp8) puede ser un factor limitante para la obtención de una alta actividad polimerasa *in vitro*. Para intentar minimizar este problema, Subissi *et al.* crearon dos tipos de constructos genéticos donde ambas proteínas se expresan fusionadas. Uno de los constructos presentaba una región separadora donde el extremo C-terminal de nsp7 estaba unido al extremo N-terminal de nsp8 proteína nsp8 a través de 6 residuos de glicina (proteína denominada nsp7L8). El otro constructo no presentaba separación entre nsp7 y nsp8 (proteína nsp7-8) (Subissi et al., 2014). Se demostró en estos estudios que nsp7L8 estimulaba la actividad polimerasa de nsp12 mucho más que la presencia combinada de nsp7 y nsp8, mientras que el complejo nsp12 y nsp7-8 no mostró actividad polimerasa (Subissi et al., 2014).

Para testar el efecto que podría tener el uso de estos constructos en el sistema de fluorescencia, se construyeron las proteínas quiméricas nsp7-8 y nsp7L8 a partir de la secuencia de SARS-CoV-2 y se purificaron siguiendo el protocolo descrito en apartado 2.3.3 del capítulo Materiales y Métodos (**Figura 40 B**).

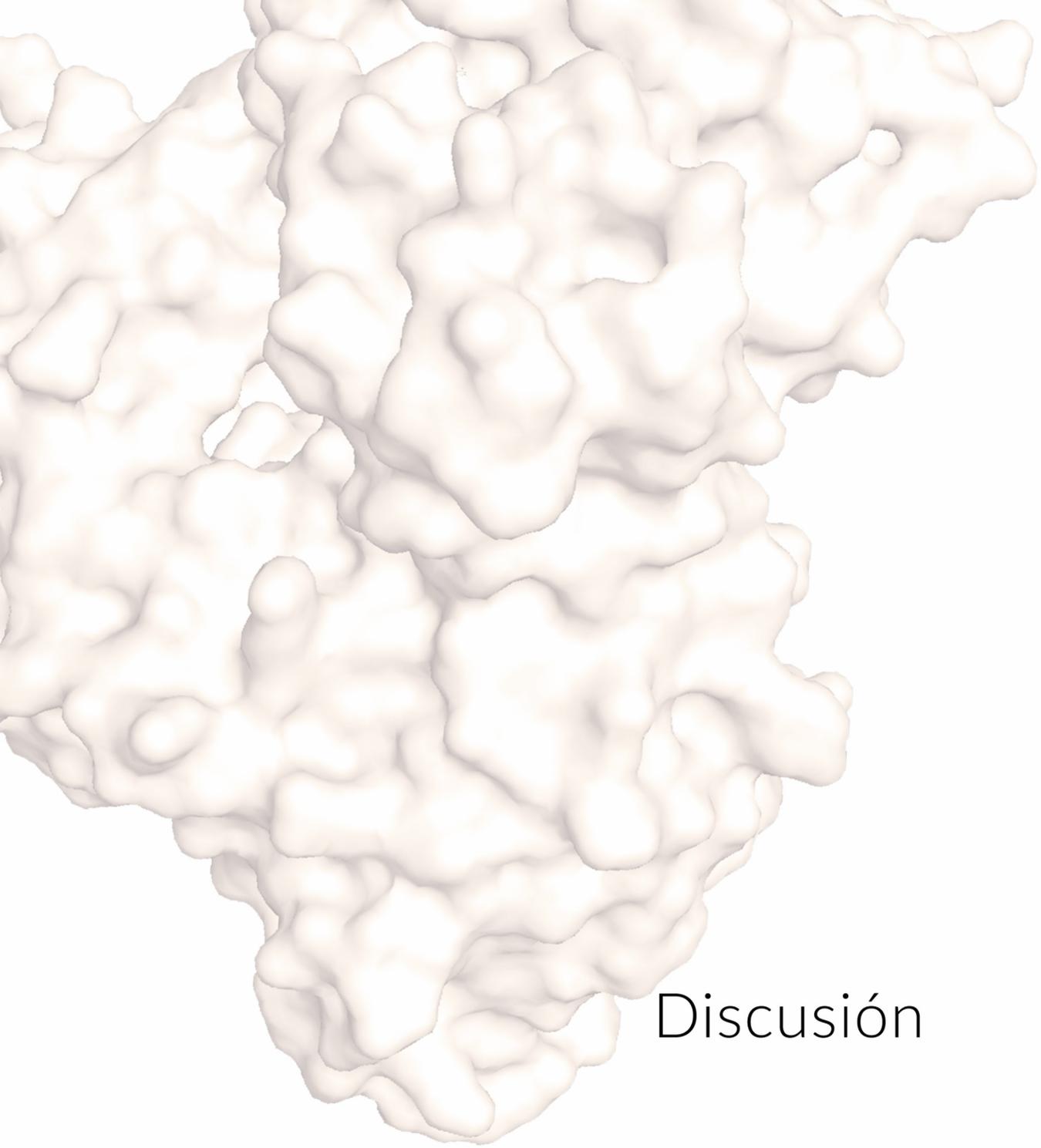
Se llevaron a cabo reacciones de polimerización en presencia de nsp12 y los diferentes constructos utilizados como proteínas accesorias. Como puede observarse en la **Figura 40**, la presencia del constructo nsp7L8 empleado como proteína accesoria, estimuló la actividad de nsp12 reflejado como un aumento de fluorescencia, superior al observado cuando en la reacción se incorporan las proteínas accesorias nsp7 y nps8.

Estos datos están en consonancia con lo observado anteriormente en el caso de SARS-CoV. Además, indican que el uso de nsp7L8 podría facilitar la puesta a punto de una plataforma para medir la actividad polimerasa por fluorescencia, mediante la utilización de una combinación de dos proteínas (nsp12 y nsp7L8) en lugar de tres (nsp12, nsp7 y nsp8).

Los resultados obtenidos, aunque se encuentran en una fase inicial de desarrollo y han de ser corroborados por ensayos bioquímicos adicionales, indican que el sistema de medida basado en fluorescencia de actividad de nsp12 de SARS-CoV-2, podría ser un método prometedor para el muestreo de manera rápida de compuestos con actividad inhibitoria frente a esta proteína.

**A****B**

**Figura 40: A) Expresión y purificación del complejo replicativo de SARS-CoV-2.** Resolución en gel de poliacrilamida al 10% **A)** Marcador de peso molecular de proteínas “Pink Prestained Protein Marker”, **B)** Sobrenadante total del cultivo no inducido **C)** Sobrenadante total del cultivo inducido con IPTG 500mM, donde se puede apreciar la banda correspondiente a la proteína nsp7-8, **D)** Purificación de la proteína quimérica nsp7-8 **E)** Sobrenadante total del cultivo inducido con IPTG 500mM, donde se puede apreciar la banda correspondiente a la proteína nsp7L8, **F)** Purificación de la proteína quimérica nsp7L8. **B)** Representación gráfica de la cinética de emisión de fluorescencia registrada durante 15 min para la nsp12 en conjunto con diferentes construcciones proteicas de las nsp7 y nsp8. La gráfica se encuentra representada como el promedio de tres experimentos independientes en presencia de los reactivos que se pueden observar en la leyenda inferior.



Discusión

## VI. DISCUSIÓN

Los virus de ARN, además de ser los más abundantes de la virosfera, son causantes de un gran número de enfermedades infecciosas en humanos, animales y plantas. La reaparición de varios virus patógenos en la última década, para los cuales no se dispone de un tratamiento antivírico específico, subraya la necesidad de hallar antivirales potentes que sean capaces de combatir las infecciones. De hecho, los medicamentos antivirales que están disponibles para el tratamiento específico de ciertas enfermedades, se reducen a un número limitado de virus como por ejemplo: el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), el virus de la hepatitis B (HBV) o el virus de la hepatitis C (HCV) (Delang, Abdelnabi, & Neyts, 2018). Aun así, aunque sean tratadas, las infecciones producidas por estos virus en la mayoría de los casos conducen a una enfermedad crónica persistente (Nelemans & Kikkert, 2019).

La distribución de los virus de ARN es cada vez más extensa (Pierson & Diamond, 2020). El hacinamiento urbano, los viajes internacionales generalizados y la invasión humana en áreas no desarrolladas en los trópicos, han actuado en concierto con la adaptabilidad ambiental de muchos de estos virus. Estos factores han aumentado su distribución, culminando en recientes emergencias sanitarias (Fauci & Morens, 2016; Salzberger et al., 2021; Weaver et al., 2016; Weaver & Reisen, 2010). Este hecho se encuentra notablemente evidenciado en aquellos virus, como el virus del Zika (ZIKV), el virus del Nilo occidental (WNV), el virus del Dengue (DENV) y el virus del Chicungunya CHIKV, que son transmitidos por artrópodos y capaces de producir zoonosis (Weaver & Reisen, 2010).

Los fármacos antivirales más prometedores se centran en la inactivación directa de proteínas estructurales (Yu et al., 2013) y la inhibición de enzimas imprescindibles para la transcripción y replicación viral, como son las proteasas y las polimerasas de ARN dependientes de ARN (RdRp) (Kiser & Flexner, 2013; Vilas Boas, Campos, Berlanda, de Carvalho Neves, & Franco, 2019). Estas últimas, no solo son responsables de la replicación viral, sino también de la evolución genética de los virus (Selisko, Papageorgiou, Ferron, & Canard, 2018). Las polimerasas de los virus de ARN muestran una alta tasa de error durante la replicación debido a su baja fidelidad (Selisko et al., 2018) y la ausencia de actividad correctora de errores (Picarazzi et al., 2020). Así, estas polimerasas son el principal agente de la gran variabilidad que presentan los genomas de ARN, lo cual dificulta la obtención de un tratamiento eficaz frente a los virus con este tipo de material genético. Por otro lado, debido al papel fundamental que desarrollan en el ciclo de replicación viral, las RdRp son enzimas altamente conservadas entre virus de ARN.

Todo ello, junto con la ausencia de una proteína homóloga en células de mamíferos y el amplio conocimiento sobre su estructura y función, las convierte en una diana preferente para el desarrollo y descubrimiento de nuevos fármacos antivirales (de Farias, Dos Santos Junior, Rêgo, & José, 2017).

A partir de estas premisas, el objetivo de la presente tesis doctoral ha sido el desarrollo de sistemas basados en fluorescencia sencillos, rápidos y eficaces para la búsqueda y cribado de compuestos con potencial efecto inhibitorio de la actividad polimerasa de las

RdRps de ZIKV y WNV. Además, la puesta a punto y el desarrollo de este método ha puesto las bases para la exportación de este a otros sistemas replicativos de virus ARN como son; el virus de la fiebre aftosa (FMDV), HCV y el SARS-CoV-2.

**1. El ensayo fluorométrico desarrollado es capaz de medir la actividad polimerasa a tiempo real.**

El sistema desarrollado durante la presente tesis doctoral se ha adaptado a partir del método de detección de síntesis de ADNbc realizado por la primasa-polimerasa humana PrimPol (Agudo et al., 2017). Este se basa en la unión de un colorante fluorescente con la doble hélice de ácido nucleico que se genera por la actividad enzimática de la polimerasa. La interacción del colorante con el ácido nucleico provoca un aumento medible de la fluorescencia emitida por el fluoróforo.

Las mediciones fluorométricas de la actividad polimerasa de ZIKV NS5 RdRp realizadas en presencia y ausencia de los componentes esenciales para la reacción, así como utilizando una polimerasa recombinante catalíticamente inactiva, indicaron que el incremento de fluorescencia observado se correlaciona con la polimerización de ARN de doble cadena producido por la polimerasa. Esta observación además está de acuerdo con resultados obtenidos utilizando un ensayo tradicional de síntesis de ARN basado en la incorporación nucleótidos radioactivos (Comparativa entre la **Figura 15 Ay B** con la **Figura 18 B**)

Diversos autores han afirmado que las polimerasas de los virus pertenecientes a la familia *Flaviviridae* son capaces de emplear moldes homopoliméricos de ARN como un sustrato eficiente para la polimerización (Ackermann & Padmanabhan, 2001; Steffens, Thiel, & Behrens, 1999; H. T. Xu, Hassounah, et al., 2017).

Para determinar el molde homopolimérico más efectivo para la actividad de ZIKV NS5 RdRp, se ensayaron diferentes condiciones experimentales, incluyendo el uso de diferentes concentraciones tanto de SYBR Green II como de SYTO 9® como agentes intercalantes. Se comprobó que el molde de poli-U era el único que permite medir la actividad polimerasa en tiempo real en el ensayo de fluorescencia. Contrariamente a lo descrito anteriormente en ensayos medidos a tiempo final o de radioactividad, (Beerens et al., 2007; Ranjith-Kumar, Gutshall, Kim, Sarisky, & Kao, 2002; Tilgner & Shi, 2004) el molde de ARN homopolimérico poli-C, no era un sustrato adecuado para la detección de la actividad polimerasa en los ensayos de fluorescencia medidos en tiempo real. Sin embargo, este ARN sí puede ser utilizado como molde en ensayos medidos a tiempo final utilizando nucleótidos marcados radiactivamente. Este hecho podría estar relacionado con la formación de estructuras G-cuádruplex no canónicas como resultado de la replicación de un molde de poli-C (Fay, Lyons, & Ivanov, 2017). Es posible que esta estructura altamente estable dificulte el acceso del agente intercalante. Por otro lado, como se observa en la (**Figura 17 B**), existe una pequeña incorporación de fluoróforo en los ensayos de fluorescencia medidos a tiempo final. Por tanto, podría ser posible que la unión del fluoróforo en este ARN impidiera la elongación de la polimerasa y el posterior registro del incremento de fluorescencia en tiempo real. Sin embargo, en los ensayos medidos a tiempo final, el agente intercalante podría incorporarse a una estructura de ARNbc ya formada.

Diferentes estudios han demostrado que un exceso del intercalante SYBR Green I (el cual se encuentra químicamente relacionado con el SYBR Green II) puede inhibir la actividad polimerasa, de enzimas como la Taq (Driscoll, Rentergent, & Hay, 2014) o la PrimPol humana (Agudo et al., 2017). De acuerdo con estos datos, el resultado obtenido en el ensayo demostró una inhibición de la actividad polimerasa cuando un exceso del intercalante SYBR Green II se encontraba presente en la reacción. Por el contrario, el SYTO9® resultó ser un fluoróforo adecuado para este tipo de reacciones, puesto que la fluorescencia acumulada al final de una reacción medida en tiempo real (unión del fluoróforo durante la creación de ARNbc) era similar a la fluorescencia observada en una reacción medida a tiempo final (unión del fluoróforo tras la creación de ARNbc), cuando se empleaba este intercalante (**Figura 17 C y D**).

Todos estos resultados, se tuvieron en cuenta a la hora de poner a punto un sistema similar basado en fluorescencia para medir la actividad polimerasa de la RdRp de WNV. Las RdRp de la familia *Flaviviridae* comparten un alto grado de homología en su estructura y función (Lim et al., 2013), por lo tanto, el trabajo con la WNV NS5 RdRp se llevó a cabo con condiciones experimentales similares ya descritas para la polimerasa de ZIKV. En estas condiciones, se observó una gran similitud en los requerimientos enzimáticos de ambas polimerasas en los ensayos flurométricos, incluyendo el uso específico de un molde de poli-U, o el uso de  $MnCl_2$  como donador de metal (**Figura 19 y Figura 30**)

La alta reproducibilidad observada en el método puesto a punto permitió calcular los parámetros cinéticos  $V_{max}$  y la  $K_m$ , de los sustratos poli-U y el ATP, tanto de la RdRp de ZIKV como la de WNV. Los gráficos demostraron que las enzimas siguen un modelo ajustable a la cinética de *Michaelis-Menten* en el caso del poli-U. Sin embargo, en cinéticas de estado estacionario para el ATP, la gráfica muestra una forma sigmoidea similar a la que presentan otras polimerasas del género *Flaviviridae*, como las de HCV, BVDV (Virus de la diarrea viral bovina), DENV y WNV (Selisko et al., 2006) y que es característico de enzimas multiméricas.

Se ha demostrado *in vitro* que la polimerasa de HCV requiere una concentración mucho más alta de nucleótidos durante el inicio de la síntesis *de novo* que durante la elongación del ARN. Durante esta elongación la  $K_m$  de la RdRp por el nucleótido es mucho más baja (Ferrari et al., 2008). Este hecho justificaría la obtención de una cinética sigmoidea de velocidad, en la que la reacción global polimerización (como suma de la iniciación más la elongación) es ineficiente hasta alcanzar una concentración mínima necesaria de ATP para que se produzca una la iniciación *de novo* eficiente que dé paso a una tapa rápida de elongación (**Figura 20 y Figura 31**).

Es probable que la estructura del extremo del ARN genómico, así como la interacción con otras proteínas virales disminuya la  $K_m$  de la polimerasa *in vivo*, incrementando la eficiencia del proceso de síntesis *de novo* en las células infectadas por HCV, y que algo similar ocurra en el caso de las infecciones por ZIKV.

## **2. El ensayo fluorométrico puede ser empleado como plataforma de cribado de compuestos.**

El ensayo a tiempo real de la actividad polimerasa fue puesto a punto empleando como soporte placas preparadas para medir fluorescencia en formato de 96 pocillos. Este formato permite medir de manera rápida y simultánea la actividad polimerasa en aproximadamente 100 reacciones. Los resultados obtenidos, permitieron plantear la utilización de este ensayo como un sistema de cribado de alto rendimiento o *High-throughput Screening* (HTS) para la evaluación de diferentes compuestos en pocos minutos permitiendo la identificación de inhibidores virales frente a las polimerasas de dos virus de gran importancia sanitaria como son ZIKV y WNV.

Como parte del ajuste del ensayo para poder ser utilizado como método de cribado, se llevaron a cabo experimentos con inhibidores modelo. Se observó, que RTP (ribavirina 5'-trifosfato), un análogo de purina no terminador de la síntesis de ácidos nucleicos que ha sido descrito como inhibidor de varios virus (Arias et al., 2008; Crotty et al., 2000; Maag et al., 2001; Sierra et al., 2007), inhibe la polimerización de ZIKV NS5 RdRp *in vitro* (**Figura 21**), lo que está de acuerdo con el efecto antiviral observado en infecciones virales de ZIKV tratadas con este compuesto (Bassi, Sempere, Meyn, Polacek, & Arias, 2018). De una manera similar a lo previamente descrito para WNV NS5 RdRp (Chowers et al., 2001; Hrnicek & Mailliard, 2004; Morrey et al., 2004), la inhibición ejercida por RTP podría deberse a la dificultad que la enzima puede encontrar para incorporar un nuevo nucleótido tras el residuo de RMP (ribavirina monofosfato) recién incorporado en el ARN. Asimismo, el uso de la cordicepina 5'-trifosfato (3'dATP) catalogado como un análogo de ATP con capacidad de terminación de la síntesis de ácidos nucleótidos en varias polimerasas, demostró una disminución de la actividad polimerasa proporcional al aumento de la concentración del 3'ATP, tal y como ocurre en otros sistemas virales (Becker & Olshevsky, 1973; Bibi, Hasan, Wang, Papadakos, & Yu, 2021; Müller et al., 1991).

Los valores de inhibición obtenidos mostraron que RTP es capaz de inhibir la reacción menos eficazmente que 3'dATP, probablemente debido a la mayor similitud que este último compuesto presenta con respecto al ATP utilizado como sustrato (**Figura 21 C**).

Una vez determinada la capacidad del ensayo fluorimétrico para medir el efecto inhibitorio de compuestos modelo, se examinó la solidez e idoneidad de los métodos descritos con la idea de ser utilizados como plataformas prospectivas de alto rendimiento que seleccionen compuestos inhibitorios de la actividad polimerasa. De este modo, se calculó el valor Z' del ensayo, una medida estadística estándar para evaluar la calidad de las plataformas de muestreo de alto rendimiento (J. H. Zhang et al., 1999). Los resultados obtenidos en los ensayos realizados con ambas enzimas fueron superiores a 0.5, (0.62 para ZIKV NS5 y 0.65 para WNV NS5) lo que de acuerdo con (J. H. Zhang et al., 1999), significa que ambas plataformas son de una calidad excelente para evaluar el efecto inhibitorio de cientos o miles de candidatos frente a la actividad de estas proteínas. Esto es debido a la gran diferencia y alta reproducibilidad existente entre la obtención de un resultado negativo ("compuesto no inhibitorio") y un resultado positivo ("compuesto inhibitorio") que se observaría durante la realización de un cribado de compuestos con potencial inhibidor.

## 2.1 Compuestos antivirales: nuevos horizontes en su descubrimiento y cribado

Varios estudios sobre el efecto antivírico de los inhibidores análogos de nucleósidos (IAN) contra la actividad RdRp han arrojado resultados prometedores, como es el caso del sofosbuvir (A. C. Ferreira et al., 2017), la ribavirina (Kamiyama et al., 2017), el favipiravir (Kim, Seong, Kumar, & Shin, 2018) y el Remdesevir (Angamo, Mohammed, & Peterson, 2021; Beigel et al., 2020; Jockusch et al., 2020) además de los ya catalogados como inhibidores de amplio espectro (Julander et al., 2017). Sin embargo, las terapias que están basadas en estos IAN presentan desafíos que deben ser salvados para la correcta administración de este tipo de sustancias (Slusarczyk et al., 2018). El principal de ellos reside en el estado químico del fármaco, puesto que para que puedan actuar correctamente deben ser administrados en forma de profármacos. Estos compuestos al ser altamente hidrofílicos no son capaces de atravesar la membrana plasmática. Para conseguir que los IAN penetren correctamente en la célula, deberán ser activados mediante fosforilaciones en el interior celular, complicando así su modo de acción (Balimane & Sinko, 1999; Wiemer & Wiemer, 2015). Además, estos profármacos no son ideales para ser suministrados por vía oral (requisito casi indispensable para la normalización de la vida del paciente cuando sufre una enfermedad crónica), puesto que la cantidad disponible del mismo en el lugar de acción se encuentra limitada (Hecker & Erion, 2008).

