



"ENFERMEDADES EMERGENTES. ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS FRENTE A FLAVIVIRUS"

María Bohórquez Cota

UNIVERSIDAD DE SEVILLA, FACULTAD DE FARMACIA





UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA

ENFERMEDADES EMERGENTES. ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS FRENTE A FLAVIVIRUS

MARÍA BOHÓRQUEZ COTA

SEVILLA, 9 DE JULIO DE 2020

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y FARMACÉUTICA

Tutora: MARGARITA VEGA HOLM

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

RESUMEN

Flaviviridae se trata de una familia de virus entre la que se encuentra el género *Flavivirus*. Este género cuenta con especies de ARN de polaridad positiva, cuyo genoma codifica para una poliproteína que una vez escindida da lugar a proteínas estructurales y no estructurales cuyas funciones se explican en esta revisión. Este género resulta interesante de estudiar e investigar ya que en la última década, las especies que lo componen han sido las responsables de causar numerosas enfermedades emergentes en todo el mundo, sobre todo en áreas subtropicales. En esta revisión bibliográfica se muestra la actualidad en cuanto a las vacunas comercializadas y aquellas que se encuentran en ensayos clínicos frente a ZIKV, DENV, TBEV, WNV, JFV y YFV. Hoy en día, para el ZIKV no existe ninguna vacuna comercializada, pero sí que existen frente a DENV, YFV, JFV y TBEV aunque algunas con limitación a la hora de su administración por lo que hay que seguir investigando para conseguir vacunas efectivas frente a todas las especies de este género, aunque resulta una tarea complicada debido a la similitud genómica entre todas ellas.

El objetivo principal de esta revisión es encontrar evidencias científicas sobre tratamiento antiviral y vacunas para conseguir paralizar las epidemias causadas por estos virus y evitar unas posibles futuras epidemias.

Para realizar la revisión se ha hecho uso de diferentes bases de datos tales como: PubMed, Scifinder, Scopus y Google Scholar.

En cuanto al tratamiento, no existe tratamiento antiviral que combata la infección de algunas de estas especies, aunque lo que se está utilizando recientemente es una estrategia denominada reposicionamiento de fármacos, en la que se utilizan fármacos ya comercializados ahorrando tiempo y dinero. En el apartado de Resultados y Discusión se explican algunos de estos fármacos aprobados por la FDA.

Palabras clave: Flavivirus, poliproteína, tratamiento antiviral, vacunas, reposicionamiento.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADE - Antibody Dependent Enhancement (mejora dependiente de anticuerpos)

ARN - Ácido ribonucleico

ATPasa - Adenosin trifosfatasa

C - Proteína de la cápside

CHIKV - Virus chikungunya

DENV - Dengue virus (Virus del Dengue)

DENV-1 - Serotipo 1 del virus del Dengue

DENV-2 - Serotipo 2 del virus del Dengue

DENV-3 - Serotipo 3 del virus del Dengue

DENV-4 - Serotipo 4 del virus del Dengue

E - Proteína de envoltura

EGCG - Galato de epigallocatequina

FDA - Food and Drug Administration (Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos)

HMG-CoA - 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA

ICTV - Comité Internacional de Taxonomía de Virus

IFN - Interferón

JEV - Japanese Encephalitis virus (Virus de la encefalitis japonesa)

M - Proteína de membrana

Mscbs - Ministerio de sanidad, consumo y bienestar social.

NCR - Región no codificante

NI - Inhibidores de nucleósidos

NMDAR - Receptor N-metil-D-aspartato

NNI - Inhibidores de no nucleósidos

NS- Non Estructural (no estructural)

NS1 - Proteína no estructural 1

NS2 - Proteína no estructural 2

NS3 - Proteína no estructural 3

NS4 - Proteína no estructural 4

NS5 - Proteína no estructural 5

NTP - Nucleótido trifosfato

OMS - Organización Mundial de la Salud

OPS - Organización Panamericana de la Salud

prM - Proteína precursora de membrana

RdRp - RNA polymerase dependent of RNA (ARN polimerasa dependiente de ARN)

RE - Retículo endoplasmático

SAM - S-adenosilmetiltransferasa

SVP - Partículas subvirales

TBEV - Virus de la Encefalitis transmitido por garrapatas

VHC - Virus de la Hepatitis C

VIH-1 - Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1

WNV - West Nile Virus (Virus del Nilo Occidental)

YFV - Yellow Fever Virus (Virus de la Fiebre Amarilla)

ZIKV - Zika virus (Virus del Zika)