Alternativamente y aunque sus limitaciones son semejantes a las anteriormente descritas, los inhibidores no análogos de nucleósidos (INAN) que actúan de forma alostérica, constituyen una opción interesante que puede beneficiarse de la combinación con los IAN (Gharbi-Ayachi et al., 2020; Y. Lin et al., 2019; Yang et al., 2018).

Con esta premisa, como prueba de principio de las capacidades de la plataforma de cribado puesta a punto para la RdRp de ZIKV, se llevó a cabo el muestreo de una quimioteca de compuestos de acceso libre cedida por la empresa GSK que cuenta con aproximadamente 600 compuestos catalogados como antiparasitarios (Peña et al., 2015). Durante este cribado se encontraron dos de ellos, compuestos 6 y 15, que anularon completamente la actividad polimerasa de ZIKV NS5 asociada a la fluorescencia (**Figura 23**).

El hallazgo de estos dos compuestos ha sido un fenómeno similar al denominado reposicionamiento de medicamentos. Éste consiste en reutilizar un compuesto farmacéutico activo que ya está en el mercado para una nueva indicación. Esta estrategia tiene una serie de inconvenientes y ofrece ciertos desafíos, pero también posee muchas ventajas, que incluyen la disminución en el tiempo de validación y el ahorro en costes derivados de los ensayos relacionados con el descubrimiento de nuevos fármacos (Jourdan, Bureau, Rochais, & Dallemagne, 2020; Pushpakom et al., 2019). En este caso, aunque los compuestos de la quimioteca de acceso abierto de GSK no están validados para su uso humano, su reutilización con otros fines terapéuticos supone un ahorro y optimización en el diseño y síntesis de nuevas moléculas.

Los ensayos adicionales para caracterizar en profundidad la inhibición de estos dos compuestos indicaron que 6 y 15 ejercían una inhibición no competitiva y mostraron un efecto antagonista entre ellos (**Figura 25**). Ambas características son compatibles con la

unión de ambos inhibidores a un mismo sitio regulador alostérico de la enzima. La identificación de sitios alostéricos capaces de inhibir la acción polimerasa de esta familia vírica fue inicialmente descrita en la RdRp de DENV (Lim et al., 2016). Se observó que uno de los sitios alostéricos con mayor importancia para la acción de compuestos con actividad inhibitoria de la polimerización es el denominado bolsillo N, que se encuentra situado entre los subdominios de la palma y el pulgar, cerca del *priming loop* y del centro activo de la enzima (Lim et al., 2016).

Diversos estudios han demostrado que este bolsillo podría ser un objetivo potente para los INAN en diferentes polimerasas del género Flavivirus. Así, diversos ensayos en cultivos celulares han demostrado que la unión de distintos INAN en este sitio de regulación disminuye la actividad polimerasa, incluso a bajas concentraciones (Gharbi-Ayachi et al., 2020; Lim, Noble, Nilar, Shi, & Yokokawa, 2018; Lim et al., 2016).

Considerando todo lo anteriormente descrito, se planteó la posibilidad de que los compuestos 6 y 15 pudieran tener afinidad también por este bolsillo. A partir de esta hipótesis, se construyeron varios mutantes (**Figura 26** y **Figura 27**) para la ZIKV NS5 RdRp con cambios en algunos de los aminoácidos que conforman esta región. Los residuos fueron seleccionados a partir de estudios bioinformáticos realizados por el grupo de la Dra. María Jesús Pérez Pérez del instituto de química médica del CSIC (IQM-CSIC), utilizando el compuesto 6 como ligando. Tras la expresión y purificación de los varios mutantes simples y dobles, todos mostraron ninguna o muy poca actividad enzimática, lo que impidió su caracterización posterior en presencia de inhibidores de la polimerización.

Es probable que la causa de la inactividad radique en que estos residuos se encuentran muy cercanos al centro catalítico de la enzima, pudiendo afectar a su conformación y por lo tanto a la capacidad de la proteína para llevar a cabo su función (Gharbi-Ayachi et al., 2020).

En la actualidad, en colaboración con el grupo de la Dra. Nuria Verdaguer del instituto de Biología Medica del CSIC (IBMB-CSIC), se están intentado obtener cristales de la proteína ZIKV NS5 RdRp en complejo con los compuestos 6 y 15 para poder estudiar el tipo de interacción y mecanismo de inhibición que ejercen estos ambos compuestos sobre la polimerasa de este virus.

### **3. Los resultados del ensayo fluorométrico se correlacionan con los resultados en ensayos celulares.**

#### **3.1 Cultivos celulares infectados con ZIKV**

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral indican que los compuestos 6 y 15 inhiben fuertemente la actividad polimerasa de ZIKV en los ensayos *in vitro* realizados en nuestro laboratorio (**Figura 24**).

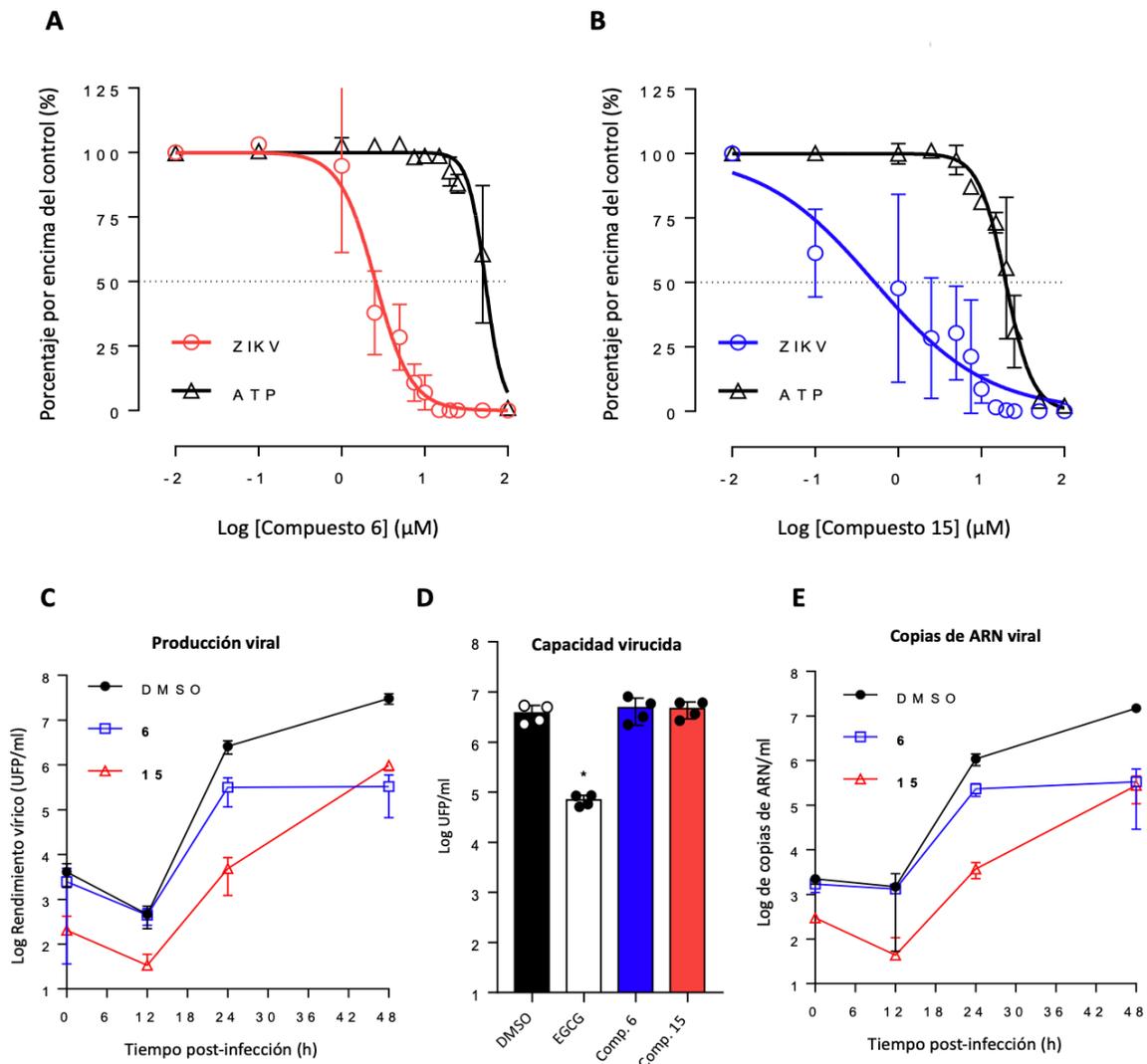
En colaboración con el Dr. Miguel Ángel Martín Acebes (INIA-CSIC), se han realizado experimentos en cultivos celulares infectados con el virus ZIKV en presencia de los compuestos 6 y 15 para evaluar si efecto inhibitorio observado *in vitro* podía traducirse en una actividad antiviral. En concordancia con los resultados *in vitro*, se comprobó que

el compuesto 15, y principalmente el 6, produjeron un marcado efecto antiviral (**Figura 41 A y B**).

Además, en los ensayos de infecciones en cultivos celulares se observó que estos compuestos no afectan a la integridad del virión (**Figura 41 D**) y que el ARN viral está disminuido durante el curso de la infección en presencia estos compuestos (**Figura 41 C y E**), lo que concuerda con que estos compuestos estén dirigidos específicamente frente a la polimerasa viral, tal y como determinan los ensayos fluorimétricos.

En comparación con los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos en los ensayos fluorimétricos, los valores de EC<sub>50</sub> (del inglés *effective concentration*, que mide la concentración de compuesto a la que el rendimiento del virus se inhibe en un 50%) de estos compuestos en cultivos fueron 10 veces más bajos (como se puede ver en la **Tabla 10** y la **Tabla 11**). Esta disparidad puede deberse a la propia naturaleza del ensayo *in vitro*. En estos experimentos, se utiliza un sistema mínimo de replicación donde únicamente se encuentra presente el dominio RdRp de ZIKV en presencia de un ARN homopolimérico sintético. Estas condiciones artificiales son muy diferentes a lo que ocurre *in vivo* en el retículo endoplasmático, donde estos complejos multiméricos se forman en las células infectadas (S. Chen et al., 2017).

Por otro lado, en los ensayos *in vitro*, se utiliza solamente el motivo RdRp de ZIKV y no la proteína NS5 completa del virus. Esto podría influir en la diferencia observada en la medida de inhibición del ensayo fluorométrico con respecto al efecto antiviral mostrado en los experimentos en cultivos celulares. Al inicio de esta Tesis Doctoral se planteó utilizar la versión recombinante de NS5 completa de ZIKV, pero se obtuvo un bajo rendimiento en su producción. Teniendo en cuenta la principal función del motivo Mtasa, que es la formación del *cap* en el extremo 5' del ARN viral y que distintos estudios indican que en ZIKV su actividad no parece interferir en la polimerización de la RdRp (Decroly, Ferron, Lescar, & Canard, 2011; Dong et al., 2010), se decidió prescindir del dominio Mtasa para favorecer la expresión y purificación del dominio RdRp. Así mismo, esta estrategia se eligió para el clonaje, expresión y purificación de la RdRp de WNV. Aunque la solución escogida resulta ser eficaz para la puesta a punto de una plataforma HTS como han demostrado los resultados, la purificación de la NS5 completa es un objetivo deseable para mejorar la fiabilidad de la plataforma de cribado. Se ha descrito que en otros Flavivirus que el dominio Mtasa puede influir en la síntesis de ARN producida por el dominio RdRp (Potisopon et al., 2014). Además, la presencia de la enzima completa podría dar lugar al uso de la plataforma basada en fluorescencia para realizar ensayos de combinación de compuestos que sean capaces de interactuar con los dos dominios o, mediante modificaciones en el ensayo, medir ambas actividades enzimáticas.



**Figura 41: Actividad antiviral de los compuestos 6 y 15 frente ZIKV medida en cultivos celulares. A) y B) Curvas de dosis-respuesta de ZIKV frente al compuesto 6 (A) y compuesto 15 (B).** Se infectaron células Vero con una multiplicidad de infección (*m.d.i.*) de 1 unidad formadora de placa por célula (UFP/c). Las células se trataron con cantidades crecientes de cada uno de los compuestos y se determinó el título viral mediante plaqueo (líneas azules y rojas, en (A) y (B), respectivamente) a las 24 h post infección (*h.p.i.*). La citotoxicidad de los compuestos se estimó en paralelo mediante la cuantificación de ATP celular (líneas negras) a las 24 h en muestras no infectadas tratadas con la cantidad de compuesto indicada. Tanto la reducción en el título viral, como la citotoxicidad, se expresan como porcentaje con respecto a un ensayo en ausencia de compuesto. Las líneas discontinuas indican una reducción del 50% en el título viral. Se muestran los valores medios y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes. **C) Inhibición de la producción de ZIKV por los compuestos 6 y 15.** Se infectaron células Vero con ZIKV (*m.d.i.* de 1 UFP/c) y se trataron con DMSO (línea negra), 15  $\mu$ M compuesto 6 (línea azul), o 15  $\mu$ M compuesto 15 (línea roja). El título viral se determinó mediante plaqueo a diferentes *h.p.i.* ( $n = 3$ ). **D) Ausencia de efecto virucida de los compuestos 6 y 15.** Se trataron viriones de ZIKV ( $4 \times 10^6$  UFP aprox.) con DMSO (barra negra), 5 mg/ml EGCG (galato de epigallocatequina; barra blanca), 15  $\mu$ M compuesto 6 (barra azul), o 15  $\mu$ M compuesto 15 (barra roja) durante 1 h a 37 °C. Posteriormente se determinó la infectividad en cada muestra mediante ensayo de placa. EGCG se incluyó en el experimento como un compuesto de control positivo con actividad virucida. La representación se ha realizado a partir de las medias y desviaciones estándar cuatro experimentos independientes). **E) Cuantificación de ARN viral.** El ARN se cuantificó en muestras de sobrenadantes obtenidos de los cultivos celulares infectados y tratados mostrados en el apartado (A). *Experimentos realizados por la Dra. Nereida Jiménez de Oya en el laboratorio del Dr. Miguel Ángel Martín Acebes (INIA-CSIC). Imagen modificada de (Sáez-Álvarez et al., 2021).*

**Tabla 10:** Tabla resumen comparativa de las IC<sub>50</sub> en ensayos *in vitro* con la EC<sub>50</sub> en ensayos en cultivos celulares para los compuestos 6 y 15.

Compuesto	6	15	Ratio
IC <sub>50</sub> (μM) Ensayo <i>in vitro</i>	5.1	28.3	≈1:5
*EC <sub>50</sub> (μM) Cultivos celulares	0.58	2.46	≈1:5

**Tabla 11:** Tabla resumen con los índices de selectividad de los compuestos 6 y 15 para ZIKV NS5 RdRp.

Compuesto	**CC <sub>50</sub> (μM)	EC <sub>50</sub> (μM)	***IS (CC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub> )
6	20.05	0.58	34.57
15	54.99	2.46	22.35

\***CE50:** concentración de fármaco a la que la producción del virus se inhibe en un 50%. La producción del virus se determinó mediante ensayo de infección en placa durante 24 horas (MOI de 1 UFP/célula). Los datos se expresan como media ± DE (n = 2-4). \*\***CC50:** concentración citotóxica semimáxima: concentración a la cual existe una reducción del 50% de la cantidad de ATP celular después de 24 o 48 h de tratamiento de células no infectadas. \*\*\***IS:** índice de selectividad es la relación entre CC50 y EC50. Se utilizó CC50 después de 24 h de tratamiento para calcular el SI. Todos los datos se expresan como media ± DE (n = 2-4).

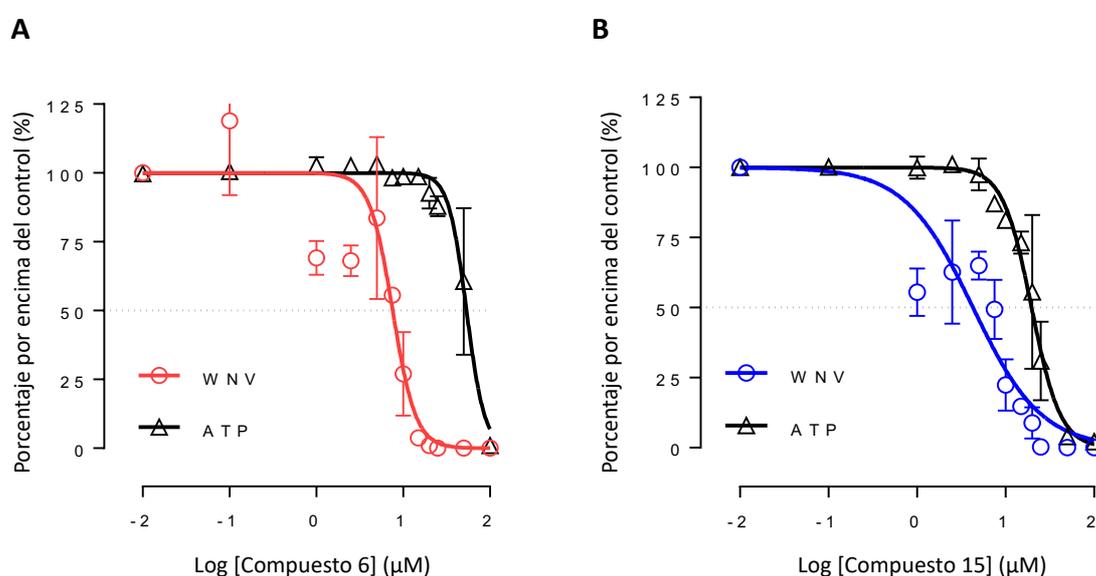
Finalmente, con el objetivo de caracterizar el mecanismo de acción de estos compuestos en las infecciones realizadas en cultivos celulares, el grupo del Dr. Martin Acebes realizó el cultivo seriado de células infectadas en presencia de cada uno de los compuestos con la finalidad de aislar mutantes de resistencia en la polimerasa viral.

Tras diez pases en serie en presencia de los compuestos, no se encontraron mutantes resistentes a estos inhibidores en el gen NS5. Teniendo en cuenta que una de las principales causas de fracaso en la búsqueda de antivirales es la aparición de poblaciones virales resistentes (McCluskey, Siedner, & Marconi, 2019; Parlatti & Pol, 2018), la falta de resistencia podría indicar un alto beneficio en cuanto a posibles enfoques terapéuticos futuros. Sin embargo, la falta de selección de mutantes resistentes no permite excluir que otros mecanismos, no relacionados directamente con la interacción de los compuestos 6 y 15 con la polimerasa viral, también podrían contribuir a la actividad antiviral observada. Podrían existir otras razones por las que no haya surgido una resistencia en la región NS5 tras los pases seriados en presencia de compuestos, como la necesidad de cambiar el régimen de adición de compuesto durante los pases (Sierra et al., 2007), la unión del fluoróforo del ARN de doble cadena viral que podría desestabilizar la estructura (Chukwudi, 2016) , o que la resistencia se hubiera originado en una región del genoma fuera de la región codificante de la polimerasa viral (Agudo, de la Higuera, Arias, Grande-Pérez, & Domingo, 2016).

Podría ser inusual encontrar que candidatos anti-kinetoplásticos sean potentes inhibidores de la RdRp, pero actualmente existen ejemplos de otros fármacos con acción antiparasitaria que han demostrado acción antiviral contra la ATPasa de Flavivirus (NS3) como la ivermectina (altamente empleada como tratamiento antihelmíntico) (Mastrangelo et al., 2012). Por otra parte, los estudios de reutilización o reposicionamiento de drogas han señalado las propiedades anti-ZIKV de otros antiparasitarios, antibióticos, antiprotozoarios, o antifúngicos (Delvecchio et al., 2016; Z. Li et al., 2017; Y. Lin et al., 2019; Yang et al., 2018).

### 3.2 Cultivos celulares infectados con WNV

Aprovechando el sistema fluorométrico para medir la actividad enzimática de la NS5-RdRp de WNV, se evaluó la capacidad de los compuestos 6 y 15 de inhibir la actividad de esta polimerasa. Aunque en menor medida que en el caso de la RdRp de ZIKV, ambos compuestos tuvieron efecto inhibitorio de la actividad polimerasa de la RdRp de WNV (**Figura 42**).



**Figura 42: Actividad antiviral de los compuestos 6 y 15 frente a WNV medida en cultivos celulares.** **A)** y **B)** Curvas de dosis-respuesta de ZIKV frente al compuesto 6 (A) y compuesto 15 (B). Se infectaron células Vero con una m.d.i. de 1 UFP/c. Las células se trataron con cantidades crecientes de cada compuesto y se determinó el título viral mediante plaqueo (líneas azules y rojas, en (A) y (B), respectivamente) a las 24 h.p.i. La citotoxicidad de los compuestos se estimó en paralelo mediante la cuantificación de ATP celular (líneas negras) a las 24 h en muestras no infectadas tratadas con la cantidad de compuesto indicada. Tanto la reducción en el título viral, como la citotoxicidad, se expresan como porcentaje con respecto a un ensayo en ausencia de compuesto. Se muestran los valores medios y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes. Experimentos realizados por la Dra. Nereida Jiménez de Oya en el laboratorio del Dr. Miguel Ángel Martín Acebes (INIA-CSIC). Imagen modificada de (Sáez-Álvarez et al., 2021).

En ensayos en cultivos celulares infectados con el virus ZIKV realizados en el laboratorio del Dr. Miguel Ángel Martín Acebes se observó que estos dos compuestos presentaban una actividad antiviral frente a WNV concordante con los resultados de inhibición obtenidos *in vitro*, ya que el efecto antiviral frente a este virus era menor que el observado frente a ZIKV. (Comparación entre la **Tabla 10**, **Tabla 11** y **Tabla 12**, **Tabla 13**).

A pesar de que las RdRps de ambos virus presentan una alta homología de secuencia (71,5%), este resultado puede reflejar diferencias en los residuos implicados en la interacción de estos compuestos en el sitio de unión alostérico, o incluso la existencia de sitios distintos de unión de estos compuestos para cada una de las enzimas.