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Enfermedades emergentes.....	8
1.1.1. <i>Virus del Dengue</i>	10
1.1.2. <i>Virus de la Fiebre Amarilla</i>	11
1.1.3. <i>Virus del Zika</i>	11
1.1.4. <i>Virus del Nilo Occidental</i>	12
1.2. Importancia del desarrollo de antivirales y vacunas.....	13
2. OBJETIVOS	14
3. METODOLOGÍA	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
4.1. Generalidades <i>Flavivirus</i>	16
4.1.1. <i>Ciclo de replicación</i>	16
4.1.2. <i>Genoma y proteínas</i>	17
4.2. Vacunación frente a <i>Flavivirus</i>	21
4.2.1. Actualidad sobre la vacunación frente al DENV.....	21
4.2.2. Actualidad sobre la vacunación frente al ZIKV.....	23
4.3. Tratamiento antiviral.....	24
4.3.1. NS5 como diana terapéutica.....	26
4.3.2. NS3 como diana terapéutica.....	30
4.3.3. Proteína E como diana terapéutica.....	31
4.3.4. Otras dianas terapéuticas.....	32
4.3.5. Estudio de plantas medicinales con actividad antiviral.....	33

5. CONCLUSIONES.....	34
6. BIBLIOGRAFÍA.....	35

1. INTRODUCCION

1.1. Enfermedades emergentes

Las enfermedades virales emergentes son aquellas infecciones virales que aparecen como nuevas en una determinada población. Además existe otro término que es el de las enfermedades virales re-emergentes que son aquellas infecciones virales no nuevas que ya existían pero que recientemente han aumentado su incidencia o se han extendido a otras áreas geográficas en las que no eran usuales.

Una gran parte de las enfermedades emergentes y re-emergentes son transmitidas a través de animales, lo que se conoce como zoonosis. Los virus transmitidos por mosquitos son un importante problema de salud pública en muchos países tropicales y subtropicales, y algunos de los patógenos humanos más importantes pertenecen al género *Flavivirus* (Hitakarun *et al.*, 2020).

Los principales causantes de estas enfermedades son los virus de ácido ribonucleico (ARN) debido a que se replican con mucha rapidez y a que presentan alta capacidad de mutación ya que la actividad ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) que se encuentra en la proteína no estructural 5 (NS5) no puede leer después de completar el ciclo de replicación lo que conlleva a altas tasas de mutación y lo que provoca la limitación del número de nucleótidos. La alta tasa de mutación conduce a una diversidad significativa, así como a la posibilidad de la aparición repentina de variantes con potencial patogénico mejorado (Hitakarun *et al.*, 2020).

Algunos factores que pueden afectar al desarrollo de enfermedades emergentes y re-emergentes son aquellos relacionados con la población y con el medio ambiente; así como la sanidad y la globalización. Otras de las razones por las cuales se han producido expansiones a nivel mundial de ciertos virus son: urbanizaciones masivas, aumento en la frecuencia de viajes internacionales, el comercio mundial y la falta de medidas efectivas contra mosquitos y garrapatas, que son generalmente los vectores que transmiten dichas enfermedades (Khetarpal, Khanna, 2016).

La incidencia de arbovirus, que son aquellos virus transmitidos por artrópodos, ha estado en aumento durante los últimos años por casi todas las regiones del mundo, pero no existen tratamientos específicos para la mayoría de estas enfermedades (Garg *et al.*, 2020). Al no existir tratamientos específicos, se tratan de tomar medidas de control de los vectores aunque debido a la resistencia a los insecticidas y como dependen del cumplimiento humano y de los recursos disponibles, éstas han resultado ser poco efectivas (Diosa-Toro *et al.*, 2020).

Los agentes más comunes que están causando estas enfermedades en las últimas décadas están siendo los pertenecientes al género ya mencionado anteriormente, *Flavivirus* (Norman *et al.*; 2020) y es por ello por lo que se ha elegido este género de virus para realizar la revisión bibliográfica.

Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), dentro de la familia *Flaviviridae* se encuentran los siguientes cuatro géneros: *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* y *Pestivirus* (Chen *et al.*, 2017). (Figura 1).