El índice de selectividad de los compuestos 6 y 15 frente a ZIKV, y en mayor medida frente a WNV, no los capacita para evaluar su efecto antiviral en modelos animales con garantía. Sin embargo, un resultado muy prometedor de los resultados obtenidos es el hecho de que ambas moléculas tengan actividad antiviral frente a dos Flavivirus, lo que podría indicar que son potenciales compuestos químicos líderes que, mediante modificación, podrían dar lugar a la creación de inhibidores dirigidos específicamente contra las polimerasas de este género.

**Tabla 12:** Tabla resumen comparativa de las  $IC_{50}$  en ensayos *in vitro* con la  $EC_{50}$  en ensayos en cultivos celulares para los compuestos 6 y 15.

Compuesto	6	15	Ratio
$IC_{50}$ ( $\mu$ M) Ensayo <i>in vitro</i>	43.5	81.4	$\approx 1:2$
* $EC_{50}$ ( $\mu$ M) Cultivos celulares	4.03	8.25	$\approx 1:2$

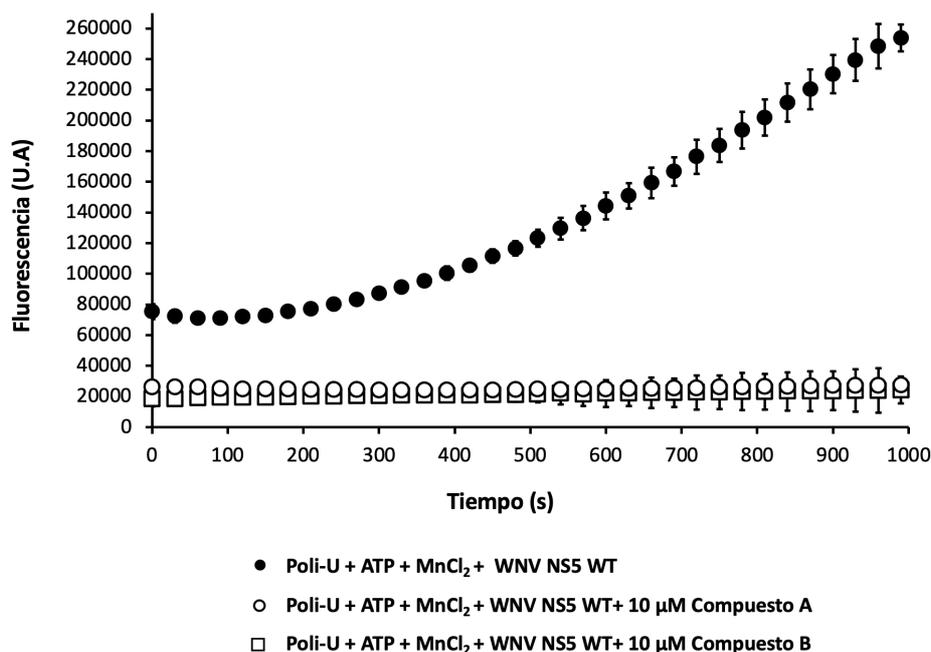
**Tabla 13:** Tabla resumen con los índices de selectividad de los compuestos 6 y 15 para WNV NS5 RdRp.

Compuesto	** $CC_{50}$ ( $\mu$ M)	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)	***IS ( $CC_{50}/EC_{50}$ )
6	20.05	4.03	4.97
15	54.99	8.25	6.66

#### 4. La plataforma de cribado basada en fluorescencia permite la identificación de compuestos inhibitorios frente a la polimerasa de WNV.

Los buenos resultados obtenidos con el cribado de la quimioteca de acceso libre de GSK, y el hallazgo de varios compuestos con actividad antiviral frente a ZIKV, hicieron que se evaluara la capacidad de cribado de la plataforma que utiliza la RdRp de WNV. Para ello, se analizó la quimioteca denominada FLA\_IQM, formada por 98 compuestos sin actividad antiviral documentada, cedida por la Dra. María Jesús Pérez Pérez (IQM-CSIC). Durante el muestreo de estos compuestos, se encontraron tres moléculas (FLA\_IQM\_46, FLA\_IQM\_100 y FLA\_IQM\_103) con un alto potencial inhibitorio frente a la WNV NS5 RdRp (**Figura 33**).

Además, este sistema se ha utilizado para demostrar que 2 fármacos comerciales también muestran efecto inhibitorio frente a estas polimerasas (**Figura 43**).

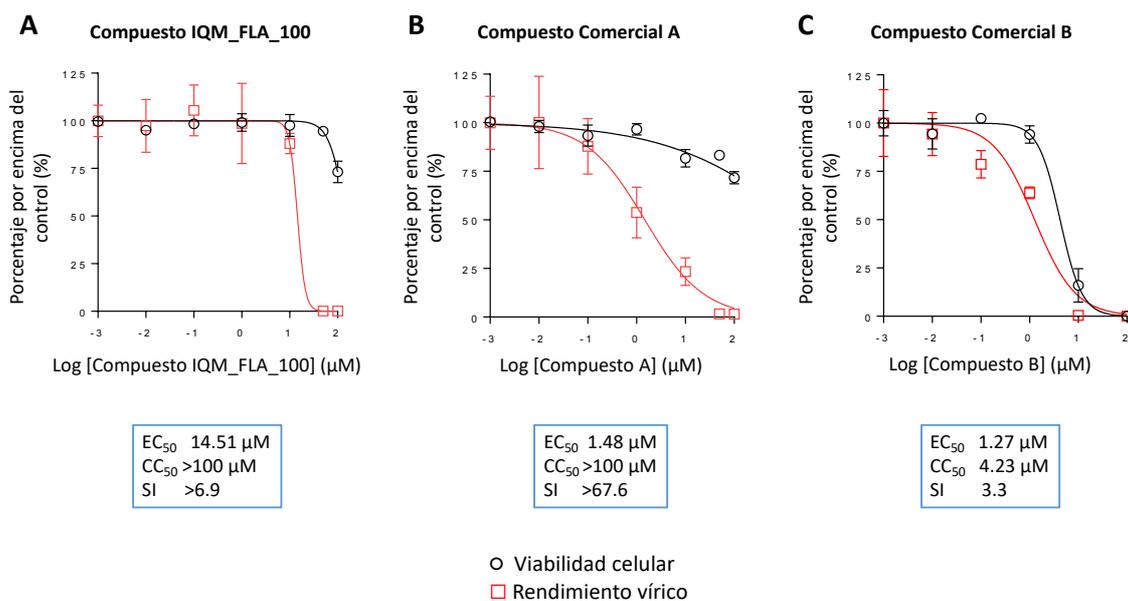


**Figura 43:** Representación gráfica de la actividad polimerasa de WNV NS5RdRp en presencia de los compuestos comerciales seleccionados. Se muestran los dos compuestos en comparación con el ensayo estándar representado con la circunferencia negra

Teniendo en cuenta la relación directa entre la inhibición encontrada en los ensayos *in vitro*, y la actividad antiviral observada en el caso de los compuestos 6 y 15 para ZIKV, se decidió evaluar el efecto antiviral de todos estos compuestos en infecciones de WNV realizadas en cultivos celulares.

Los ensayos preliminares realizados por el grupo de Dr. Miguel Ángel Martín Acebes han indicado que al menos los compuestos comerciales A y B, y el compuesto FLA\_IQM\_100 y tienen efecto antiviral medido en infecciones en cultivos celulares (**Figura 44**). El compuesto FLA\_IQM\_103 no presentó efecto antiviral en las condiciones de ensayo. En este caso, como se ha indicado anteriormente para el caso de ZIKV, esta disparidad entre los resultados de inhibición *in vitro* y los de cultivos celulares probablemente se deba a la diferente naturaleza y características de cada uno de estos ensayos. Por otro lado, el compuesto FLA\_IQM\_46 no fue empleado en infecciones celulares debido a su alta toxicidad documentada en otros estudios (información directa de la Dra. María Jesús Pérez Pérez).

Estos resultados, aunque son preliminares, resultan altamente prometedores y están siendo ahora mismo complementados en colaboración con el grupo del Dr. Miguel Ángel Martín Acebes mediante estudios adicionales en cultivos celulares, así como con ensayos *in vitro* para caracterizar el tipo de inhibición ejercida por estas moléculas. De este modo, los estos resultados obtenidos demuestran que la utilización de una plataforma de alta eficiencia para el cribado de un gran número de compuestos permite reevaluar quimiotecas en un corto periodo de tiempo, de moléculas diseñadas inicialmente con otros fines, apoyando los procesos de reutilización y reemplazamiento de productos farmacéuticos.



**Figura 44: Actividad antiviral de los compuestos IQM\_FL A\_100 y los compuestos comerciales A y B para WNV.** Curvas de dosis-respuesta de WNV frente a **A)** Compuesto IQM\_FL A\_100, **B)** Compuesto comercial A **C)** Compuesto comercial B. Se infectaron células Vero (MOI de 0.5 UFP / célula) y se trataron con cantidades crecientes de los compuestos y se determinó el rendimiento de virus en el sobrenadante a las 24 h.p.i. La citotoxicidad de los compuestos se estimó en paralelo mediante la cuantificación de ATP celular en muestras no infectadas a las 24 h (n = 2-4). Las líneas discontinuas indican una reducción del 50%. Los datos se expresan como media ± DE. Experimentos realizados en el laboratorio del Dr. Miguel Ángel Martín Acebes (INIA-CSIC). Imagen cedida por el Dr. Miguel Ángel Martín Acebes.

## 5. Puesta a punto del ensayo para medir la actividad de otras polimerasas virales de ARN

Debido a la alta versatilidad y sencillez del método, se investigó su potencial para ser trasladado y permitir la detección de la actividad de RdRps de otros virus de alta importancia clínica y veterinaria, capaces de utilizar *in vitro* moldes homopoliméricos como sustrato, como son las de HCV y FMDV, respectivamente (Grubman & Baxt, 2004; Phelps, Walker, & Honegger, 2021).

En ambos casos, se observó incremento de fluorescencia solamente utilizando una polimerasa recombinante activa en presencia de Mn<sup>2+</sup> y un molde homopolimérico de poli-U o poli-A, en concordancia con los resultados obtenidos utilizando nucleótidos radiactivos y estudios anteriores (Arias et al., 2005; Crotty et al., 2001; Maag et al., 2001) Además, en el caso de la polimerasa recombinante 3D de FMDV, fue necesario el uso de la VPg1 como iniciador de la reacción, tal y como ha sido demostrado anteriormente en ensayos *in vitro* utilizando nucleótidos radiactivos (Arias et al., 2005).

En conjunto, los resultados obtenidos muestran el potencial del sistema de fluorescencia para poder medir *in vitro* de forma adecuada el comportamiento enzimático de diferentes RdRp de distintos virus, permitiendo la monitorización de la replicación en tiempo real de manera rápida y barata, lo que podría ser de gran interés para la identificación de mutantes de RdRp, estudios enzimáticos, o plataformas de muestreo frente a agentes inhibitorios de la actividad polimerasa.

## **6. Puesta a punto del ensayo para medir la actividad de la nsp12 de SARS-CoV-2 empleando un complejo molde-iniciador**

Uno de los virus de reciente aparición, responsable, hasta el momento de la escritura de esta memoria, de aproximadamente 5.2 millones de muertes a nivel mundial, es el SARS-CoV-2. Detener la rápida transmisión y expansión de este virus es un desafío. La propagación de este virus se da principalmente por el contacto con una persona infectada, a través de aerosoles, superficies y diferentes fluidos corporales, haciendo la transmisión sencilla y rápida entre la población (Meyerowitz, Richterman, Gandhi, & Sax, 2021).

Los esfuerzos sin precedentes de la comunidad científica y farmacéutica han producido potentes vacunas en un corto periodo de tiempo aprobadas por la OMS. Estas han sido empleadas indistintamente a nivel mundial, siendo las más conocidas las creadas por las empresas como *Pfizer*, *Moderna* y *Johnson & Johnson*, así como las creadas en colaboración con centros de investigación como *Oxford / AstraZeneca* (Chadha, Khullar, & Mittal, 2021). No obstante, aunque las vacunas son el primer paso para la erradicación de este virus, el sistema inmune de muchos pacientes continúa colapsando, provocando su ingreso en las unidades de cuidados intensivos de los hospitales. Esto hace que sea imprescindible encontrar nuevas estrategias terapéuticas y para ello, desarrollar sistemas que agilicen la búsqueda de nuevos fármacos antivirales.

Aprovechando el conocimiento adquirido en la construcción de las plataformas de cribado de compuestos frente a las polimerasas de los Flavivirus ZIKV y WNV, se decidió poner a punto un método fluorométrico para medir la actividad de la polimerasa de SARS-CoV-2. Para utilizar este ensayo como sistema de detección de posibles compuestos con actividad antiviral, se llevaron a cabo diferentes ajustes experimentales con respecto a las bases previamente establecidas, ya que a diferencia de los modelos mostrados hasta ahora en esta Tesis Doctoral, la proteína encargada de la actividad polimerasa de este coronavirus (nsp12) es dependiente de un iniciador de ácidos nucleicos y además necesita *in vitro* un mínimo de proteínas accesorias, como son las proteínas no estructurales nsp7 y nsp8, necesarias para desarrollar su actividad (Imbert et al., 2006; te Velthuis et al., 2010).

Como solución a la necesidad de un iniciador de ácidos nucleicos, se empleó una molécula de ARN capaz de hibridar con otra idéntica a ella para formar un complejo molde-iniciador. Esta molécula está modificada de una previamente empleada en la realización de ensayos enzimáticos con la polimerasa de poliovirus, la cual ha sido descrita previamente y denominada “symsub” (Arnold & Cameron, 2000). La utilización de este tipo de ARN supone una mejora de los recursos, ya que optimiza la obtención de complejos molde-iniciador abaratando su coste. El uso de este “symsub” ha permitido medir en tiempo real el incremento de la fluorescencia durante el ensayo gracias a la incorporación del SYTO 9® a la doble banda de nueva síntesis (**Figura 39**).

El uso del complejo, además, aumenta la cantidad relativa de fluorescencia medida generada durante el curso del ensayo (obteniéndose un producto de elongación final de ARN<sub>bc</sub> de 48 residuos), con respecto a la fluorescencia basal del molde-iniciador (un ARN<sub>bc</sub> de 6 residuos) (**Figura 38**).

Gracias al uso de este tipo de molde, los ensayos para monitorizar la actividad polimerasa de la nsp12 en presencia de las proteínas accesorias nsp7 y nsp8 pudieron realizarse de una manera sencilla. Los resultados de actividad de la nsp12 medida como incremento de fluorescencia mostrados en esta Tesis Doctoral son preliminares y sería necesario complementarlos con métodos directos de medición de la polimerización, como ensayos de incorporación con nucleótidos radiactivos resueltos en geles de acrilamida. Sin embargo, todos los datos obtenidos hasta el momento referentes a los requerimientos del ensayo fluorométrico, como son la necesidad un donador de metal, uso de un complejo molde-iniciador de ARN, necesidad de una nsp12 con la tríada catalítica íntegra y presencia de las proteínas accesorias nsp7 y nsp8 en el ensayo (o del sustituyente nsp7L8), son indicativos de que el aumento registrado de fluorescencia está directamente relacionado con la actividad polimerasa de la nsp12 recombinante de SARS-CoV-2 (**Figura 40 B**).

De este modo, los datos obtenidos hasta el momento, tanto en sistemas que emplean complejos molde-iniciador, como en aquellos basados en la síntesis *de novo* a partir de un ARN de cadena sencilla, demuestran la validez y la versatilidad del método fluorométrico en tiempo real para la puesta a punto de plataformas de alto rendimiento para el cribado de fármacos frente a polimerasas de toda clase de virus.

Previamente, numerosos autores han descrito y validado varios métodos para la detección de fármacos de alto rendimiento contra las RdRp (Campagnola et al., 2011; Eltahla et al., 2013; Gong et al., 2013; Madhvi et al., 2017; Niyomrattanakit et al., 2011; Su et al., 2010). Sin embargo, existen varias limitaciones prácticas a estos enfoques, como el requisito de sustancias radiactivas, que implican medidas adicionales de bioseguridad (Gong et al., 2013) y arduas configuraciones experimentales (Madhvi et al., 2017; Su et al., 2010) en comparación con los métodos basados en fluorescencia (Campagnola et al., 2011; Eltahla et al., 2013; Niyomrattanakit et al., 2011). Los ensayos fluorimétricos que se han desarrollado durante esta Tesis Doctoral se presentan como una alternativa a las limitaciones prácticas presentes en los métodos tradicionales. Además de ser más accesibles, ya sea por el uso de moldes homopoliméricos de bajo coste, como por la optimización de moldes heteropoliméricos, que permiten la detección de la actividad en tiempo real con una alta fiabilidad. Esto permite reducir el tiempo del cribado a unos pocos minutos con efectividad demostrada, mediante la obtención de dos compuestos con capacidad antiviral frente a ZIKV tras el cribado una quimioteca de compuestos sin actividad antiviral previa documentada (Sáez-Álvarez et al., 2021).

Además, la puesta a punto de este método en un formato de placas de 96 pocillos facilita la posible miniaturización y automatización del método en formatos de mayor rendimiento, como puede ser la utilización de placas de 384 o 1536 pocillos para cribados rápidos y masivos de quimiotecas de compuestos de pequeñas moléculas (Campagnola et al., 2011; Eltahla et al., 2013; Niyomrattanakit et al., 2011).

En conclusión, los resultados obtenidos durante la presente Tesis Doctoral demuestran que los métodos basados en fluorescencia que se han desarrollado son fácilmente adaptables a los requerimientos de polimerización de diferentes RdRps virales para medir su actividad en tiempo real. Esta adaptabilidad fortalece el método, haciendo de

él una base para el posterior desarrollo de herramientas de alto rendimiento, que permitan la caracterización inicial de polimerasas virales, así como un rápido cribado de quimiotecas de moléculas pequeñas con potencial efecto inhibitorio frente a la polimerasa que puedan dar lugar a fármacos antivirales. De este modo, la creación y desarrollo de este tipo de plataformas, se revela como una herramienta básica y necesaria para la búsqueda de estrategias antivirales frente a Flavivirus y a otros virus emergentes sin tratamiento disponible.



Conclusiones

## VII. CONCLUSIONES

1. La plataforma desarrollada basada en fluorescencia es capaz de medir a tiempo real la actividad polimerasa de ZIKV NS5 RdRp y WNV NS5 RdRp, empleando como agente intercalante SYTO 9® y poli-u como molde homopolimérico.
2. La alta fiabilidad y reproducibilidad del método permite la caracterización bioquímica de la ZIKV NS5 RdRp y WNV NS5 RdRp, a través del cálculo de los parámetros  $V_{max}$  y la  $K_m$  para ambos sustratos enzimáticos.
3. La plataforma desarrollada para las polimerasas de ZIKV y WNV permite su exportación para la medida de la actividad polimerasa en proteínas de virus de la misma familia vírica (HCV NS5 RdRp) y polimerasas pertenecientes a virus de diferente familia vírica que necesitan un péptido como iniciador (FMDV 3D pol RdRp).
4. La plataforma desarrollada posee un índice  $Z'$  que la describe como idónea para su empleo en HTS para el descubrimiento de compuestos con potencial efecto inhibitorio para ZIKV y WNV.
5. La rápida capacidad de cribado de la plataforma permite el muestreo de un alto número de compuestos provenientes de quimiotecas, como la cedida por GSK en un corto periodo de tiempo.
6. Los compuestos 6 y 15 obtenidos de la quimioteca de GSK inhiben la actividad polimerasa de ZIKV NS5 RdRp reflejada como una ausencia del incremento de fluorescencia. Ambos compuestos parecen poseer el mismo sitio de unión alostérico (Bolsillo N) y su actividad es antagónica.
7. Cultivos celulares infectados con ZIKV y posteriormente tratados con los compuestos 6 y 15, demostraron una correlación directa con los estudios *in vitro*, corroborando que la inhibición se da a nivel de la polimerasa, puesto que la cantidad de material genético del virus se ve disminuido cuando estos compuestos están presentes, además su acción no modifica la integridad del virión.
8. Aunque en menor medida, los compuestos 6 y 15 son capaces de inhibir la WNV NS5 RdRp en cultivos celulares infectados por el WNV. En ambos casos los índices de selectividad no los capacita para probar su efecto en modelos animales con garantía.
9. La plataforma puesta a punto para medir la actividad polimerasa de WNV NS5 RdRp, permite el cribado de quimiotecas de compuestos con actividad antiviral desconocida. El compuesto IQM-FLA-100 perteneciente a la quimioteca IQM-FLA y dos compuestos comerciales seleccionados demostraron una capacidad inhibitoria frente a la WNV NS5 RdRp tanto en ensayos *in vitro* como en cultivos celulares infectados por WNV.

**10.** La plataforma desarrollada es capaz de adaptarse a las necesidades intrínsecas de los ensayos planteados, como así lo demuestra los ensayos realizados para la optimización de la reacción con el complejo replicativo de SARS-CoV-2, donde se ha empleado un iniciador de ARNbc y se han introducido tres proteínas.