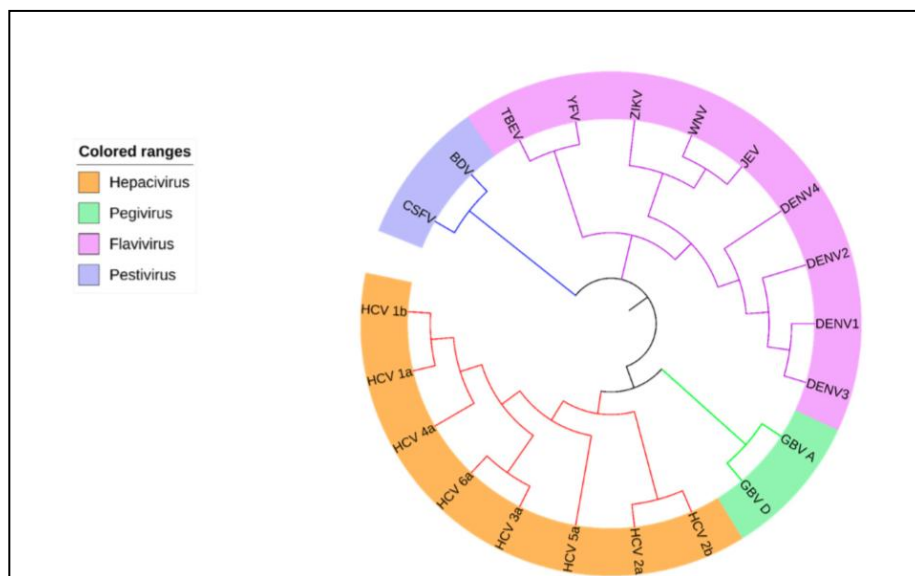


Figura 1. Géneros y especies que se encuentran dentro de la familia Flaviviridae según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) (Chen *et al.*, 2017).

El género *Flavivirus* se clasifica dentro del grupo IV en el sistema de clasificación de Baltimore (Hitakarun *et al.*, 2020), ya que posee un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva envuelto de 9500-12500 nucleótidos. Cuenta con más de 53 especies entre las que se encuentran: Virus del Dengue (DENV), Virus del Zika (ZIKV), Virus del Nilo occidental (WNV), Virus de la encefalitis japonesa (JEV), Virus de la Encefalitis transmitido por garrapatas (TBEV) y Virus de la Fiebre Amarilla (YFV) (García *et al.*, 2017).

Los virus que se transmiten por vectores artrópodos se denominan arbovirus, por lo que los flavivirus serían arbovirus, ya que se transmiten en su gran mayoría por mosquitos. En cuanto a su importancia médica, dentro de este género destacan: DENV (Virus del Dengue), YFV (Virus de la fiebre amarilla), ZIKV (Virus del Zika) y WNV (Virus del Nilo Occidental).

1.1.1. *Virus del Dengue*

El Dengue es una enfermedad vírica transmitida por mosquitos hembra del género *Aedes*, principalmente la especie *Aedes aegypti*. Tiene un periodo de incubación de 4 a 10 días. Se ha expandido en los últimos años con mucha rapidez por casi todas las regiones del mundo. Su expansión se asocia a los factores que favorezcan el crecimiento del mosquito. Se considera la fiebre hemorrágica más distribuida a nivel mundial. Más de un tercio de la población mundial se encuentra en áreas de riesgo de infección por DENV (Chen *et al.*, 2017). Según una estimación reciente de la Organización Mundial de la Salud (OMS) alrededor de 400 millones de infecciones por Dengue se notifican en el mundo cada año. Presenta 4 serotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. Una primera infección por DENV suele ser leve y se cree que genera inmunidad homotípica de por vida e inmunidad heterotípica temporal; es decir, cuando una persona se infecta por un solo serotipo, desarrolla anticuerpos e inmunidad para siempre frente a ese serotipo en concreto, pero no frente a los demás, solo de manera temporal (Bell *et al.*, 2019). Una posterior infección por otro serotipo podría aumentar la gravedad de los síntomas llevando a complicaciones graves del Dengue hemorrágico. Al igual que aumentar la gravedad de dichos síntomas, la inmunidad frente a cualquiera de los cuatro serotipos del Dengue aumenta el daño en embarazadas de la infección por el Virus del Zika (Brown *et al.*, 2019).

El desarrollo de un antiviral o de una vacuna en este caso es complicado debido a la presencia de los 4 serotipos. Una vacunación efectiva contra el dengue para personas que vayan a viajar a zonas endémicas podría brindar protección a los viajeros y, por lo tanto, reducir el riesgo de transmisión autóctona (Redondo-Bravo *et al.*, 2019). Recientemente se ha aprobado una vacuna tetravalente para Dengue, aunque su uso es limitado (Garg *et al.*, 2020). Los síntomas generales del dengue son: fiebre elevada (40°C), dolor intenso de cabeza, dolores musculares, náuseas, vómitos y erupción maculopapular. Dependiendo de la edad del paciente, van a variar las manifestaciones clínicas. Los niños pequeños suelen presentar fiebre y erupción maculopapular, mientras que en los adultos la fiebre generalmente es más alta y presentan además dolor de cabeza, músculos, articulaciones, vómitos y petequias (Khetarpal, Khanna, 2016). Dichos síntomas duran entre 2 y 7 días y pueden confundirse con los de otras infecciones provocadas por otras especies de flavivirus. Existe una complicación potencialmente mortal que es el "dengue hemorrágico o dengue grave" que cursa con hemorragias, dificultad respiratoria y fallo multiorgánico. Se ha demostrado en un estudio muy reciente realizado por Lee *et al.*, que los pacientes con Diabetes Mellitus 2 presentan mayor riesgo de desarrollar dengue hemorrágico; lo que puede resultar importante a tener en cuenta

en zonas endémicas (Lee *et al.*, 2020). Hay que observar los signos que pueden resultar alarmantes entre los 3 y 7 días después de la infección como un descenso de la temperatura corporal, dolor abdominal intenso, y sangre en el vómito; entre otros. Estos síntomas son los que diferencian esta enfermedad de la provocada por el virus del Zika, ya que los síntomas leves son muy parecidos.

1.1.2. *Virus de la fiebre amarilla*

Se trata de una infección viral transmitida por mosquitos que produce alteraciones en riñones e hígado (OMS, 2019). Se transmite por las especies de mosquitos *Aedes* y *Haemagogus* (Rollins *et al.*, 2017). Su reservorio natural son los primates y puede pasar al hombre por la picadura del mosquito. Un reciente brote en África causó aproximadamente 600 muertes (Gwon *et al.*, 2020). Sus manifestaciones clínicas se podrían separar en 3 etapas: periodo de infección (3-4 días), periodo de remisión (1-2 días) y periodo de intoxicación. Durante el primer periodo los síntomas son leves: dolor de cabeza y extremidades, náuseas, vómitos, mareo... Durante la siguiente etapa en la mayoría de las personas infectadas los síntomas remiten, aunque aproximadamente un 15% entra en la tercera etapa, donde los síntomas sí que son más graves, entre los que se encuentran: ictericia, oliguria, diátesis hemorrágica y postración (Rollins *et al.*, 2017). Actualmente existe una vacuna viva atenuada para este virus (Shan *et al.*, 2016), que se encuentra contraindicada en pacientes inmunodeprimidos (Burkhard *et al.*, 2020).

1.1.3. *Virus del Zika*

El virus del Zika se aisló por primera vez en 1947 en el bosque de Zika (Uganda, África) y no fue hasta 2007 cuando se produjo una gran epidemia en una isla de Micronesia, donde más del 75% de la población resultó infectada (Shan *et al.*, 2016). A partir de ese año y hasta la fecha, se han seguido describiendo casos en diversos países y territorios de América (OMS, 2020). Durante los años 2013 y 2014 se extendió por la Polinesia Francesa y otras zonas del Pacífico Sur. Un año más tarde (en 2015) llegó a América causando alrededor de 1.5 millones de casos en Brasil (Organización Panamericana de la Salud, OPS). Hubo un gran aumento de casos de microcefalia de 2014 a 2015 en América, que coincide con la llegada del virus a esta zona, por lo que se ha visto que guarda relación con este virus (Shan *et al.*, 2016). La Organización Mundial de la Salud declaró a finales de 2016 el virus del Zika como emergencia de salud pública por su elevada teratogenicidad y su capacidad de expansión (Zou, Shi, 2019). La fiebre del Zika es una enfermedad viral transmitida por mosquitos del género *Aedes* infectados por el virus Zika (ZIKV). La sintomatología que presenta suele ser leve: erupción máculopapular

difusa, dolor de cabeza y/o articulaciones, dolor muscular, astenia, dolor retroorbital y conjuntivitis (Maslow *et al.*, 2019). La mayoría de las personas infectadas son asintomáticas (80%) pero las que si presentan síntomas, éstos pueden durar entre dos y siete días aproximadamente; sin embargo, pueden surgir complicaciones neurológicas graves como el síndrome de Guillain-Barré (donde el propio sistema inmune ataca al sistema nervioso) y el síndrome congénito de Zika (Tan *et al.*, 2020). El síndrome de Guillain-Barré es una polirradiculopatía aguda autoinmune que afecta a nervios periféricos y raíces nerviosas de la médula espinal (Del Carpio *et al.*, 2020). Se ha demostrado recientemente la presencia del virus en el líquido amniótico, lo que relaciona este virus con casos de microcefalia en fetos en un brote en Brasil (Carneiro *et al.*, 2016). Hasta la fecha no se ha obtenido ninguna vacuna para frenar este virus, aunque es cierto que se está investigando sobre vacunas dirigidas a múltiples arbovirus. Tanto las que están en investigación como las que ya existen para estos virus son en su mayoría de tipo vivas y atenuadas, lo que impide la vacunación a personas inmunodeprimidas y a embarazadas, que en el caso del virus del Zika la población objetivo sería en gran medida las mujeres embarazadas (Garg *et al.*, 2020).