## Bibliografía

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- (CDC), Centers for Disease Control and Prevention. (1999). Outbreak of West Nile-like viral encephalitis--New York, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 48(38), 845-849.
- (CDC), Centers for Disease Control and Prevention. (2002). Possible West Nile virus transmission to an infant through breast-feeding--Michigan, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 51(39), 877-878.
- Abdelnabi, R., Morais, A. T. S., Leyssen, P., Imbert, I., Beaucourt, S., Blanc, H., Delang, L. (2017). Understanding the Mechanism of the Broad-Spectrum Antiviral Activity of Favipiravir (T-705): Key Role of the F1 Motif of the Viral Polymerase. *J Virol*, 91(12). doi:10.1128/JVI.00487-17
- Ackermann, M., & Padmanabhan, R. (2001). De novo synthesis of RNA by the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase exhibits temperature dependence at the initiation but not elongation phase. *J Biol Chem*, 276(43), 39926-39937. doi:10.1074/jbc.M104248200
- Adcock, R. S., Chu, Y. K., Golden, J. E., & Chung, D. H. (2017). Evaluation of anti-Zika virus activities of broad-spectrum antivirals and NIH clinical collection compounds using a cell-based, high-throughput screen assay. *Antiviral Res*, 138, 47-56. doi:10.1016/j.antiviral.2016.11.018
- Adedeji, A. O., Marchand, B., Te Velhuis, A. J., Snijder, E. J., Weiss, S., Eoff, R. L., Sarafianos, S. G. (2012). Mechanism of nucleic acid unwinding by SARS-CoV helicase. *PLoS One*, 7(5), e36521. doi:10.1371/journal.pone.0036521
- Agudo, R., Calvo, P. A., Martinez-Jimenez, M. I., & Blanco, L. (2017). Engineering human PrimPol into an efficient RNA-dependent-DNA primase/polymerase. *Nucleic Acids Res*, 45(15), 9046-9058. doi:10.1093/nar/gkx633
- Agudo, R., de la Higuera, I., Arias, A., Grande-Pérez, A., & Domingo, E. (2016). Involvement of a joker mutation in a polymerase-independent lethal mutagenesis escape mechanism. *Virology*, 494, 257-266. doi:10.1016/j.virol.2016.04.023
- Ahn, D. G., Choi, J. K., Taylor, D. R., & Oh, J. W. (2012). Biochemical characterization of a recombinant SARS coronavirus nsp12 RNA-dependent RNA polymerase capable of copying viral RNA templates. *Arch Virol*, 157(11), 2095-2104. doi:10.1007/s00705-012-1404-x
- Alam, A., Imam, N., Farooqui, A., Ali, S., Malik, M. Z., & Ishrat, R. (2017). Recent trends in ZikV research: A step away from cure. *Biomed Pharmacother*, 91, 1152-1159. doi:10.1016/j.biopha.2017.05.045

- Alanagreh, L., Alzoughool, F., & Atoum, M. (2020). The Human Coronavirus Disease COVID-19: Its Origin, Characteristics, and Insights into Potential Drugs and Its Mechanisms. *Pathogens*, *9*(5). doi:10.3390/pathogens9050331
- Albulescu, I. C., Kovacicova, K., Tas, A., Snijder, E. J., & van Hemert, M. J. (2017). Suramin inhibits Zika virus replication by interfering with virus attachment and release of infectious particles. *Antiviral Res*, *143*, 230-236. doi:10.1016/j.antiviral.2017.04.016
- Alcantara, D., & O'Driscoll, M. (2014). Congenital microcephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, *166C*(2), 124-139. doi:10.1002/ajmg.c.31397
- Anderson, R. C., Horn, K. B., Hoang, M. P., Gottlieb, E., & Bennin, B. (2004). Punctate exanthem of West Nile Virus infection: report of 3 cases. *J Am Acad Dermatol*, *51*(5), 820-823. doi:10.1016/j.jaad.2004.05.031
- Andreadis, T. G., Anderson, J. F., & Vossbrinck, C. R. (2001). Mosquito surveillance for West Nile virus in Connecticut, 2000: isolation from *Culex pipiens*, *Cx. restuans*, *Cx. salinarius*, and *Culiseta melanura*. *Emerg Infect Dis*, *7*(4), 670-674. doi:10.3201/eid0704.010413
- Angamo, M. T., Mohammed, M. A., & Peterson, G. M. (2021). Efficacy and safety of remdesivir in hospitalised COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis. *Infection*. doi:10.1007/s15010-021-01671-0
- Angelini, M. M., Akhlaghpour, M., Neuman, B. W., & Buchmeier, M. J. (2013). Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. *mBio*, *4*(4). doi:10.1128/mBio.00524-13
- Arias, A., Agudo, R., Ferrer-Orta, C., Perez-Luque, R., Airaksinen, A., Brocchi, E., Escarmis, C. (2005). Mutant viral polymerase in the transition of virus to error catastrophe identifies a critical site for RNA binding. *J Mol Biol*, *353*(5), 1021-1032. doi:10.1016/j.jmb.2005.09.022
- Arias, A., Arnold, J. J., Sierra, M., Smidansky, E. D., Domingo, E., & Cameron, C. E. (2008). Determinants of RNA-dependent RNA polymerase (in) fidelity revealed by kinetic analysis of the polymerase encoded by a foot-and-mouth disease virus mutant with reduced sensitivity to ribavirin. *J Virol*, *82*(24), 12346-12355. doi:10.1128/jvi.01297-08
- Arnold, J. J., & Cameron, C. E. (2000). Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3D(pol)). Assembly of stable, elongation-competent complexes by using a symmetrical primer-template substrate (sym/sub). *J Biol Chem*, *275*(8), 5329-5336. doi:10.1074/jbc.275.8.5329
- Arnold, J. J., Smidansky, E. D., Moustafa, I. M., & Cameron, C. E. (2012). Human mitochondrial RNA polymerase: structure-function, mechanism and inhibition. *Biochim Biophys Acta*, *1819*(9-10), 948-960. doi:10.1016/j.bbagr.2012.04.002

- Arya, R., Kumari, S., Pandey, B., Mistry, H., Bihani, S. C., Das, A., Kumar, M. (2021). Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *J Mol Biol*, 433(2), 166725. doi:10.1016/j.jmb.2020.11.024
- Ashour, J., Laurent-Rolle, M., Shi, P. Y., & García-Sastre, A. (2009). NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. *J Virol*, 83(11), 5408-5418. doi:10.1128/JVI.02188-08
- Baba, S. H., Fagbami A, & C.K., Ojeh. (1999). Preliminary studies on the use of solid-phase immunosorbent techniques for the rapid detection of Wesselsbron virus (WSLV) IgM by haemagglutination-inhibition. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 22(1), 71-79. doi:[https://doi.org/10.1016/S0147-9571\(98\)00003-4](https://doi.org/10.1016/S0147-9571(98)00003-4)
- Bai, X., Fischer, S., Keshavjee, S., & Liu, M. (2000). Heparin interference with reverse transcriptase polymerase chain reaction of RNA extracted from lungs after ischemia-reperfusion. *Transpl Int*, 13(2), 146-150. doi:10.1007/s001470050306
- Balimane, P. V., & Sinko, P. J. (1999). Involvement of multiple transporters in the oral absorption of nucleoside analogues. *Adv Drug Deliv Rev*, 39(1-3), 183-209. doi:10.1016/s0169-409x(99)00026-5
- Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev*, 35(3), 235-241.
- Bardanzellu, F., Puddu, M., & Fanos, V. (2021). Breast Milk and COVID-19: From Conventional Data to "Omics" Technologies to Investigate Changes Occurring in SARS-CoV-2 Positive Mothers. *Int J Environ Res Public Health*, 18(11). doi:10.3390/ijerph18115668
- Baron, S. (1996). Medical Microbiology. In.
- Bassi, M. R., Sempere, R. N., Meyn, P., Polacek, C., & Arias, A. (2018). Extinction of Zika Virus and Usutu Virus by Lethal Mutagenesis Reveals Different Patterns of Sensitivity to Three Mutagenic Drugs. *Antimicrob Agents Chemother*, 62(9). doi:10.1128/aac.00380-18
- Bayer, A., Lennemann, N. J., Ouyang, Y., Bramley, J. C., Morosky, S., Marques, E. T., Coyne, C. B. (2016). Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. *Cell Host Microbe*, 19(5), 705-712. doi:10.1016/j.chom.2016.03.008
- Becker, Y., & Olshevsky, U. (1973). Inhibition of Herpes simplex virus replication by cordycepin. *Isr J Med Sci*, 9(11), 1581-1585.
- Beerens, N., Selisko, B., Ricagno, S., Imbert, I., van der Zanden, L., Snijder, E. J., & Canard, B. (2007). De novo initiation of RNA synthesis by the arterivirus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol*, 81(16), 8384-8395. doi:10.1128/JVI.00564-07

- Behrens, S. E., Tomei, L., & De Francesco, R. (1996). Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J*, *15*(1), 12-22.
- Beigel, J. H., Tomashek, K. M., Dodd, L. E., Mehta, A. K., Zingman, B. S., Kalil, A. C., Members, ACTT-1 Study Group. (2020). Remdesivir for the Treatment of Covid-19 - Final Report. *N Engl J Med*, *383*(19), 1813-1826. doi:10.1056/NEJMoa2007764
- Belshaw, R., Pybus, O. G., & Rambaut, A. (2007). The evolution of genome compression and genomic novelty in RNA viruses. *Genome Res*, *17*(10), 1496-1504. doi:10.1101/gr.6305707
- Besnard, M., Lastere, S., Teissier, A., Cao-Lormeau, V., & Musso, D. (2014). Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill*, *19*(13).
- Best, S. M. (2017). The Many Faces of the Flavivirus NS5 Protein in Antagonism of Type I Interferon Signaling. *J Virol*, *91*(3). doi:10.1128/JVI.01970-16
- Beutler, E., Gelbart, T., & Kuhl, W. (1990). Interference of heparin with the polymerase chain reaction. *Biotechniques*, *9*(2), 166.
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., . Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, *496*(7446), 504-507. doi:10.1038/nature12060
- Bibi, S., Hasan, M. M., Wang, Y. B., Papadakos, S. P., & Yu, H. (2021). Cordycepin as a Promising Inhibitor of SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase (RdRp). *Curr Med Chem*. doi:10.2174/0929867328666210820114025
- Biedenbender, R., Bevilacqua, J., Gregg, A. M., Watson, M., & Dayan, G. (2011). Phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study to investigate the immunogenicity and safety of a West Nile virus vaccine in healthy adults. *J Infect Dis*, *203*(1), 75-84. doi:10.1093/infdis/jiq003
- Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., Baronti, C., Canard, B., Cook, S., Bolognesi, M. (2010). Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. *Antiviral Res*, *87*(2), 125-148. doi:10.1016/j.antiviral.2009.11.009
- Boukadida, C., Fritz, M., Blumen, B., Fogeron, M. L., Penin, F., & Martin, A. (2018). NS2 proteases from hepatitis C virus and related hepaciviruses share composite active sites and previously unrecognized intrinsic proteolytic activities. *PLoS Pathog*, *14*(2), e1006863. doi:10.1371/journal.ppat.1006863
- Brant, A. C., Tian, W., Majerciak, V., Yang, W., & Zheng, Z. M. (2021). SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell Biosci*, *11*(1), 136. doi:10.1186/s13578-021-00643-z

- Brasil, P., Pereira, J. P., Moreira, M. E., Ribeiro Nogueira, R. M., Damasceno, L., Wakimoto, M., Nielsen-Saines, K. (2016). Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med*, 375(24), 2321-2334. doi:10.1056/NEJMoa1602412
- Bressanelli, S., Stiasny, K., Allison, S. L., Stura, E. A., Duquerroy, S., Lescar, J., Rey, F. A. (2004). Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J*, 23(4), 728-738. doi:10.1038/sj.emboj.7600064
- Briese, T., Jia, X. Y., Huang, C., Grady, L. J., & Lipkin, W. I. (1999). Identification of a Kunjin/West Nile-like flavivirus in brains of patients with New York encephalitis. *Lancet*, 354(9186), 1261-1262. doi:10.1016/s0140-6736(99)04576-6
- Brockway, S. M., Clay, C. T., Lu, X. T., & Denison, M. R. (2003). Characterization of the expression, intracellular localization, and replication complex association of the putative mouse hepatitis virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol*, 77(19), 10515-10527. doi:10.1128/jvi.77.19.10515-10527.2003
- Bujalowski, P. J., Bujalowski, W., & Choi, K. H. (2017). Interactions between the Dengue Virus Polymerase NS5 and Stem-Loop A. *J Virol*, 91(11). doi:10.1128/JVI.00047-17
- Butcher, S. J., Grimes, J. M., Makeyev, E. V., Bamford, D. H., & Stuart, D. I. (2001). A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. *Nature*, 410(6825), 235-240. doi:10.1038/35065653
- Bügl, H., Fauman, E. B., Staker, B. L., Zheng, F., Kushner, S. R., Saper, M. A., Jakob, U. (2000). RNA methylation under heat shock control. *Mol Cell*, 6(2), 349-360. doi:10.1016/s1097-2765(00)00035-6
- Calmels, C., Ventura, M., Aknin, C., Metifiot, M., & Andreola, M. L. (2017). De novo RNA synthesis catalyzed by the Zika Virus RNA polymerase domain. In *Sci Rep* (Vol. 7, pp. 2697). England.
- Campagnola, G., Gong, P., & Peersen, O. B. (2011). High-throughput screening identification of poliovirus RNA-dependent RNA polymerase inhibitors. *Antiviral Res*, 91(3), 241-251. doi:10.1016/j.antiviral.2011.06.006
- Cannalire, R., Tarantino, D., Piorkowski, G., Carletti, T., Massari, S., Felicetti, T., Querat, G. (2019). Broad spectrum anti-flavivirus pyridobenzothiazolones leading to less infective virions. *Antiviral Res*, 167, 6-12. doi:10.1016/j.antiviral.2019.03.004
- Carlson, C. J., Dougherty, E. R., & Getz, W. (2016). An Ecological Assessment of the Pandemic Threat of Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(8), e0004968. doi:10.1371/journal.pntd.0004968

- Castro, C., Arnold, J. J., & Cameron, C. E. (2005). Incorporation fidelity of the viral RNA-dependent RNA polymerase: a kinetic, thermodynamic and structural perspective. *Virus Res*, *107*(2), 141-149. doi:10.1016/j.virusres.2004.11.004
- Cavalletto, L., Chemello, L., Donada, C., Casarin, P., Belussi, F., Bernardinello, E., Alberti, A. (2000). The pattern of response to interferon alpha (alpha-IFN) predicts sustained response to a 6-month alpha-IFN and ribavirin retreatment for chronic hepatitis C. TVVH Study Group. *J Hepatol*, *33*(1), 128-134. doi:10.1016/s0168-8278(00)80169-5
- Cerbino-Neto, J., Mesquita, E. C., Souza, T. M., Parreira, V., Wittlin, B. B., Durovni, B., Bozza, F. A. (2016). Clinical Manifestations of Zika Virus Infection, Rio de Janeiro, Brazil, 2015. *Emerg Infect Dis*, *22*(7), 1318-1320. doi:10.3201/eid2207.160375
- Chadha, J., Khullar, L., & Mittal, N. (2021). Facing the wrath of enigmatic mutations: A review on the emergence of SARS-CoV-2 variants amid COVID-19 pandemic. *Environ Microbiol*. doi:10.1111/1462-2920.15687
- Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R., & Rice, C. M. (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol*, *44*, 649-688. doi:10.1146/annurev.mi.44.100190.003245
- Chancey, C., Grinev, A., Volkova, E., & Rios, M. (2015). The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *Biomed Res Int*, *2015*, 376230. doi:10.1155/2015/376230
- Chen, J., Malone, B., Llewellyn, E., Grasso, M., Shelton, P. M. M., Olinares, P. D. B., Campbell, E. A. (2020). Structural Basis for Helicase-Polymerase Coupling in the SARS-CoV-2 Replication-Transcription Complex. *Cell*, *182*(6), 1560-1573.e1513. doi:10.1016/j.cell.2020.07.033
- Chen, J., Ng, M. M., & Chu, J. J. (2015). Activation of TLR2 and TLR6 by Dengue NS1 Protein and Its Implications in the Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. *PLoS Pathog*, *11*(7), e1005053. doi:10.1371/journal.ppat.1005053
- Chen, S., Wu, Z., Wang, M., & Cheng, A. (2017). Innate Immune Evasion Mediated by Flaviviridae Non-Structural Proteins. *Viruses*, *9*(10). doi:10.3390/v9100291
- Chen, Y., Liu, Q., & Guo, D. (2020). Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol*, *92*(4), 418-423. doi:10.1002/jmv.25681
- Choksupmanee, O., Hodge, K., Katzenmeier, G., & Chimnaronk, S. (2012). Structural platform for the autolytic activity of an intact NS2B-NS3 protease complex from dengue virus. *Biochemistry*, *51*(13), 2840-2851. doi:10.1021/bi2018267
- Chou, T. C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev*, *58*(3), 621-681. doi:10.1124/pr.58.3.10

- Chowers, M. Y., Lang, R., Nassar, F., Ben-David, D., Giladi, M., Rubinshtein, E., Weinberger, M. (2001). Clinical characteristics of the West Nile fever outbreak, Israel, 2000. *Emerg Infect Dis*, 7(4), 675-678. doi:10.3201/eid0704.010414
- Chukwudi, C. U. (2016). rRNA Binding Sites and the Molecular Mechanism of Action of the Tetracyclines. *Antimicrob Agents Chemother*, 60(8), 4433-4441. doi:10.1128/AAC.00594-16
- Ci, Y., Liu, Z. Y., Zhang, N. N., Niu, Y., Yang, Y., Xu, C., Shi, L. (2020). Zika NS1-induced ER remodeling is essential for viral replication. *J Cell Biol*, 219(2). doi:10.1083/jcb.201903062
- Claverie, J. M. (2020). A Putative Role of de-Mono-ADP-Ribosylation of STAT1 by the SARS-CoV-2 Nsp3 Protein in the Cytokine Storm Syndrome of COVID-19. *Viruses*, 12(6). doi:10.3390/v12060646
- Cornillez-Ty, C. T., Liao, L., Yates, J. R., Kuhn, P., & Buchmeier, M. J. (2009). Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein 2 interacts with a host protein complex involved in mitochondrial biogenesis and intracellular signaling. *J Virol*, 83(19), 10314-10318. doi:10.1128/JVI.00842-09
- Crotty, S., Cameron, C. E., & Andino, R. (2001). RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. In *Proc Natl Acad Sci U S A* (Vol. 98, pp. 6895-6900). United States.
- Crotty, S., Maag, D., Arnold, J. J., Zhong, W., Lau, J. Y., Hong, Z., Cameron, C. E. (2000). The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med*, 6(12), 1375-1379. doi:10.1038/82191
- Créange, A. (2016). Guillain-Barré syndrome: 100 years on. *Rev Neurol (Paris)*, 172(12), 770-774. doi:10.1016/j.neurol.2016.10.011
- Cuartas, V., Crespo, M. D. P., Priego, E. M., Persoons, L., Daelemans, D., Camarasa, M. J., Pérez-Pérez, M. J. (2019). Design and Synthesis of New 6-Nitro and 6-Amino-3,3a,4,5-Tetrahydro-2. *Molecules*, 24(23). doi:10.3390/molecules24234236
- D. Davis, Bernard, Renato, Dulbecco, E. Eisen, Herman S. Ginsberg, Harold Wood, W. Barry, & McCarty, Maclyn. (1978). *Tratado de Microbiología con inclusión de Inmunología y Genética Molecular* (2 ed.). Barcelona: Salvat.
- Daffis, S., Szretter, K. J., Schriewer, J., Li, J., Youn, S., Errett, J., Diamond, M. S. (2010). 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature*, 468(7322), 452-456. doi:10.1038/nature09489
- Dalrymple, N. A., Cimica, V., & Mackow, E. R. (2015). Dengue Virus NS Proteins Inhibit RIG-I/MAVS Signaling by Blocking TBK1/IRF3 Phosphorylation: Dengue Virus Serotype 1 NS4A Is a Unique Interferon-Regulating Virulence Determinant. *mBio*, 6(3), e00553-00515. doi:10.1128/mBio.00553-15

- Dandawate, C. N., Rajagopalan, P. K., Pavri, K. M., & Work, T. H. (1969). Virus isolations from mosquitoes collected in North Arcot district, Madras state, and Chittoor district, Andhra Pradesh between November 1955 and October 1957. *Indian J Med Res*, *57*(8), 1420-1426.
- David, S., & Abraham, A. M. (2016). Epidemiological and clinical aspects on West Nile virus, a globally emerging pathogen. *Infect Dis (Lond)*, *48*(8), 571-586. doi:10.3109/23744235.2016.1164890
- Dayan, G. H., Bevilacqua, J., Coleman, D., Buldo, A., & Risi, G. (2012). Phase II, dose ranging study of the safety and immunogenicity of single dose West Nile vaccine in healthy adults  $\geq$  50 years of age. *Vaccine*, *30*(47), 6656-6664. doi:10.1016/j.vaccine.2012.08.063
- de Farias, S. T., Dos Santos Junior, A. P., Rêgo, T. G., & José, M. V. (2017). Origin and Evolution of RNA-Dependent RNA Polymerase. *Front Genet*, *8*, 125. doi:10.3389/fgene.2017.00125
- de Oliveira Dias, J. R., Ventura, C. V., de Paula Freitas, B., Prazeres, J., Ventura, L. O., Bravo-Filho, V., Group, Zika Virus Study. (2018). Zika and the Eye: Pieces of a Puzzle. *Prog Retin Eye Res*, *66*, 85-106. doi:10.1016/j.preteyeres.2018.04.004
- Deckard, D. T., Chung, W. M., Brooks, J. T., Smith, J. C., Woldai, S., Hennessey, M., Mead, P. (2016). Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus--Texas, January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, *65*(14), 372-374. doi:10.15585/mmwr.mm6514a3
- Decroly, E., Ferron, F., Lescar, J., & Canard, B. (2011). Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA. *Nat Rev Microbiol*, *10*(1), 51-65. doi:10.1038/nrmicro2675
- Delang, L., Abdelnabi, R., & Neyts, J. (2018). Favipiravir as a potential countermeasure against neglected and emerging RNA viruses. *Antiviral Res*, *153*, 85-94. doi:10.1016/j.antiviral.2018.03.003
- Delvecchio, R., Higa, L. M., Pezzuto, P., Valadão, A. L., Garcez, P. P., Monteiro, F. L., Tanuri, A. (2016). Chloroquine, an Endocytosis Blocking Agent, Inhibits Zika Virus Infection in Different Cell Models. *Viruses*, *8*(12). doi:10.3390/v8120322
- Diaz-San Segundo, F., Medina, G. N., Stenfeldt, C., Arzt, J., & de Los Santos, T. (2017). Foot-and-mouth disease vaccines. *Vet Microbiol*, *206*, 102-112. doi:10.1016/j.vetmic.2016.12.018
- Dick, G. W. A., Kitchen, S. F., & Haddow, A. J. (1952). Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *46*(5), 509-520. doi:10.1016/0035-9203(52)90042-4
- Dimmock, N., Easton, A., & Leppard, K. (2007). *Introduction to Modern Virology*: John Wiley & Sons.

- Domingo, E., Ruiz-Jarabo, C. M., Sierra, S., Arias, A., Pariente, N., Baranowski, E., & Escarmis, C. (2002). Emergence and selection of RNA virus variants: memory and extinction. *Virus Res*, *82*(1-2), 39-44. doi:10.1016/s0168-1702(01)00385-9
- Dong, H., Chang, D. C., Xie, X., Toh, Y. X., Chung, K. Y., Zou, G., Shi, P. Y. (2010). Biochemical and genetic characterization of dengue virus methyltransferase. *Virology*, *405*(2), 568-578. doi:10.1016/j.virol.2010.06.039
- Dragoni, F., Boccuto, A., Picarazzi, F., Giannini, A., Giammarino, F., Saladini, F., Vicenti, I. (2020). Evaluation of sofosbuvir activity and resistance profile against West Nile virus in vitro. *Antiviral Res*, *175*, 104708. doi:10.1016/j.antiviral.2020.104708
- Driscoll, M. D., Rentergent, J., & Hay, S. (2014). A quantitative fluorescence-based steady-state assay of DNA polymerase. *Febs j*, *281*(8), 2042-2050. doi:10.1111/febs.12760
- Duan, W., Song, H., Wang, H., Chai, Y., Su, C., Qi, J., Gao, G. F. (2017). The crystal structure of Zika virus NS5 reveals conserved drug targets. *EMBO J*, *36*(7), 919-933. doi:10.15252/embj.201696241
- Duffy, M. R., Chen, T. H., Hancock, W. T., Powers, A. M., Kool, J. L., Lanciotti, R. S., Hayes, E. B. (2009). Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*, *360*(24), 2536-2543. doi:10.1056/NEJMoa0805715
- Dupont-Rouzeyrol, M., O'Connor, O., Calvez, E., Daurès, M., John, M., Grangeon, J. P., & Gourinat, A. C. (2015). Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. *Emerg Infect Dis*, *21*(2), 381-382. doi:10.3201/eid2102.141553
- Dwivedy, A., Mariadasse, R., Ahmad, M., Chakraborty, S., Kar, D., Tiwari, S., Biswal, B. K. (2021). Characterization of the NiRAN domain from RNA-dependent RNA polymerase provides insights into a potential therapeutic target against SARS-CoV-2. *PLoS Comput Biol*, *17*(9), e1009384. doi:10.1371/journal.pcbi.1009384
- ECDC. (2016). *Zika virus epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome (first update)*. Retrieved from Stockholm: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/rapid-risk-assessment-zika-virus-first-update-jan-2016.pdf>
- Edwards, R. A., & Rohwer, F. (2005). Viral metagenomics. *Nat Rev Microbiol*, *3*(6), 504-510. doi:10.1038/nrmicro1163
- Eigen, M. (1971). Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften*, *58*(10), 465-523. doi:10.1007/BF00623322
- Eigen, M. (2002). Error catastrophe and antiviral strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(21), 13374-13376. doi:10.1073/pnas.212514799

- Elena, S. F. (2012). RNA virus genetic robustness: possible causes and some consequences. *Curr Opin Virol*, 2(5), 525-530. doi:10.1016/j.coviro.2012.06.008
- Elena, S. F., Bedhomme, S., Carrasco, P., Cuevas, J. M., de la Iglesia, F., Lafforgue, G., Zwart, M. P. (2011). The evolutionary genetics of emerging plant RNA viruses. *Mol Plant Microbe Interact*, 24(3), 287-293. doi:10.1094/MPMI-09-10-0214
- Elfiky, A. A. (2020). Anti-HCV, nucleotide inhibitors, repurposing against COVID-19. *Life Sci*, 248, 117477. doi:10.1016/j.lfs.2020.117477
- Eltahla, A. A., Lackovic, K., Marquis, C., Eden, J. S., & White, P. A. (2013). A fluorescence-based high-throughput screen to identify small compound inhibitors of the genotype 3a hepatitis C virus RNA polymerase. *J Biomol Screen*, 18(9), 1027-1034. doi:10.1177/1087057113489883
- Eltahla, A. A., Luciani, F., White, P. A., Lloyd, A. R., & Bull, R. A. (2015). Inhibitors of the Hepatitis C Virus Polymerase; Mode of Action and Resistance. *Viruses*, 7(10), 5206-5224. doi:10.3390/v7102868
- Emig, M., & Apple, D. J. (2004). Severe West Nile virus disease in healthy adults. *Clin Infect Dis*, 38(2), 289-292. doi:10.1086/380458
- Erbel, P., Schiering, N., D'Arcy, A., Renatus, M., Kroemer, M., Lim, S. P., Hommel, U. (2006). Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. *Nat Struct Mol Biol*, 13(4), 372-373. doi:10.1038/nsmb1073
- Escribano-Romero, E., Jiménez de Oya, N., Domingo, E., & Saiz, J. C. (2017). Extinction of West Nile Virus by Favipiravir through Lethal Mutagenesis. *Antimicrob Agents Chemother*, 61(11). doi:10.1128/AAC.01400-17
- Eyer, L., Fojtíková, M., Nencka, R., Rudolf, I., Hubálek, Z., & Ruzek, D. (2019). Viral RNA-Dependent RNA Polymerase Inhibitor 7-Deaza-2'-. *Antimicrob Agents Chemother*, 63(3). doi:10.1128/AAC.02093-18
- Facciola, A., Visalli, G., Laganà, P., La Fauci, V., Squeri, R., Pellicanò, G. F., Di Pietro, A. (2019). The new era of vaccines: the "nanovaccinology". *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 23(16), 7163-7182. doi:10.26355/eurrev\_201908\_18763
- Fajardo, T., Sanford, T. J., Mears, H. V., Jasper, A., Storrie, S., Mansur, D. S., & Sweeney, T. R. (2020). The flavivirus polymerase NS5 regulates translation of viral genomic RNA. *Nucleic Acids Res*, 48(9), 5081-5093. doi:10.1093/nar/gkaa242
- Fauci, A. S., & Morens, D. M. (2016). Zika Virus in the Americas--Yet Another Arbovirus Threat. *N Engl J Med*, 374(7), 601-604. doi:10.1056/NEJMp1600297
- Fay, M. M., Lyons, S. M., & Ivanov, P. (2017). RNA G-Quadruplexes in Biology: Principles and Molecular Mechanisms. *J Mol Biol*, 429(14), 2127-2147. doi:10.1016/j.jmb.2017.05.017

- FDA, US Food & Drug administration. (2021). November 30, 2021: Antimicrobial Drugs Advisory Committee Meeting Announcement. *Advisory committee meeting*. Retrieved from <https://www.fda.gov/advisory-committees/advisory-committee-calendar/november-30-2021-antimicrobial-drugs-advisory-committee-meeting-announcement-11302021-11302021>
- Ferrari, E., He, Z., Palermo, R. E., & Huang, H. C. (2008). Hepatitis C virus NS5B polymerase exhibits distinct nucleotide requirements for initiation and elongation. *J Biol Chem*, *283*(49), 33893-33901. doi:10.1074/jbc.M803094200
- Ferreira, A. C., Zaverucha-do-Valle, C., Reis, P. A., Barbosa-Lima, G., Vieira, Y. R., Mattos, M., . . . Souza, T. M. L. (2017). Sofosbuvir protects Zika virus-infected mice from mortality, preventing short- and long-term sequelae. *Sci Rep*, *7*(1), 9409. doi:10.1038/s41598-017-09797-8
- Ferreira, C. C., Campi-Azevedo, A. C., Peruhype-Magalhães, V., Costa-Pereira, C., Albuquerque, C. P., Muniz, L. F., da Mota, L. M. H. (2018). The 17D-204 and 17DD yellow fever vaccines: an overview of major similarities and subtle differences. *Expert Rev Vaccines*, *17*(1), 79-90. doi:10.1080/14760584.2018.1406800
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Agudo, R., Pérez-Luque, R., Escarmís, C., Domingo, E., & Verdaguer, N. (2006). The structure of a protein primer-polymerase complex in the initiation of genome replication. *EMBO J*, *25*(4), 880-888. doi:10.1038/sj.emboj.7600971
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Perez-Luque, R., Escarmis, C., Domingo, E., & Verdaguer, N. (2004). Structure of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase and its complex with a template-primer RNA. *J Biol Chem*, *279*(45), 47212-47221. doi:10.1074/jbc.M405465200
- Ferrer-Orta, C., Ferrero, D., & Verdaguer, N. (2015). RNA-Dependent RNA Polymerases of Picornaviruses: From the Structure to Regulatory Mechanisms. *Viruses*, *7*(8), 4438-4460. doi:10.3390/v7082829
- Ferrero, D., Ferrer-Orta, C., & Verdaguer, N. (2018). Viral RNA-Dependent RNA Polymerases: A Structural Overview. *Subcell Biochem*, *88*, 39-71. doi:10.1007/978-981-10-8456-0\_3
- Filomatori, C. V., Lodeiro, M. F., Alvarez, D. E., Samsa, M. M., Pietrasanta, L., & Gamarnik, A. V. (2006). A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes Dev*, *20*(16), 2238-2249. doi:10.1101/gad.1444206
- Fleith, R. C., Mears, H. V., Leong, X. Y., Sanford, T. J., Emmott, E., Graham, S. C., Sweeney, T. R. (2018). IFIT3 and IFIT2/3 promote IFIT1-mediated translation inhibition by enhancing binding to non-self RNA. *Nucleic Acids Res*, *46*(10), 5269-5285. doi:10.1093/nar/gky191
- Forest, Rohwer. (2003). Global Phage Diversity. *Cell*, *113*(2), 141. doi:[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00276-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00276-9)

- Furuta, Y., Gowen, B. B., Takahashi, K., Shiraki, K., Smee, D. F., & Barnard, D. L. (2013). Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res*, *100*(2), 446-454. doi:10.1016/j.antiviral.2013.09.015
- Gabriel, A. F. B., Alencar, A. P., & Miraglia, S. G. E.K. (2019). Dengue outbreaks: unpredictable incidence time series. *Epidemiol Infect*, *147*, e116. doi:10.1017/S0950268819000311
- Gao, Y., Yan, L., Huang, Y., Liu, F., Zhao, Y., Cao, L., Rao, Z. (2020). Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. *Science*, *368*(6492), 779-782. doi:10.1126/science.abb7498
- García, G., González, N., Pérez, A. B., Sierra, B., Aguirre, E., Rizo, D., Guzmán, M. G. (2011). Long-term persistence of clinical symptoms in dengue-infected persons and its association with immunological disorders. *Int J Infect Dis*, *15*(1), e38-43. doi:10.1016/j.ijid.2010.09.008
- García San Miguel Rodríguez-Alarcón, L., Fernández-Martínez, B., Sierra Moros, M. J., Vázquez, A., Julián Pachés, P., García Villacieros, E., Simón Soria, F. (2021). Unprecedented increase of West Nile virus neuroinvasive disease, Spain, summer 2020. *Euro Surveill*, *26*(19). doi:10.2807/1560-7917.ES.2021.26.19.2002010
- Gehring, M., & Laufer, S. A. (2019). Emerging and Re-Emerging Warheads for Targeted Covalent Inhibitors: Applications in Medicinal Chemistry and Chemical Biology. *J Med Chem*, *62*(12), 5673-5724. doi:10.1021/acs.jmedchem.8b01153
- Gharbi-Ayachi, A., Santhanakrishnan, S., Wong, Y. H., Chan, K. W. K., Tan, S. T., Bates, R. W., . . . Lescar, J. (2020). Non-nucleoside Inhibitors of Zika Virus RNA-Dependent RNA Polymerase. *J Virol*, *94*(21). doi:10.1128/JVI.00794-20
- Gibson, D. G. (2011). Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments. *Methods Enzymol*, *498*, 349-361. doi:10.1016/B978-0-12-385120-8.00015-2
- Glasner, D. R., Puerta-Guardo, H., Beatty, P. R., & Harris, E. (2018). The Good, the Bad, and the Shocking: The Multiple Roles of Dengue Virus Nonstructural Protein 1 in Protection and Pathogenesis. *Annu Rev Virol*, *5*(1), 227-253. doi:10.1146/annurev-virology-101416-041848
- Glatman-Freedman, A. (2002). Rubella vaccine. *Pediatr Rev*, *23*(3), 106-107; discussion 106-107. doi:10.1542/pir.23-3-106
- Godoy, A. S., Lima, G. M., Oliveira, K. I., Torres, N. U., Maluf, F. V., Guido, R. V., & Oliva, G. (2017). Crystal structure of Zika virus NS5 RNA-dependent RNA polymerase. In *Nat Commun* (Vol. 8, pp. 14764). England.
- Gong, E. Y., Kenens, H., Ivens, T., Dockx, K., Vermeiren, K., Vandercruyssen, G., Kraus, G. (2013). Expression and purification of dengue virus NS5 polymerase and development of a high-throughput enzymatic assay for screening inhibitors of

dengue polymerase. *Methods Mol Biol*, 1030, 237-247. doi:10.1007/978-1-62703-484-5\_19

Goodfellow, J. A., & Willison, H. J. (2016). Guillain-Barré syndrome: a century of progress. *Nat Rev Neurol*, 12(12), 723-731. doi:10.1038/nrneurol.2016.172

Gopala Reddy, S. B., Chin, W. X., & Shivananju, N. S. (2018). Dengue virus NS2 and NS4: Minor proteins, mammoth roles. *Biochem Pharmacol*, 154, 54-63. doi:10.1016/j.bcp.2018.04.008

Gotte, M., & Feld, J. J. (2016). Direct-acting antiviral agents for hepatitis C: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 13(6), 338-351. doi:10.1038/nrgastro.2016.60

Govero, J., Esakky, P., Scheaffer, S. M., Fernandez, E., Drury, A., Platt, D. J., Diamond, M. S. (2016). Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature*, 540(7633), 438-442. doi:10.1038/nature20556

Grant, A., Ponia, S. S., Tripathi, S., Balasubramaniam, V., Miorin, L., Sourisseau, M., García-Sastre, A. (2016). Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host Microbe*, 19(6), 882-890. doi:10.1016/j.chom.2016.05.009

Green, Michael R., & Sambrook, Joseph. (2012). *Molecular cloning : a laboratory manual* (U.S. Cold Spring Harbor Laboratory Press & Edición: 4 ed (1 de julio de 2012) Eds.). New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

Group, Microcephaly Epidemic Research. (2016). Microcephaly in Infants, Pernambuco State, Brazil, 2015. *Emerg Infect Dis*, 22(6), 1090-1093. doi:10.3201/eid2206.160062

Grubman, M. J., & Baxt, B. (2004). Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev*, 17(2), 465-493. doi:10.1128/CMR.17.2.465-493.2004

Gubler, D. J. (2007). The continuing spread of West Nile virus in the western hemisphere. *Clin Infect Dis*, 45(8), 1039-1046. doi:10.1086/521911

Gudnason, H., Dufva, M., Bang, D. D., & Wolff, A. (2007). Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Res*, 35(19), e127. doi:10.1093/nar/gkm671

Gulland, A. (2016). Zika virus is a global public health emergency, declares WHO. *BMJ*, 352, i657. doi:10.1136/bmj.i657

Gupta, K., Chen, M., & Rocker, J. (2020). Measles: taking steps forward to prevent going backwards. *Curr Opin Pediatr*, 32(3), 436-445. doi:10.1097/MOP.0000000000000895

- Gutsche, I., Coulibaly, F., Voss, J. E., Salmon, J., d'Alayer, J., Ermonval, M., Flamand, M. (2011). Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(19), 8003-8008. doi:10.1073/pnas.1017338108
- Guzman, M. G., & Harris, E. (2015). Dengue. *Lancet*, *385*(9966), 453-465. doi:10.1016/S0140-6736(14)60572-9
- Gwon, Y. D., Strand, M., Lindqvist, R., Nilsson, E., Saleeb, M., Elofsson, M., Evander, M. (2020). Antiviral Activity of Benzavir-2 against Emerging Flaviviruses. *Viruses*, *12*(3). doi:10.3390/v12030351
- Gyawali, N., Bradbury, R. S., & Taylor-Robinson, A. W. (2016). The global spread of Zika virus: is public and media concern justified in regions currently unaffected? *Infect Dis Poverty*, *5*, 37. doi:10.1186/s40249-016-0132-y
- Hagen, M., Tiley, L., Chung, T. D., & Krystal, M. (1995). The role of template-primer interactions in cleavage and initiation by the influenza virus polymerase. *J Gen Virol*, *76* ( Pt 3), 603-611. doi:10.1099/0022-1317-76-3-603
- Hassan, A., Sedenho, G. C., Vitale, P. A. M., Oliviera, M. N., & Crespilho, F. N. (2021). On the Weak Binding and Spectroscopic Signature of SARS-CoV-2 nsp14 Interaction with RNA. *Chembiochem*, *22*(24), 3410-3413. doi:10.1002/cbic.202100486
- Haviernik, J., Štefánik, M., Fojtíková, M., Kali, S., Tordo, N., Rudolf, I., Ruzek, D. (2018). Arbidol (Umifenovir): A Broad-Spectrum Antiviral Drug That Inhibits Medically Important Arthropod-Borne Flaviviruses. *Viruses*, *10*(4). doi:10.3390/v10040184
- Hecker, S. J., & Erion, M. D. (2008). Prodrugs of phosphates and phosphonates. *J Med Chem*, *51*(8), 2328-2345. doi:10.1021/jm701260b
- Helmy, Y. A., Fawzy, M., Elawad, A., Sobieh, A., Kenney, S. P., & Shehata, A. A. (2020). The COVID-19 Pandemic: A Comprehensive Review of Taxonomy, Genetics, Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control. *J Clin Med*, *9*(4). doi:10.3390/jcm9041225
- Hendrix, R. W. (2003). Bacteriophage genomics. *Curr Opin Microbiol*, *6*(5), 506-511. doi:10.1016/j.mib.2003.09.004
- Hendrix, R. W., & Casjens, S. (2006). Bacteriophage lambda and its genetic neighborhood. *The Bacteriophages*, 409-447.
- Higgs, P. G., & Lehman, N. (2015). The RNA World: molecular cooperation at the origins of life. *Nat Rev Genet*, *16*(1), 7-17. doi:10.1038/nrg3841
- Holmes, K. K., Bertozzi, S., Bloom, B. R., & Jha, P. (2017). Major Infectious Diseases. In
- Hrnicek, M. J., & Mailliard, M. E. (2004). Acute west nile virus in two patients receiving interferon and ribavirin for chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol*, *99*(5), 957. doi:10.1111/j.1572-0241.2004.40130.x

- Hsu, J. C., Laurent-Rolle, M., Pawlak, J. B., Wilen, C. B., & Cresswell, P. (2021). Translational shutdown and evasion of the innate immune response by SARS-CoV-2 NSP14 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *118*(24). doi:10.1073/pnas.2101161118
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, *395*(10223), 497-506. doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5
- Hughes, J. P., Rees, S., Kalindjian, S. B., & Philpott, K. L. (2011). Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol*, *162*(6), 1239-1249. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x
- Hyodo, K., Kaido, M., & Okuno, T. (2014). Host and viral RNA-binding proteins involved in membrane targeting, replication and intercellular movement of plant RNA virus genomes. *Front Plant Sci*, *5*, 321. doi:10.3389/fpls.2014.00321
- Imbert, I., Guillemot, J. C., Bourhis, J. M., Bussetta, C., Coutard, B., Egloff, M. P., Canard, B. (2006). A second, non-canonical RNA-dependent RNA polymerase in SARS coronavirus. *EMBO J*, *25*(20), 4933-4942. doi:10.1038/sj.emboj.7601368
- Issur, M., Geiss, B. J., Bougie, I., Picard-Jean, F., Despins, S., Mayette, J., Bisailon, M. (2009). The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. *RNA*, *15*(12), 2340-2350. doi:10.1261/rna.1609709
- Izuta, S., Kohsaka-Ichikawa, M., Yamaguchi, T., & Saneyoshi, M. (1996). 3'-Deoxyribonucleotides inhibit eukaryotic DNA primase. *J Biochem*, *119*(6), 1038-1044. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021345
- Jaenisch, T., Rosenberger, K. D., Brito, C., Brady, O., Brasil, P., & Marques, E. T. (2017). Risk of microcephaly after Zika virus infection in Brazil, 2015 to 2016. *Bull World Health Organ*, *95*(3), 191-198. doi:10.2471/BLT.16.178608
- Jalasvuori, Matti. (2012). Revolutionary Struggle for Existence: Introduction to Four Intriguing Puzzles in Virus Research. In Günther Witzany (Ed.), *Viruses: Essential Agents of Life* (1 ed., pp. 1-19): Springer, Dordrecht.
- Javed, F., Manzoor, K. N., Ali, M., Haq, I. U., Khan, A. A., Zaib, A., & Manzoor, S. (2018). Zika virus: what we need to know? *J Basic Microbiol*, *58*(1), 3-16. doi:10.1002/jobm.201700398
- Jiménez, A., García, P., de la Puente, S., Madrona, A., Camarasa, M. J., Pérez-Pérez, M. J., San-Félix, A. (2018). A Novel Class of Cationic and Non-Peptidic Small Molecules as Hits for the Development of Antimicrobial Agents. *Molecules*, *23*(7). doi:10.3390/molecules23071513

- Jin, Y., Yang, H., Ji, W., Wu, W., Chen, S., Zhang, W., & Duan, G. (2020). Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. *Viruses*, *12*(4). doi:10.3390/v12040372
- Jin, Z., Leveque, V., Ma, H., Johnson, K. A., & Klumpp, K. (2012). Assembly, purification, and pre-steady-state kinetic analysis of active RNA-dependent RNA polymerase elongation complex. *J Biol Chem*, *287*(13), 10674-10683. doi:10.1074/jbc.M111.325530
- Jirasko, V., Montserret, R., Lee, J. Y., Gouttenoire, J., Moradpour, D., Penin, F., & Bartenschlager, R. (2010). Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. *PLoS Pathog*, *6*(12), e1001233. doi:10.1371/journal.ppat.1001233
- Jockusch, S., Tao, C., Li, X., Chien, M., Kumar, S., Morozova, I., Ju, J. (2020). Sofosbuvir terminated RNA is more resistant to SARS-CoV-2 proofreader than RNA terminated by Remdesivir. *Sci Rep*, *10*(1), 16577. doi:10.1038/s41598-020-73641-9
- Jordan, I., Briese, T., Fischer, N., Lau, J. Y., & Lipkin, W. I. (2000). Ribavirin inhibits West Nile virus replication and cytopathic effect in neural cells. *J Infect Dis*, *182*(4), 1214-1217. doi:10.1086/315847
- Jourdan, J. P., Bureau, R., Rochais, C., & Dallemagne, P. (2020). Drug repositioning: a brief overview. *J Pharm Pharmacol*, *72*(9), 1145-1151. doi:10.1111/jphp.13273
- Julander, J. G., Siddharthan, V., Evans, J., Taylor, R., Tolbert, K., Apuli, C., Babu, Y. S. (2017). Efficacy of the broad-spectrum antiviral compound BCX4430 against Zika virus in cell culture and in a mouse model. *Antiviral Res*, *137*, 14-22. doi:10.1016/j.antiviral.2016.11.003
- Jácome, R., Becerra, A., Ponce de León, S., & Lazcano, A. (2015). Structural Analysis of Monomeric RNA-Dependent Polymerases: Evolutionary and Therapeutic Implications. *PLoS One*, *10*(9), e0139001. doi:10.1371/journal.pone.0139001
- Jácome, R., Campillo-Balderas, J. A., Ponce de León, S., Becerra, A., & Lazcano, A. (2020). Sofosbuvir as a potential alternative to treat the SARS-CoV-2 epidemic. *Sci Rep*, *10*(1), 9294. doi:10.1038/s41598-020-66440-9
- Kadam, S. B., Sukhramani, G. S., Bishnoi, P., Pable, A. A., & Barvkar, V. T. (2021). SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *J Basic Microbiol*, *61*(3), 180-202. doi:10.1002/jobm.202000537
- Kamiyama, N., Soma, R., Hidano, S., Watanabe, K., Umekita, H., Fukuda, C., . Kobayashi, T. (2017). Ribavirin inhibits Zika virus (ZIKV) replication in vitro and suppresses viremia in ZIKV-infected STAT1-deficient mice. *Antiviral Res*, *146*, 1-11. doi:10.1016/j.antiviral.2017.08.007

- Kao, C. C., Singh, P., & Ecker, D. J. (2001). De novo initiation of viral RNA-dependent RNA synthesis. *Virology*, *287*(2), 251-260. doi:10.1006/viro.2001.1039
- Kaufman, H. L., Kohlhapp, F. J., & Zloza, A. (2015). Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov*, *14*(9), 642-662. doi:10.1038/nrd4663
- Ke, M., Chen, Y., Wu, A., Sun, Y., Su, C., Wu, H., Guo, D. (2012). Short peptides derived from the interaction domain of SARS coronavirus nonstructural protein nsp10 can suppress the 2'-O-methyltransferase activity of nsp10/nsp16 complex. *Virus Res*, *167*(2), 322-328. doi:10.1016/j.virusres.2012.05.017
- Kidmose, R. T., Vasiliev, N. N., Chetverin, A. B., Andersen, G. R., & Knudsen, C. R. (2010). Structure of the Qbeta replicase, an RNA-dependent RNA polymerase consisting of viral and host proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(24), 10884-10889. doi:10.1073/pnas.1003015107
- Kim, J. A., Seong, R. K., Kumar, M., & Shin, O. S. (2018). Favipiravir and Ribavirin Inhibit Replication of Asian and African Strains of Zika Virus in Different Cell Models. *Viruses*, *10*(2). doi:10.3390/v10020072
- Kiser, J. J., & Flexner, C. (2013). Direct-acting antiviral agents for hepatitis C virus infection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *53*, 427-449. doi:10.1146/annurev-pharmtox-011112-140254
- Klase, Z. A., Khakhina, S., Schneider, A.e B, Callahan, M. V., Glasspool-Malone, J., & Malone, R. (2016). Zika Fetal Neuropathogenesis: Etiology of a Viral Syndrome. *PLoS Negl Trop Dis*, *10*(8), e0004877. doi:10.1371/journal.pntd.0004877
- Knight-Jones, T. J., & Rushton, J. (2013). The economic impacts of foot and mouth disease - what are they, how big are they and where do they occur? *Prev Vet Med*, *112*(3-4), 161-173. doi:10.1016/j.prevetmed.2013.07.013
- Koonin, E. V., & Dolja, V. V. (2013). A virocentric perspective on the evolution of life. *Curr Opin Virol*, *3*(5), 546-557. doi:10.1016/j.coviro.2013.06.008
- Koonin, E. V., & Dolja, V. V. (2014). Virus world as an evolutionary network of viruses and capsidless selfish elements. *Microbiol Mol Biol Rev*, *78*(2), 278-303. doi:10.1128/MMBR.00049-13
- Koonin, E. V., Dolja, V. V., & Krupovic, M. (2015). Origins and evolution of viruses of eukaryotes: The ultimate modularity. *Virology*, *479-480*, 2-25. doi:10.1016/j.virol.2015.02.039
- Korhonen, E. M., Huhtamo, E., Smura, T., Kallio-Kokko, H., Raassina, M., & Vapalahti, O. (2016). Zika virus infection in a traveller returning from the Maldives, June 2015. *Euro Surveill*, *21*(2). doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.2.30107

- Koudelka, T., Boger, J., Henkel, A., Schönherr, R., Krantz, S., Fuchs, S., Tholey, A. (2021). N-Terminomics for the Identification of In Vitro Substrates and Cleavage Site Specificity of the SARS-CoV-2 Main Protease. *Proteomics*, 21(2), e2000246. doi:10.1002/pmic.202000246
- Krafcikova, P., Silhan, J., Nencka, R., & Boura, E. (2020). Structural analysis of the SARS-CoV-2 methyltransferase complex involved in RNA cap creation bound to sinefungin. *Nat Commun*, 11(1), 3717. doi:10.1038/s41467-020-17495-9
- Kristensen, D. M., Mushegian, A. R., Dolja, V. V., & Koonin, E. V. (2010). New dimensions of the virus world discovered through metagenomics. *Trends Microbiol*, 18(1), 11-19. doi:10.1016/j.tim.2009.11.003
- Kristensen, D. M., Waller, A. S., Yamada, T., Bork, P., Mushegian, A. R., & Koonin, E. V. (2013). Orthologous gene clusters and taxon signature genes for viruses of prokaryotes. *J Bacteriol*, 195(5), 941-950. doi:10.1128/JB.01801-12
- LaDeau, S. L., Kilpatrick, A. M., & Marra, P. P. (2007). West Nile virus emergence and large-scale declines of North American bird populations. *Nature*, 447(7145), 710-713. doi:10.1038/nature05829
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. doi:10.1038/227680a0
- Lanciotti, R. S., Lambert, A. J., Holodniy, M., Saavedra, S., & Signor, L. C. (2016). Phylogeny of Zika Virus in Western Hemisphere, 2015. *Emerg Infect Dis*, 22(5), 933-935. doi:10.3201/eid2205.160065
- Laurila, M. R., Makeyev, E. V., & Bamford, D. H. (2002). Bacteriophage phi 6 RNA-dependent RNA polymerase: molecular details of initiating nucleic acid synthesis without primer. *J Biol Chem*, 277(19), 17117-17124. doi:10.1074/jbc.M111220200
- Lauring, A. S., & Andino, R. (2010). Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog*, 6(7), e1001005. doi:10.1371/journal.ppat.1001005
- Lawrie, C. H., Uzcátegui, N. Y., Gould, E. A., & Nuttall, P. A. (2004). Ixodid and argasid tick species and west nile virus. *Emerg Infect Dis*, 10(4), 653-657. doi:10.3201/eid1004.030517
- Ledgerwood, J. E., Pierson, T. C., Hubka, S. A., Desai, N., Rucker, S., Gordon, I. J., Team, VRC 303 Study. (2011). A West Nile virus DNA vaccine utilizing a modified promoter induces neutralizing antibody in younger and older healthy adults in a phase I clinical trial. *J Infect Dis*, 203(10), 1396-1404. doi:10.1093/infdis/jir054
- Lee, C. C., Hsieh, C. C., & Ko, W. C. (2021). Molnupiravir-A Novel Oral Anti-SARS-CoV-2 Agent. *Antibiotics (Basel)*, 10(11). doi:10.3390/antibiotics10111294

- Lee, J. H., Chung, M. S., & Kim, K. H. (2017). Structure and Function of Caliciviral RNA Polymerases. *Viruses*, *9*(11). doi:10.3390/v9110329
- Lee, L. A., & Wang, Q. (2006). Adaptations of nanoscale viruses and other protein cages for medical applications. *Nanomedicine*, *2*(3), 137-149. doi:10.1016/j.nano.2006.07.009
- Lehmann, K. C., Gulyaeva, A., Zevenhoven-Dobbe, J. C., Janssen, G. M., Ruben, M., Overkleeft, H. S., Gorbalenya, A. E. (2015). Discovery of an essential nucleotidylating activity associated with a newly delineated conserved domain in the RNA polymerase-containing protein of all nidoviruses. *Nucleic Acids Res*, *43*(17), 8416-8434. doi:10.1093/nar/gkv838
- Lei, J., Kusov, Y., & Hilgenfeld, R. (2018). Nsp3 of coronaviruses: Structures and functions of a large multi-domain protein. *Antiviral Res*, *149*, 58-74. doi:10.1016/j.antiviral.2017.11.001
- Lescar, J., Luo, D., Xu, T., Sampath, A., Lim, S. P., Canard, B., & Vasudevan, S. G. (2008). Towards the design of antiviral inhibitors against flaviviruses: the case for the multifunctional NS3 protein from Dengue virus as a target. *Antiviral Res*, *80*(2), 94-101. doi:10.1016/j.antiviral.2008.07.001
- Li, D., Fedeles, B. I., Singh, V., Peng, C. S., Silvestre, K. J., Simi, A. K., Essigmann, J. M. (2014). Tautomerism provides a molecular explanation for the mutagenic properties of the anti-HIV nucleoside 5-aza-5,6-dihydro-2'-deoxycytidine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(32), E3252-3259. doi:10.1073/pnas.1405635111
- Li, K., Phoo, W. W., & Luo, D. (2014). Functional interplay among the flavivirus NS3 protease, helicase, and cofactors. *Viol Sin*, *29*(2), 74-85. doi:10.1007/s12250-014-3438-6
- Li, X., Mukandavire, C., Cucunubá, Z. M., Echeverria Londono, S., Abbas, K., Clapham, H. E., . . . Consortium, Vaccine Impact Modelling. (2021). Estimating the health impact of vaccination against ten pathogens in 98 low-income and middle-income countries from 2000 to 2030: a modelling study. *Lancet*, *397*(10272), 398-408. doi:10.1016/S0140-6736(20)32657-X
- Li, Y., Liu, S., Zhang, S., Ju, Q., Yang, Y., & Wang, H. (2020). Current treatment approaches for COVID-19 and the clinical value of transfusion-related technologies. *Transfus Apher Sci*, *59*(5), 102839. doi:10.1016/j.transci.2020.102839
- Li, Z., Brecher, M., Deng, Y. Q., Zhang, J., Sakamuru, S., Liu, B., Li, H. (2017). Existing drugs as broad-spectrum and potent inhibitors for Zika virus by targeting NS2B-NS3 interaction. *Cell Res*, *27*(8), 1046-1064. doi:10.1038/cr.2017.88
- Lim, S. P., Koh, J. H., Seh, C. C., Liew, C. W., Davidson, A. D., Chua, L. S., Lescar, J. (2013). A crystal structure of the dengue virus non-structural protein 5 (NS5) polymerase delineates interdomain amino acid residues that enhance its thermostability and

- de novo initiation activities. *J Biol Chem*, 288(43), 31105-31114. doi:10.1074/jbc.M113.508606
- Lim, S. P., Noble, C. G., Nilar, S., Shi, P. Y., & Yokokawa, F. (2018). Discovery of Potent Non-nucleoside Inhibitors of Dengue Viral RNA-Dependent RNA Polymerase from Fragment Screening and Structure-Guided Design. *Adv Exp Med Biol*, 1062, 187-198. doi:10.1007/978-981-10-8727-1\_14
- Lim, S. P., Noble, C. G., Seh, C. C., Soh, T. S., El Sahili, A., Chan, G. K., Yokokawa, F. (2016). Potent Allosteric Dengue Virus NS5 Polymerase Inhibitors: Mechanism of Action and Resistance Profiling. *PLoS Pathog*, 12(8), e1005737. doi:10.1371/journal.ppat.1005737
- Lin, C. C., Philips, L., Xu, C., & Yeh, L. T. (2004). Pharmacokinetics and safety of viremagine, a prodrug of ribavirin, in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*, 44(3), 265-275. doi:10.1177/0091270004262974
- Lin, S., Chen, H., Chen, Z., Yang, F., Ye, F., Zheng, Y., Lu, G. (2021). Crystal structure of SARS-CoV-2 nsp10 bound to nsp14-ExoN domain reveals an exoribonuclease with both structural and functional integrity. *Nucleic Acids Res*, 49(9), 5382-5392. doi:10.1093/nar/gkab320
- Lin, Y., Zhang, H., Song, W., Si, S., Han, Y., & Jiang, J. (2019). Identification and characterization of Zika virus NS5 RNA-dependent RNA polymerase inhibitors. *Int J Antimicrob Agents*, 54(4), 502-506. doi:10.1016/j.ijantimicag.2019.07.010
- Lindenbach, Brett, Randall, Glenn, Bartenschlager, Ralf, & Rice, Charles M. (2021). Flaviviridae: The viruses and their replication. In Howley PM, Knipe DM (Ed.), *Fields Virology: Emerging Viruses* (7 ed., Vol. 1, pp. 1153-1252). Philadelphia: WOLTERS KLUWER.
- Lorenz, I. C., Marcotrigiano, J., Dentzer, T. G., & Rice, C. M. (2006). Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature*, 442(7104), 831-835. doi:10.1038/nature04975
- Lu, G., & Gong, P. (2013). Crystal Structure of the full-length Japanese encephalitis virus NS5 reveals a conserved methyltransferase-polymerase interface. *PLoS Pathog*, 9(8), e1003549. doi:10.1371/journal.ppat.1003549
- Lu, G., & Gong, P. (2017). A structural view of the RNA-dependent RNA polymerases from the Flavivirus genus. *Virus Res*, 234, 34-43. doi:10.1016/j.virusres.2017.01.020
- Luo, D., Xu, T., Hunke, C., Grüber, G., Vasudevan, S. G., & Lescar, J. (2008). Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus. *J Virol*, 82(1), 173-183. doi:10.1128/JVI.01788-07
- Luo, G., Hamatake, R. K., Mathis, D. M., Racela, J., Rigat, K. L., Lemm, J., & Colonno, R. J. (2000). De novo initiation of RNA synthesis by the RNA-dependent RNA

- polymerase (NS5B) of hepatitis C virus. *J Virol*, 74(2), 851-863. doi:10.1128/jvi.74.2.851-863.2000
- Ma, W., He, H., & Wang, H. (2018). Oncolytic herpes simplex virus and immunotherapy. *BMC Immunol*, 19(1), 40. doi:10.1186/s12865-018-0281-9
- Maag, D., Castro, C., Hong, Z., & Cameron, C. E. (2001). Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin. *J Biol Chem*, 276(49), 46094-46098. doi:10.1074/jbc.C100349200
- Mackenzie, J. S., Gubler, D. J., & Petersen, L. R. (2004). Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med*, 10(12 Suppl), S98-109. doi:10.1038/nm1144
- Macnamara, F. N. (1954). Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 48(2), 139-145. doi:10.1016/0035-9203(54)90006-1
- Madhvi, A., Hingane, S., Srivastav, R., Joshi, N., Subramani, C., Muthumohan, R., Ranjith-Kumar, C. T. (2017). A screen for novel hepatitis C virus RdRp inhibitor identifies a broad-spectrum antiviral compound. In *Sci Rep* (Vol. 7, pp. 5816). England.
- Magnus, M. M., Espósito, D. L. A., Costa, V. A. D., Melo, P. S., Costa-Lima, C., Fonseca, B. A. L.D., & Addas-Carvalho, M. (2018). Risk of Zika virus transmission by blood donations in Brazil. *Hematol Transfus Cell Ther*, 40(3), 250-254. doi:10.1016/j.htct.2018.01.011
- Mahmoudabadi, G., & Phillips, R. (2018). A comprehensive and quantitative exploration of thousands of viral genomes. *Elife*, 7. doi:10.7554/eLife.31955
- Malet, H., Egloff, M. P., Selisko, B., Butcher, R. E., Wright, P. J., Roberts, M., Canard, B. (2007). Crystal structure of the RNA polymerase domain of the West Nile virus non-structural protein 5. *J Biol Chem*, 282(14), 10678-10689. doi:10.1074/jbc.M607273200
- Malet, H., Masse, N., Selisko, B., Romette, J. L., Alvarez, K., Guillemot, J. C., . Canard, B. (2008). The flavivirus polymerase as a target for drug discovery. *Antiviral Res*, 80(1), 23-35. doi:10.1016/j.antiviral.2008.06.007
- Manns, M. P., Foster, G. R., Rockstroh, J. K., Zeuzem, S., Zoulim, F., & Houghton, M. (2007). The way forward in HCV treatment--finding the right path. *Nat Rev Drug Discov*, 6(12), 991-1000. doi:10.1038/nrd2411
- Mansfield, K. L., Hernández-Triana, L. M., Banyard, A. C., Fooks, A. R., & Johnson, N. (2017). Japanese encephalitis virus infection, diagnosis and control in domestic animals. *Vet Microbiol*, 201, 85-92. doi:10.1016/j.vetmic.2017.01.014
- Mao, H. H., & Chao, S. (2020). Advances in Vaccines. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 171, 155-188. doi:10.1007/10\_2019\_107

- Martínez, Miguel Angel, Martrus, Gloria, Capel, Elena, Parera, Mariona, Franco, Sandra, & Nevot, Maria. (2012). Quasispecies Dynamics of RNA Viruses. In Günther Witzany (Ed.), *Viruses: Essential Agents of Life* (pp. 21-42). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Marukian, S., Jones, C. T., Andrus, L., Evans, M. J., Ritola, K. D., Charles, E. D., Dustin, L. B. (2008). Cell culture-produced hepatitis C virus does not infect peripheral blood mononuclear cells. *Hepatology*, *48*(6), 1843-1850. doi:10.1002/hep.22550
- Massari, S., Desantis, J., Nizi, M. G., Cecchetti, V., & Tabarrini, O. (2021). Inhibition of Influenza Virus Polymerase by Interfering with Its Protein-Protein Interactions. *ACS Infect Dis*, *7*(6), 1332-1350. doi:10.1021/acsinfecdis.0c00552
- Mastrangelo, E., Pezzullo, M., De Burghgraeve, T., Kaptein, S., Pastorino, B., Dallmeier, K., Milani, M. (2012). Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: new prospects for an old drug. *J Antimicrob Chemother*, *67*(8), 1884-1894. doi:10.1093/jac/dks147
- McClure, W. R. (1985). Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. *Annu Rev Biochem*, *54*, 171-204. doi:10.1146/annurev.bi.54.070185.001131
- McCluskey, S. M., Siedner, M. J., & Marconi, V. C. (2019). Management of Virologic Failure and HIV Drug Resistance. *Infect Dis Clin North Am*, *33*(3), 707-742. doi:10.1016/j.idc.2019.05.004
- McDonald, S. M., Tao, Y. J., & Patton, J. T. (2009). The ins and outs of four-tunneled Reoviridae RNA-dependent RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol*, *19*(6), 775-782. doi:10.1016/j.sbi.2009.10.007
- McKercher, G., Beaulieu, P. L., Lamarre, D., LaPlante, S., Lefebvre, S., Pellerin, C., Kukolj, G. (2004). Specific inhibitors of HCV polymerase identified using an NS5B with lower affinity for template/primer substrate. *Nucleic Acids Res*, *32*(2), 422-431. doi:10.1093/nar/gkh160
- Mentré, F., Taburet, A. M., Guedj, J., Anglaret, X., Keïta, S., de Lamballerie, X., & Malvy, D. (2015). Dose regimen of favipiravir for Ebola virus disease. *Lancet Infect Dis*, *15*(2), 150-151. doi:10.1016/S1473-3099(14)71047-3
- Meny, G. M., Santos-Zabala, L., Szallasi, A., & Stramer, S. L. (2011). West Nile virus infection transmitted by granulocyte transfusion. *Blood*, *117*(21), 5778-5779. doi:10.1182/blood-2011-02-335901
- Meyer, H., Ehmann, R., & Smith, G. L. (2020). Smallpox in the Post-Eradication Era. *Viruses*, *12*(2). doi:10.3390/v12020138
- Meyerowitz, E. A., Richterman, A., Gandhi, R. T., & Sax, P. E. (2021). Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors. *Ann Intern Med*, *174*(1), 69-79. doi:10.7326/M20-5008

- Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. (2021). Actualización nº 360. Enfermedad por el coronavirus (COVID-19). 23.04.2021. Retrieved from <https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/situacionActual.htm>
- Monis, P. T., Giglio, S., & Saint, C. P. (2005). Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Anal Biochem*, *340*(1), 24-34. doi:10.1016/j.ab.2005.01.046
- Morrey, J. D., Day, C. W., Julander, J. G., Blatt, L. M., Smee, D. F., & Sidwell, R. W. (2004). Effect of interferon-alpha and interferon-inducers on West Nile virus in mouse and hamster animal models. *Antivir Chem Chemother*, *15*(2), 101-109. doi:10.1177/095632020401500202
- Morrey, J. D., Taro, B. S., Siddharthan, V., Wang, H., Smee, D. F., Christensen, A. J., & Furuta, Y. (2008). Efficacy of orally administered T-705 pyrazine analog on lethal West Nile virus infection in rodents. *Antiviral Res*, *80*(3), 377-379. doi:10.1016/j.antiviral.2008.07.009
- Morrison, J., Laurent-Rolle, M., Maestre, A. M., Rajsbaum, R., Pisanelli, G., Simon, V., García-Sastre, A. (2013). Dengue virus co-opts UBR4 to degrade STAT2 and antagonize type I interferon signaling. *PLoS Pathog*, *9*(3), e1003265. doi:10.1371/journal.ppat.1003265
- Morse, J. S., Lalonde, T., Xu, S., & Liu, W. R. (2020). Learning from the Past: Possible Urgent Prevention and Treatment Options for Severe Acute Respiratory Infections Caused by 2019-nCoV. *Chembiochem*, *21*(5), 730-738. doi:10.1002/cbic.202000047
- Mosley, R. T., Edwards, T. E., Murakami, E., Lam, A. M., Grice, R. L., Du, J., Otto, M. J. (2012). Structure of hepatitis C virus polymerase in complex with primer-template RNA. *J Virol*, *86*(12), 6503-6511. doi:10.1128/jvi.00386-12
- Mukhra, R., Krishan, K., & Kanchan, T. (2020). Possible modes of transmission of Novel coronavirus SARS-CoV-2: a review. *Acta Biomed*, *91*(3), e2020036. doi:10.23750/abm.v91i3.10039
- Mullins, J. I., Heath, L., Hughes, J. P., Kicha, J., Styrchak, S., Wong, K. G., Parkins, J. (2011). Mutation of HIV-1 genomes in a clinical population treated with the mutagenic nucleoside KP1461. *PLoS One*, *6*(1), e15135. doi:10.1371/journal.pone.0015135
- Munjal, A., Khandia, R., Dhama, K., Sachan, S., Karthik, K., Tiwari, R., Joshi, S. K. (2017). Advances in Developing Therapies to Combat Zika Virus: Current Knowledge and Future Perspectives. *Front Microbiol*, *8*, 1469. doi:10.3389/fmicb.2017.01469
- Musso, D., Stramer, S. L., Busch, M. P., Committee, AABB Transfusion-Transmitted Diseases, & Diseases, International Society of Blood Transfusion Working Party on Transfusion-Transmitted Infectious. (2016). Zika virus: a new challenge for

- blood transfusion. *Lancet*, 387(10032), 1993-1994. doi:10.1016/S0140-6736(16)30428-7
- Más, A., López-Galíndez, C., Cacho, I., Gómez, J., & Martínez, M. A. (2010). Unfinished stories on viral quasispecies and Darwinian views of evolution. *J Mol Biol*, 397(4), 865-877. doi:10.1016/j.jmb.2010.02.005
- Mönttinen, H. A., Ravantti, J. J., Stuart, D. I., & Poranen, M. M. (2014). Automated structural comparisons clarify the phylogeny of the right-hand-shaped polymerases. *Mol Biol Evol*, 31(10), 2741-2752. doi:10.1093/molbev/msu219
- Müller, W. E., Weiler, B. E., Charubala, R., Pfeleiderer, W., Leserman, L., Sobol, R. W., Schröder, H. C. (1991). Cordycepin analogues of 2',5'-oligoadenylate inhibit human immunodeficiency virus infection via inhibition of reverse transcriptase. *Biochemistry*, 30(8), 2027-2033. doi:10.1021/bi00222a004
- Naidu, S. A. G., Mustafa, G., Clemens, R. A., & Naidu, A. S. (2021). Plant-Derived Natural Non-Nucleoside Analog Inhibitors (NNAIs) against. *J Diet Suppl*, 1-30. doi:10.1080/19390211.2021.2006387
- Nayak, A., Goodfellow, I. G., & Belsham, G. J. (2005). Factors required for the Uridylylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) in vitro. In *J Virol* (Vol. 79, pp. 7698-7706). United States.
- Nelemans, T., & Kikkert, M. (2019). Viral Innate Immune Evasion and the Pathogenesis of Emerging RNA Virus Infections. *Viruses*, 11(10). doi:10.3390/v11100961
- Nelson, J., Roe, K., Orillo, B., Shi, P. Y., & Verma, S. (2015). Combined treatment of adenosine nucleoside inhibitor NITD008 and histone deacetylase inhibitor vorinostat represents an immunotherapy strategy to ameliorate West Nile virus infection. *Antiviral Res*, 122, 39-45. doi:10.1016/j.antiviral.2015.07.008
- Neufeldt, C. J., Cortese, M., Acosta, E. G., & Bartenschlager, R. (2018). Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nat Rev Microbiol*, 16(3), 125-142. doi:10.1038/nrmicro.2017.170
- Ng, K. K., Arnold, J. J., & Cameron, C. E. (2008). Structure-function relationships among RNA-dependent RNA polymerases. *Curr Top Microbiol Immunol*, 320, 137-156. doi:10.1007/978-3-540-75157-1\_7
- Niyomrattanakit, P., Abas, S. N., Lim, C. C., Beer, D., Shi, P. Y., & Chen, Y. L. (2011). A fluorescence-based alkaline phosphatase-coupled polymerase assay for identification of inhibitors of dengue virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Biomol Screen*, 16(2), 201-210. doi:10.1177/1087057110389323
- Noble, C. G., Chen, Y. L., Dong, H., Gu, F., Lim, S. P., Schul, W., Shi, P. Y. (2010). Strategies for development of Dengue virus inhibitors. *Antiviral Res*, 85(3), 450-462. doi:10.1016/j.antiviral.2009.12.011

- Noble, C. G., Lim, S. P., Chen, Y. L., Liew, C. W., Yap, L., Lescar, J., & Shi, P. Y. (2013). Conformational flexibility of the Dengue virus RNA-dependent RNA polymerase revealed by a complex with an inhibitor. *J Virol*, *87*(9), 5291-5295. doi:10.1128/JVI.00045-13
- Oliveira Melo, A. S., Malinger, G., Ximenes, R., Szejnfeld, P. O., Alves Sampaio, S., & Bispo de Filippis, A. M. (2016). Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol*, *47*(1), 6-7. doi:10.1002/uog.15831
- Pagani Balletti, Raffaella. (2020). Enfermedades epidémicas y pandémicas: Causas, cronología e implicaciones socioculturales. *An Real Acad Farm*, *83*, 189-214.
- Panchaud, A., Stojanov, M., Ammerdorffer, A., Vouga, M., & Baud, D. (2016). Emerging Role of Zika Virus in Adverse Fetal and Neonatal Outcomes. *Clin Microbiol Rev*, *29*(3), 659-694. doi:10.1128/CMR.00014-16
- Pandit, P. S., Doyle, M. M., Smart, K. M., Young, C. C. W., Drape, G. W., & Johnson, C. K. (2018). Predicting wildlife reservoirs and global vulnerability to zoonotic Flaviviruses. *Nat Commun*, *9*(1), 5425. doi:10.1038/s41467-018-07896-2
- Parlati, L., & Pol, S. (2018). Direct acting antivirals failure: cause and retreatment options. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, *12*(12), 1245-1250. doi:10.1080/17474124.2018.1541237
- Patel, M., Zipursky, S., Orenstein, W., Garon, J., & Zaffran, M. (2015). Polio endgame: the global introduction of inactivated polio vaccine. *Expert Rev Vaccines*, *14*(5), 749-762. doi:10.1586/14760584.2015.1001750
- Paul, A. V., van Boom, J. H., Filippov, D., & Wimmer, E. (1998). Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature*, *393*(6682), 280-284. doi:10.1038/30529
- Paul, A. V., Yin, J., Mugavero, J., Rieder, E., Liu, Y., & Wimmer, E. (2003). A "slide-back" mechanism for the initiation of protein-primed RNA synthesis by the RNA polymerase of poliovirus. *J Biol Chem*, *278*(45), 43951-43960. doi:10.1074/jbc.M307441200
- Pene, F., Merlat, A., Vabret, A., Rozenberg, F., Buzyn, A., Dreyfus, F., Lebon, P. (2003). Coronavirus 229E-related pneumonia in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis*, *37*(7), 929-932. doi:10.1086/377612
- Peng, Q., Peng, R., Yuan, B., Zhao, J., Wang, M., Wang, X., Shi, Y. (2020). Structural and Biochemical Characterization of the nsp12-nsp7-nsp8 Core Polymerase Complex from SARS-CoV-2. *Cell Rep*, *31*(11), 107774. doi:10.1016/j.celrep.2020.107774
- Perales, C., Gallego, I., de Ávila, A. I., Soria, M. E., Gregori, J., Quer, J., & Domingo, E. (2019). The increasing impact of lethal mutagenesis of viruses. *Future Med Chem*, *11*(13), 1645-1657. doi:10.4155/fmc-2018-0457

- Petrović, T., Blazquez, A. B., Lupulović, D., Lazić, G., Escribano-Romero, E., Fabijan, D., Saiz, J. (2013). Monitoring West Nile virus (WNV) infection in wild birds in Serbia during 2012: first isolation and characterisation of WNV strains from Serbia. *Euro Surveill*, 18(44). doi:10.2807/1560-7917.es2013.18.44.20622
- Peña, I., Pilar Manzano, M., Cantizani, J., Kessler, A., Alonso-Padilla, J., Bardera, A. I., Julio Martin, J. (2015). New compound sets identified from high throughput phenotypic screening against three kinetoplastid parasites: an open resource. *Sci Rep*, 5, 8771. doi:10.1038/srep08771
- Phelps, C. C., Walker, C. M., & Honegger, J. R. (2021). Where to Next? Research Directions after the First Hepatitis C Vaccine Efficacy Trial. *Viruses*, 13(7). doi:10.3390/v13071351
- Picarazzi, F., Vicenti, I., Saladini, F., Zazzi, M., & Mori, M. (2020). Targeting the RdRp of Emerging RNA Viruses: The Structure-Based Drug Design Challenge. *Molecules*, 25(23). doi:10.3390/molecules25235695
- Pierson, T. C., & Diamond, M. S. (2018). The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. *Nature*, 560(7720), 573-581. doi:10.1038/s41586-018-0446-y
- Pierson, T. C., & Diamond, M. S. (2020). The continued threat of emerging flaviviruses. *Nat Microbiol*, 5(6), 796-812. doi:10.1038/s41564-020-0714-0
- Plourde, A. R., & Bloch, E. M. (2016). A Literature Review of Zika Virus. *Emerg Infect Dis*, 22(7), 1185-1192. doi:10.3201/eid2207.151990
- Pollard, C. A., Morran, M. P., & Nestor-Kalinowski, A. L. (2020). The COVID-19 pandemic: a global health crisis. *Physiol Genomics*, 52(11), 549-557. doi:10.1152/physiolgenomics.00089.2020
- Potisopon, S., Priet, S., Collet, A., Decroly, E., Canard, B., & Selisko, B. (2014). The methyltransferase domain of dengue virus protein NS5 ensures efficient RNA synthesis initiation and elongation by the polymerase domain. *Nucleic Acids Res*, 42(18), 11642-11656. doi:10.1093/nar/gku666
- Przedpelski, A., Tepp, W. H., Pellett, S., Johnson, E. A., & Barbieri, J. T. (2020). A Novel High-Potency Tetanus Vaccine. *mBio*, 11(4). doi:10.1128/mBio.01668-20
- Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P. A., Escott, K. J., Hopper, S., Wells, A., Pirmohamed, M. (2019). Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov*, 18(1), 41-58. doi:10.1038/nrd.2018.168
- Ranjith-Kumar, C. T., Gutshall, L., Kim, M. J., Sarisky, R. T., & Kao, C. C. (2002). Requirements for de novo initiation of RNA synthesis by recombinant flaviviral RNA-dependent RNA polymerases. *J Virol*, 76(24), 12526-12536. doi:10.1128/jvi.76.24.12526-12536.2002

- Rohwer, F., & Thurber, R. V. (2009). Viruses manipulate the marine environment. *Nature*, 459(7244), 207-212. doi:10.1038/nature08060
- Romano, M., Ruggiero, A., Squeglia, F., Maga, G., & Berisio, R. (2020). A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping. *Cells*, 9(5). doi:10.3390/cells9051267
- Ronca, S. E., Murray, K. O., & Nolan, M. S. (2019). Cumulative Incidence of West Nile Virus Infection, Continental United States, 1999-2016. *Emerg Infect Dis*, 25(2), 325-327. doi:10.3201/eid2502.180765
- Rose, K. M., Bell, L. E., & Jacob, S. T. (1977). Specific inhibition of chromatin-associated poly(A) synthesis in vitro by cordycepin 5'-triphosphate. *Nature*, 267(5607), 178-180. doi:10.1038/267178a0
- Roth, A., Mercier, A., Lepers, C., Hoy, D., Duituturaga, S., Benyon, E., . Souares, Y. (2014). Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012-2014. *Euro Surveill*, 19(41). doi:10.2807/1560-7917.es2014.19.41.20929
- Sacramento, C. Q., de Melo, G. R., de Freitas, C. S., Rocha, N., Hoelz, L. V., Miranda, M., Souza, T. M. (2017). The clinically approved antiviral drug sofosbuvir inhibits Zika virus replication. *Sci Rep*, 7, 40920. doi:10.1038/srep40920
- Saiz, J. C., & Martin-Acebes, M. A. (2017). The Race To Find Antivirals for Zika Virus. In *Antimicrob Agents Chemother* (Vol. 61). United States: 2017 American Society for Microbiology.
- Salehuddin, A. R., Haslan, H., Mamikutty, N., Zaidun, N. H., Azmi, M. F., Senin, M. M., Thent, Z. C. (2017). Zika virus infection and its emerging trends in Southeast Asia. *Asian Pac J Trop Med*, 10(3), 211-219. doi:10.1016/j.apjtm.2017.03.002
- Salzberger, B., Buder, F., Lampl, B., Ehrenstein, B., Hitzenbichler, F., Holzmann, T., Hanes, F. (2021). Epidemiology of SARS-CoV-2. *Infection*, 49(2), 233-239. doi:10.1007/s15010-020-01531-3
- Sanford, T. J., Mears, H. V., Fajardo, T., Locker, N., & Sweeney, T. R. (2019). Circularization of flavivirus genomic RNA inhibits de novo translation initiation. *Nucleic Acids Res*, 47(18), 9789-9802. doi:10.1093/nar/gkz686
- Sanjuán, R. (2010). Mutational fitness effects in RNA and single-stranded DNA viruses: common patterns revealed by site-directed mutagenesis studies. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365(1548), 1975-1982. doi:10.1098/rstb.2010.0063
- Saramago, M., Bárria, C., Costa, V. G., Souza, C. S., Viegas, S. C., Domingues, S., Matos, R. G. (2021). New targets for drug design: importance of nsp14/nsp10 complex formation for the 3'-5' exoribonucleolytic activity on SARS-CoV-2. *FEBS J*, 288(17), 5130-5147. doi:10.1111/febs.15815

- Sarno, M., Sacramento, G. A., Khouri, R., do Rosário, M. S., Costa, F., Archanjo, G., de Almeida, A. R. (2016). Zika Virus Infection and Stillbirths: A Case of Hydrops Fetalis, Hydranencephaly and Fetal Demise. *PLoS Negl Trop Dis*, *10*(2), e0004517. doi:10.1371/journal.pntd.0004517
- Schubert, K., Karousis, E. D., Jomaa, A., Scaiola, A., Echeverria, B., Gurzeler, L. A., Ban, N. (2020). SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation. *Nat Struct Mol Biol*, *27*(10), 959-966. doi:10.1038/s41594-020-0511-8
- Sebera, J., Dubankova, A., Sychrovsky, V., Ruzek, D., Boura, E., & Nencka, R. (2018). The structural model of Zika virus RNA-dependent RNA polymerase in complex with RNA for rational design of novel nucleotide inhibitors. *Sci Rep*, *8*(1), 11132.
- Segura Guerrero, N. A., Sharma, S., Neyts, J., & Kaptein, S. J. F. (2018). Favipiravir inhibits in vitro Usutu virus replication and delays disease progression in an infection model in mice. *Antiviral Res*, *160*, 137-142. doi:10.1016/j.antiviral.2018.10.026
- Sejvar, J. J. (2014). Clinical manifestations and outcomes of West Nile virus infection. *Viruses*, *6*(2), 606-623. doi:10.3390/v6020606
- Sejvar, J. J. (2016). West Nile Virus Infection. *Microbiol Spectr*, *4*(3). doi:10.1128/microbiolspec.EI10-0021-2016
- Sejvar, J. J., Haddad, M. B., Tierney, B. C., Campbell, G. L., Marfin, A. A., Van Gerpen, J. A., Petersen, L. R. (2003). Neurologic manifestations and outcome of West Nile virus infection. *JAMA*, *290*(4), 511-515. doi:10.1001/jama.290.4.511
- Selisko, B., Dutartre, H., Guillemot, J. C., Debarnot, C., Benarroch, D., Khromykh, A., Canard, B. (2006). Comparative mechanistic studies of de novo RNA synthesis by flavivirus RNA-dependent RNA polymerases. *Virology*, *351*(1), 145-158. doi:10.1016/j.virol.2006.03.026
- Selisko, B., Papageorgiou, N., Ferron, F., & Canard, B. (2018). Structural and Functional Basis of the Fidelity of Nucleotide Selection by Flavivirus RNA-Dependent RNA Polymerases. *Viruses*, *10*(2). doi:10.3390/v10020059
- Serafin, M. B., Bottega, A., Foletto, V. S., da Rosa, T. F., Hörner, A., & Hörner, R. (2020). Drug repositioning is an alternative for the treatment of coronavirus COVID-19. *Int J Antimicrob Agents*, *55*(6), 105969. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.105969
- Sevajol, M., Subissi, L., Decroly, E., Canard, B., & Imbert, I. (2014). Insights into RNA synthesis, capping, and proofreading mechanisms of SARS-coronavirus. *Virus Res*, *194*, 90-99. doi:10.1016/j.virusres.2014.10.008
- Shiryaev, S. A., Farhy, C., Pinto, A., Huang, C. T., Simonetti, N., Elong Ngono, A., Tersikh, A. V. (2017). Characterization of the Zika virus two-component NS2B-NS3 protease and structure-assisted identification of allosteric small-molecule antagonists. *Antiviral Res*, *143*, 218-229. doi:10.1016/j.antiviral.2017.04.015

- Sierra, M., Airaksinen, A., Gonzalez-Lopez, C., Agudo, R., Arias, A., & Domingo, E. (2007). Foot-and-mouth disease virus mutant with decreased sensitivity to ribavirin: implications for error catastrophe. *J Virol*, *81*(4), 2012-2024. doi:10.1128/jvi.01606-06
- Simmonds, Peter, Rico-Hesse, Rebecca, Avsic-Zupanc, Tatjana, Blitvich, Bradley, Bukh, Jens, Cao-Lormeau, Van-Mai, . . . da Costa Vasconcelos, Pedro Fernando. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *Journal of General Virology*, *98*, 2-3.
- Singh, A. K., Singh, A., Singh, R., & Misra, A. (2021). Molnupiravir in COVID-19: A systematic review of literature. *Diabetes Metab Syndr*, *15*(6), 102329. doi:10.1016/j.dsx.2021.102329
- Singh, J., Petter, R. C., Baillie, T. A., & Whitty, A. (2011). The resurgence of covalent drugs. *Nat Rev Drug Discov*, *10*(4), 307-317. doi:10.1038/nrd3410
- Singh, T. U., Parida, S., Lingaraju, M. C., Kesavan, M., Kumar, D., & Singh, R. K. (2020). Drug repurposing approach to fight COVID-19. *Pharmacol Rep*, *72*(6), 1479-1508. doi:10.1007/s43440-020-00155-6
- Sinigaglia, A., Peta, E., Riccetti, S., & Barzon, L. (2020). New avenues for therapeutic discovery against West Nile virus. *Expert Opin Drug Discov*, *15*(3), 333-348. doi:10.1080/17460441.2020.1714586
- Slusarczyk, M., Serpi, M., & Pertusati, F. (2018). Phosphoramidates and phosphonamidates (ProTides) with antiviral activity. *Antivir Chem Chemother*, *26*, 2040206618775243. doi:10.1177/2040206618775243
- Smith, H. L., Monath, T. P., Pazoles, P., Rothman, A. L., Casey, D. M., Terajima, M., Green, S. (2011). Development of antigen-specific memory CD8+ T cells following live-attenuated chimeric West Nile virus vaccination. *J Infect Dis*, *203*(4), 513-522. doi:10.1093/infdis/jiq074
- Smithburn, K. C., Hughes, T. P., Burke, A. W., & Paul, J. H. (1940). A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda. *The American Journal of Tropical Medicine*, *s1-20*(4), 471-492. doi:10.4269/ajtmh.1940.s1-20.471
- Sobrino, F., Dávila, M., Ortín, J., & Domingo, E. (1983). Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology*, *128*(2), 310-318. doi:10.1016/0042-6822(83)90258-1
- Song, B. H., Yun, S. I., Woolley, M., & Lee, Y. M. (2017). Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *J Neuroimmunol*, *308*, 50-64. doi:10.1016/j.jneuroim.2017.03.001
- Song, Y., Mugavero, J., Stauff, C. B., & Wimmer, E. (2019). Dengue and Zika Virus 5' Untranslated Regions Harbor Internal Ribosomal Entry Site Functions. *mBio*, *10*(2). doi:10.1128/mBio.00459-19

- Stapleton, J. T., Fong, S., Muerhoff, A. S., Bukh, J., & Simmonds, P. (2011). The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *J Gen Virol*, *92*(Pt 2), 233-246. doi:10.1099/vir.0.027490-0
- Stasi, C., Fallani, S., Voller, F., & Silvestri, C. (2020). Treatment for COVID-19: An overview. *Eur J Pharmacol*, *889*, 173644. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173644
- Steffens, S., Thiel, H. J., & Behrens, S. E. (1999). The RNA-dependent RNA polymerases of different members of the family Flaviviridae exhibit similar properties in vitro. *J Gen Virol*, *80* ( Pt 10), 2583-2590. doi:10.1099/0022-1317-80-10-2583
- Steitz, T. A. (1998). A mechanism for all polymerases. *Nature*, *391*(6664), 231-232. doi:10.1038/34542
- Stramer, S. L., Fang, C. T., Foster, G. A., Wagner, A. G., Brodsky, J. P., & Dodd, R. Y. (2005). West Nile virus among blood donors in the United States, 2003 and 2004. *N Engl J Med*, *353*(5), 451-459. doi:10.1056/NEJMoa044333
- Su, C. Y., Cheng, T. J., Lin, M. I., Wang, S. Y., Huang, W. I., Lin-Chu, S. Y., Wong, C. H. (2010). High-throughput identification of compounds targeting influenza RNA-dependent RNA polymerase activity. In *Proc Natl Acad Sci U S A* (Vol. 107, pp. 19151-19156). United States.
- Subissi, L., Posthuma, C. C., Collet, A., Zevenhoven-Dobbe, J. C., Gorbalenya, A. E., Decroly, E., Imbert, I. (2014). One severe acute respiratory syndrome coronavirus protein complex integrates processive RNA polymerase and exonuclease activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(37), E3900-3909. doi:10.1073/pnas.1323705111
- Suthar, M. S., Diamond, M. S., & Gale, M. (2013). West Nile virus infection and immunity. *Nat Rev Microbiol*, *11*(2), 115-128. doi:10.1038/nrmicro2950
- Suttle, C. A. (2005). Viruses in the sea. *Nature*, *437*(7057), 356-361. doi:10.1038/nature04160
- Sáez-Álvarez, Y., Jiménez de Oya, N., Del Águila, C., Saiz, J. C., Arias, A., Agudo, R., & Martín-Acebes, M. A. (2021). Novel non-nucleoside inhibitors of Zika virus polymerase identified through the screening of an open library of anti-kynetoplastid compounds. *Antimicrob Agents Chemother*, AAC0089421. doi:10.1128/AAC.00894-21
- Tarantino, D., Cannalire, R., Mastrangelo, E., Croci, R., Querat, G., Barreca, M. L., Milani, M. (2016). Targeting flavivirus RNA dependent RNA polymerase through a pyridobenzothiazole inhibitor. *Antiviral Res*, *134*, 226-235. doi:10.1016/j.antiviral.2016.09.007

- te Velthuis, A. J. (2014). Common and unique features of viral RNA-dependent polymerases. *Cell Mol Life Sci*, 71(22), 4403-4420. doi:10.1007/s00018-014-1695-z
- te Velthuis, A. J., Arnold, J. J., Cameron, C. E., van den Worm, S. H., & Snijder, E. J. (2010). The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent. *Nucleic Acids Res*, 38(1), 203-214. doi:10.1093/nar/gkp904
- Te Velthuis, A. J., Robb, N. C., Kapanidis, A. N., & Fodor, E. (2016). The role of the priming loop in influenza A virus RNA synthesis. *Nat Microbiol*, 1, 16029. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.29
- Te Velthuis, A. J. W., & Oymans, J. (2018). Initiation, Elongation, and Realignment during Influenza Virus mRNA Synthesis. *J Virol*, 92(3). doi:10.1128/JVI.01775-17
- Tilgner, M., & Shi, P. Y. (2004). Structure and function of the 3' terminal six nucleotides of the west nile virus genome in viral replication. *J Virol*, 78(15), 8159-8171. doi:10.1128/JVI.78.15.8159-8171.2004
- Tognarelli, J., Ulloa, S., Villagra, E., Lagos, J., Aguayo, C., Fasce, R., . Fernández, J. (2016). A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Arch Virol*, 161(3), 665-668. doi:10.1007/s00705-015-2695-5
- Tomei, L., Altamura, S., Bartholomew, L., Bisbocci, M., Bailey, C., Bosserman, M., Migliaccio, G. (2004). Characterization of the inhibition of hepatitis C virus RNA replication by nonnucleosides. *J Virol*, 78(2), 938-946. doi:10.1128/jvi.78.2.938-946.2004
- Tu, Y. F., Chien, C. S., Yarmishyn, A. A., Lin, Y. Y., Luo, Y. H., Lin, Y. T., Chiou, S. H. (2020). A Review of SARS-CoV-2 and the Ongoing Clinical Trials. *Int J Mol Sci*, 21(7). doi:10.3390/ijms21072657
- Ulbert, S. (2019). West Nile virus vaccines - current situation and future directions. *Hum Vaccin Immunother*, 15(10), 2337-2342. doi:10.1080/21645515.2019.1621149
- Ulbert, S., & Magnusson, S. E. (2014). Technologies for the development of West Nile virus vaccines. *Future Microbiol*, 9(10), 1221-1232. doi:10.2217/fmb.14.67
- Umareddy, I., Chao, A., Sampath, A., Gu, F., & Vasudevan, S. G. (2006). Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J Gen Virol*, 87(Pt 9), 2605-2614. doi:10.1099/vir.0.81844-0
- V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol*, 19(3), 155-170. doi:10.1038/s41579-020-00468-6
- Valdenassi, L., Franzini, M., Ricevuti, G., Rinaldi, L., Galoforo, A. C., & Tirelli, U. (2020). Potential mechanisms by which the oxygen-ozone (O2-O3) therapy could

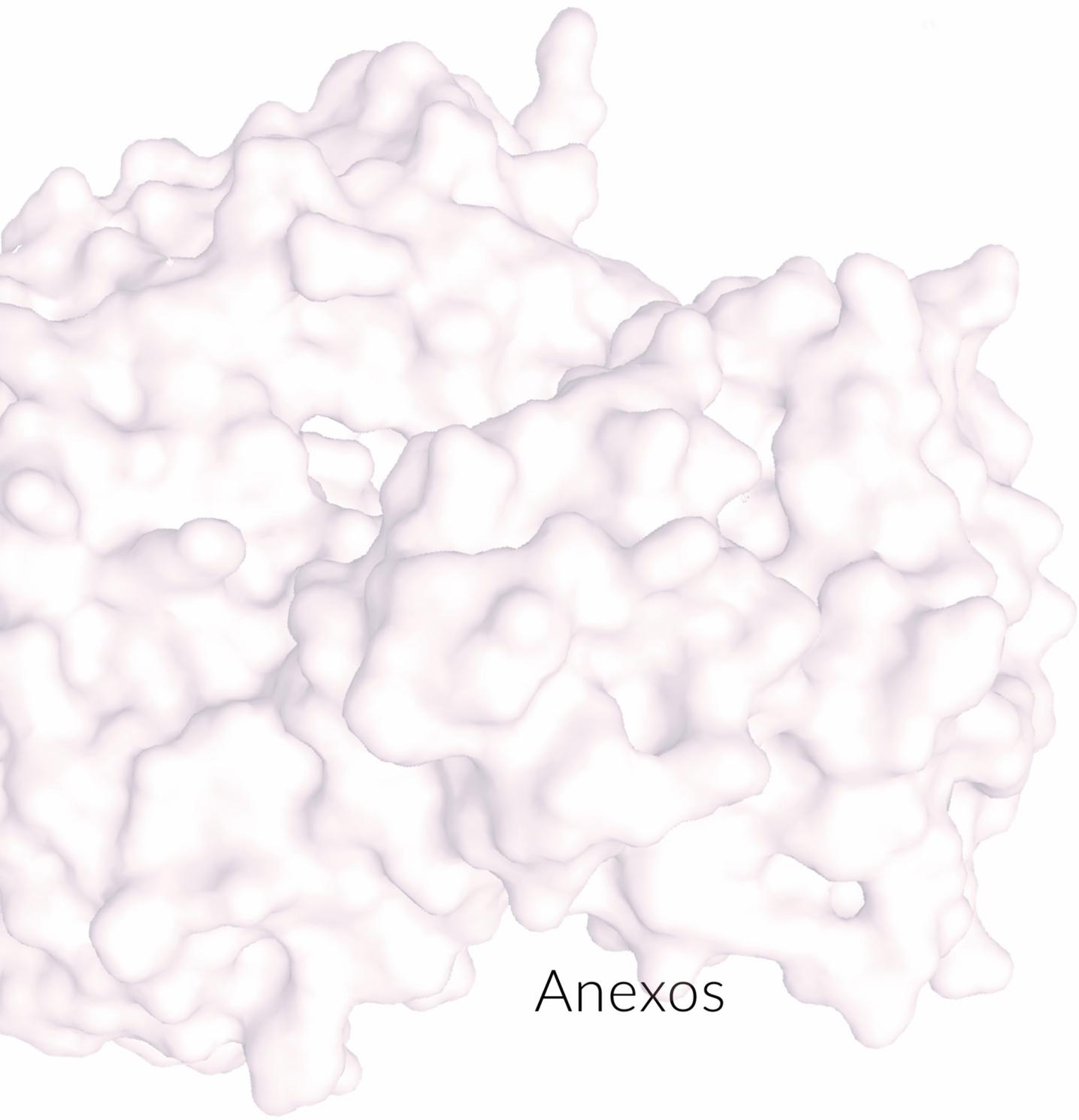
- contribute to the treatment against the coronavirus COVID-19. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 24(8), 4059-4061. doi:10.26355/eurrev\_202004\_20976
- van Dijk, A. A., Makeyev, E. V., & Bamford, D. H. (2004). Initiation of viral RNA-dependent RNA polymerization. *J Gen Virol*, 85(Pt 5), 1077-1093. doi:10.1099/vir.0.19731-0
- Venkataraman, S., Prasad, B. V. L.S, & Selvarajan, R. (2018). RNA Dependent RNA Polymerases: Insights from Structure, Function and Evolution. *Viruses*, 10(2). doi:10.3390/v10020076
- Verstrepen, B. E., Oostermeijer, H., Fagrouch, Z., van Heteren, M., Niphuis, H., Haaksma, T., Verschoor, E. J. (2014). Vaccine-induced protection of rhesus macaques against plasma viremia after intradermal infection with a European lineage 1 strain of West Nile virus. *PLoS One*, 9(11), e112568. doi:10.1371/journal.pone.0112568
- Vijgen, L., Keyaerts, E., Moës, E., Maes, P., Duson, G., & Van Ranst, M. (2005). Development of one-step, real-time, quantitative reverse transcriptase PCR assays for absolute quantitation of human coronaviruses OC43 and 229E. *J Clin Microbiol*, 43(11), 5452-5456. doi:10.1128/JCM.43.11.5452-5456.2005
- Vilas Boas, L. C. P., Campos, M. L., Berlanda, R. L. A., de Carvalho Neves, N., & Franco, O. L. (2019). Antiviral peptides as promising therapeutic drugs. *Cell Mol Life Sci*, 76(18), 3525-3542. doi:10.1007/s00018-019-03138-w
- Villamil-Gómez, W. E., Mendoza-Guete, A., Villalobos, E., González-Arismendy, E., Uribe-García, A. M., Castellanos, J. E., & Rodríguez-Morales, A. J. (2016). Diagnosis, management and follow-up of pregnant women with Zika virus infection: A preliminary report of the ZIKERNCOL cohort study on Sincelejo, Colombia. *Travel Med Infect Dis*, 14(2), 155-158. doi:10.1016/j.tmaid.2016.02.004
- von Brunn, A., Teepe, C., Simpson, J. C., Pepperkok, R., Friedel, C. C., Zimmer, R., Haas, J. (2007). Analysis of intraviral protein-protein interactions of the SARS coronavirus ORFeome. *PLoS One*, 2(5), e459. doi:10.1371/journal.pone.0000459
- Wang, B., Thurmond, S., Hai, R., & Song, J. (2018). Structure and function of Zika virus NS5 protein: perspectives for drug design. *Cell Mol Life Sci*, 75(10), 1723-1736. doi:10.1007/s00018-018-2751-x
- Wang, M. Y., Zhao, R., Gao, L. J., Gao, X. F., Wang, D. P., & Cao, J. M. (2020). SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol*, 10, 587269. doi:10.3389/fcimb.2020.587269
- Wang, Q., Weng, L., Tian, X., Counor, D., Sun, J., Mao, Y., Toyoda, T. (2012). Effect of the methyltransferase domain of Japanese encephalitis virus NS5 on the polymerase activity. *Biochim Biophys Acta*, 1819(5), 411-418. doi:10.1016/j.bbagr.2012.01.003

- Wargo, A. R., & Kurath, G. (2012). Viral fitness: definitions, measurement, and current insights. *Curr Opin Virol*, 2(5), 538-545. doi:10.1016/j.coviro.2012.07.007
- Watterson, D., Modhiran, N., & Young, P. R. (2016). The many faces of the flavivirus NS1 protein offer a multitude of options for inhibitor design. *Antiviral Res*, 130, 7-18. doi:10.1016/j.antiviral.2016.02.014
- Weaver, S. C., Costa, F., Garcia-Blanco, M. A., Ko, A. I., Ribeiro, G. S., Saade, G., Vasilakis, N. (2016). Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Res*, 130, 69-80. doi:10.1016/j.antiviral.2016.03.010
- Weaver, S. C., & Reisen, W. K. (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral Res*, 85(2), 328-345. doi:10.1016/j.antiviral.2009.10.008
- Wiemer, A. J., & Wiemer, D. F. (2015). Prodrugs of phosphonates and phosphates: crossing the membrane barrier. *Top Curr Chem*, 360, 115-160. doi:10.1007/128\_2014\_561
- Wikan, N., & Smith, D. R. (2016). Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. *Lancet Infect Dis*, 16(7), e119-e126. doi:10.1016/S1473-3099(16)30010-X
- Wilamowski, M., Hammel, M., Leite, W., Zhang, Q., Kim, Y., Weiss, K. L., Hura, G. L. (2021). Transient and stabilized complexes of Nsp7, Nsp8, and Nsp12 in SARS-CoV-2 replication. *Biophys J*. doi:10.1016/j.bpj.2021.06.006
- Winqvist, J., Abdurakhmanov, E., Baraznenok, V., Henderson, I., Vrang, L., & Danielson, U. H. (2013). Resolution of the interaction mechanisms and characteristics of non-nucleoside inhibitors of hepatitis C virus polymerase. *Antiviral Res*, 97(3), 356-368. doi:10.1016/j.antiviral.2012.12.027
- Winston, D. J., Vikram, H. R., Rabe, I. B., Dhillon, G., Mulligan, D., Hong, J. C., Team, West Nile Virus Transplant-Associated Transmission Investigation. (2014). Donor-derived West Nile virus infection in solid organ transplant recipients: report of four additional cases and review of clinical, diagnostic, and therapeutic features. *Transplantation*, 97(9), 881-889. doi:10.1097/TP.0000000000000024
- Wolf, Y. I., Kazlauskas, D., Iranzo, J., Lucía-Sanz, A., Kuhn, J. H., Krupovic, M., Koonin, E. V. (2018). Origins and Evolution of the Global RNA Virome. *mBio*, 9(6). doi:10.1128/mBio.02329-18
- Woods, C. W., Sanchez, A. M., Swamy, G. K., McClain, M. T., Harrington, L., Freeman, D., Walter, E. B. (2019). An observer blinded, randomized, placebo-controlled, phase I dose escalation trial to evaluate the safety and immunogenicity of an inactivated West Nile virus Vaccine, HydroVax-001, in healthy adults. *Vaccine*, 37(30), 4222-4230. doi:10.1016/j.vaccine.2018.12.026
- Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., Zhang, Y. Z. (2020). Author Correction: A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 580(7803), E7. doi:10.1038/s41586-020-2202-3

- Wu, J., Lu, G., Zhang, B., & Gong, P. (2015). Perturbation in the conserved methyltransferase-polymerase interface of flavivirus NS5 differentially affects polymerase initiation and elongation. *J Virol*, *89*(1), 249-261. doi:10.1128/JVI.02085-14
- Xiao, Kangpeng, Zhai, Junqiong, Feng, Yaoyu, Zhou, Niu, Zhang, Xu, Zou, Jie-Jian, Shen, Yongyi. (2020). Isolation and Characterization of 2019-nCoV-like Coronavirus from Malayan Pangolins. *bioRxiv*, 2020.2002.2017.951335. doi:10.1101/2020.02.17.951335
- Xu, H. T., Colby-Germinario, S. P., Hassounah, S. A., Fogarty, C., Osman, N., Palanisamy, N., Wainberg, M. A. (2017). Evaluation of Sofosbuvir ( $\beta$ -D-2'-deoxy-2'- $\alpha$ -fluoro-2'- $\beta$ -C-methyluridine) as an inhibitor of Dengue virus replication. *Sci Rep*, *7*(1), 6345. doi:10.1038/s41598-017-06612-2
- Xu, H. T., Hassounah, S. A., Colby-Germinario, S. P., Oliveira, M., Fogarty, C., Quan, Y., Wainberg, M. A. (2017). Purification of Zika virus RNA-dependent RNA polymerase and its use to identify small-molecule Zika inhibitors. In *J Antimicrob Chemother* (Vol. 72, pp. 727-734). England: The Author 2016. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com.
- Xu, Z., Shi, L., Wang, Y., Zhang, J., Huang, L., Zhang, C., Wang, F. S. (2020). Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med*, *8*(4), 420-422. doi:10.1016/S2213-2600(20)30076-X
- Yan, L., Zhang, Y., Ge, J., Zheng, L., Gao, Y., Wang, T., Lou, Z. (2020). Architecture of a SARS-CoV-2 mini replication and transcription complex. *Nat Commun*, *11*(1), 5874. doi:10.1038/s41467-020-19770-1
- Yang, S., Xu, M., Lee, E. M., Gorshkov, K., Shiryaev, S. A., He, S., Zheng, W. (2018). Emetine inhibits Zika and Ebola virus infections through two molecular mechanisms: inhibiting viral replication and decreasing viral entry. *Cell Discov*, *4*, 31. doi:10.1038/s41421-018-0034-1
- Yap, T. L., Xu, T., Chen, Y. L., Malet, H., Egloff, M. P., Canard, B., Lescar, J. (2007). Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution. *J Virol*, *81*(9), 4753-4765. doi:10.1128/JVI.02283-06
- Yi, Y., Lagniton, P. N. P., Ye, S., Li, E., & Xu, R. H. (2020). COVID-19: what has been learned and to be learned about the novel coronavirus disease. *Int J Biol Sci*, *16*(10), 1753-1766. doi:10.7150/ijbs.45134
- Yin, W., Mao, C., Luan, X., Shen, D. D., Shen, Q., Su, H., Xu, H. E. (2020). Structural basis for inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 by remdesivir. *Science*, *368*(6498), 1499-1504. doi:10.1126/science.abc1560

- Yoshimoto, F. K. (2021). A Biochemical Perspective of the Nonstructural Proteins (NSPs) and the Spike Protein of SARS CoV-2. *Protein J*, 40(3), 260-295. doi:10.1007/s10930-021-09967-8
- Yu, F., Lu, L., Du, L., Zhu, X., Debnath, A. K., & Jiang, S. (2013). Approaches for identification of HIV-1 entry inhibitors targeting gp41 pocket. *Viruses*, 5(1), 127-149. doi:10.3390/v5010127
- Yuki, K., Fujiogi, M., & Koutsogiannaki, S. (2020). COVID-19 pathophysiology: A review. *Clin Immunol*, 215, 108427. doi:10.1016/j.clim.2020.108427
- Yun, K. W., Lee, H. J., Kang, J. H., Eun, B. W., Kim, Y. J., Kim, K. H., Cha, S. H. (2015). Safety and immunogenicity of a freeze-dried, Vero cell culture-derived, inactivated Japanese encephalitis vaccine (KD-287, ENCEVAC®) versus a mouse brain-derived inactivated Japanese encephalitis vaccine in children: a phase III, multicenter, double-blinded, randomized trial. *BMC Infect Dis*, 15, 7. doi:10.1186/s12879-014-0744-4
- Zeng, J., Weissmann, F., Bertolin, A. P., Posse, V., Canal, B., Ulferts, R., Diffley, J. F. X. (2021). Identifying SARS-CoV-2 antiviral compounds by screening for small molecule inhibitors of nsp13 helicase. *Biochem J*, 478(13), 2405-2423. doi:10.1042/BCJ20210201
- Zhang, J. H., Chung, T. D., & Oldenburg, K. R. (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen*, 4(2), 67-73. doi:10.1177/108705719900400206
- Zhang, Y., Banga Ndzouboukou, J. L., Gan, M., Lin, X., & Fan, X. (2021). Immune Evasive Effects of SARS-CoV-2 Variants to COVID-19 Emergency Used Vaccines. *Front Immunol*, 12, 771242. doi:10.3389/fimmu.2021.771242
- Zhao, H., Fernandez, E., Dowd, K. A., Speer, S. D., Platt, D. J., Gorman, M. J., Fremont, D. H. (2016). Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection. *Cell*, 166(4), 1016-1027. doi:10.1016/j.cell.2016.07.020
- Zhong, W., Ferrari, E., Lesburg, C. A., Maag, D., Ghosh, S. K., Cameron, C. E., Hong, Z. (2000). Template/primer requirements and single nucleotide incorporation by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase. *J Virol*, 74(19), 9134-9143. doi:10.1128/jvi.74.19.9134-9143.2000
- Zhong, W., Gutshall, L. L., & Del Vecchio, A. M. (1998). Identification and characterization of an RNA-dependent RNA polymerase activity within the nonstructural protein 5B region of bovine viral diarrhea virus. *J Virol*, 72(11), 9365-9369. doi:10.1128/JVI.72.11.9365-9369.1998
- Zhong, W., Uss, A. S., Ferrari, E., Lau, J. Y., & Hong, Z. (2000). De novo initiation of RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase. *J Virol*, 74(4), 2017-2022. doi:10.1128/jvi.74.4.2017-2022.2000

- Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270-273. doi:10.1038/s41586-020-2012-7
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Team, China Novel Coronavirus Investigating and Research. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*, 382(8), 727-733. doi:10.1056/NEJMoa2001017
- Ziebuhr, J. (2005). The coronavirus replicase. *Curr Top Microbiol Immunol*, 287, 57-94. doi:10.1007/3-540-26765-4\_3
- Zou, X., Chen, K., Zou, J., Han, P., Hao, J., & Han, Z. (2020). Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front Med*, 14(2), 185-192. doi:10.1007/s11684-020-0754-0
- Černý, J., Černá Bolfíková, B., Valdés, J. J., Grubhoffer, L., & Růžek, D. (2014). Evolution of tertiary structure of viral RNA dependent polymerases. *PLoS One*, 9(5), e96070. doi:10.1371/journal.pone.0096070



Anexos