1.1.4. *Virus del Nilo Occidental*

El virus del Nilo occidental fue aislado por primera vez en 1937 en el distrito del Nilo Occidental (Uganda) y desde entonces se han descrito graves epidemias en Estados Unidos, Grecia, Israel, Rumanía y Rusia. Existen varios linajes de este virus, y algunos son capaces de causar enfermedad en humanos que son el linaje 1 (Europa, África, India, Australia y América), el subtipo 1a (del Mediterráneo) y el linaje 2 (África subsahariana, Madagascar y Europa Central) (Mscbs, 2017). Causa una enfermedad del sistema nervioso llamada encefalitis del Nilo Occidental, que puede llegar a ser mortal, y se considera la principal causa de encefalitis por arbovirus en las Américas. Esta especie normalmente circula entre aves y mosquitos (Kampen *et al.*, 2020) y se puede transmitir a humanos y a caballos mediante artrópodos, en este caso, mosquitos, principalmente del género *Culex*. Aún no existen vacunas o terapias para tratar y/o prevenir esta enfermedad en humanos, aunque sí que han sido desarrolladas para caballos (Kobayashi *et al.*, 2020). Al igual que en casi el resto de las especies de esta familia, la mayoría de las personas infectadas resultan ser asintomáticas (80% aproximadamente). El periodo de incubación es de 3 a 14 días. Los humanos infectados que sí presentan síntomas pueden desarrollar la fiebre del Nilo occidental o la enfermedad neuroinvasiva del Nilo occidental (Kampen *et al.*, 2020). Cuando sí hay síntomas y son leves, éstos suelen ser: fiebre, dolor de cabeza y corporal, náuseas y vómitos, exantema y cansancio. Puede ser que se compliquen los síntomas y que se dé lugar a una enfermedad neuroinvasiva que solo se da en

menos del 1% de los casos, presentada como encefalitis, meningitis o parálisis flácida aguda (Christova *et al.*, 2020).

1.2. Importancia del desarrollo de antivirales y vacunas

La aparición de epidemias mortales de forma repetida durante los últimos años, hace que aparezca la necesidad de actuar contra los virus causantes de estas enfermedades desarrollando tanto vacunas para profilaxis como antivirales para el tratamiento (Girard *et al.*, 2020). Se ha informado de la propagación de muchas especies del género *Flavivirus*, lo que representa una amenaza emergente para la salud animal y humana (García-Bocanegra *et al.*, 2016). Es urgente y necesario un control sobre este tipo de patógenos (Girard *et al.*, 2020).

No existen tratamientos específicos ni vacunas para todas las especies de este género causantes de enfermedades en humanos. Actualmente existen vacunas sólo para 4 de ellas: YFV (vacuna viva atenuada), TBEV (vacuna inactiva) JEV (vacuna inactiva y vivo atenuada), DENV (recombinante). Como no hay vacunas para todos los virus, y como algunas de las que hay presentan uso limitado, ha aumentado la prevalencia de muchos de ellos. Algunos ejemplos son: aumento de casos de DENV en zonas tropicales y subtropicales del mundo, aparición del Virus del Nilo Occidental en el norte de América, propagación del Virus de la encefalitis japonesa en una gran parte de Asia y Oceanía y una reciente epidemia de ZIKV (OMS, 2020).

Las campañas de vacunación en estos meses debido a la pandemia "Covid-19" están siendo paralizadas en muchos países en las que son necesarias. Alrededor de 13,5 millones de personas han dejado de ponerse vacunas, entre las que se encuentra la vacuna contra el virus de la fiebre amarilla. Esto supone un grave problema, ya que el número de contagiados y el impacto que tendrá a nivel mundial será mucho mayor si no se reanudan pronto las campañas de vacunación (Roberts, 2020).

A su vez, resulta también importante el diagnóstico de estas enfermedades, para conocer el número más próximo al exacto de contagios y poder controlar y/o prevenir de alguna forma un brote epidémico, o lo que es peor, una epidemia o pandemia. Es por ello que se recomienda realizar diagnósticos. De manera general, existen dos tipos de diagnóstico: uno que detecta si la persona ha desarrollado anticuerpos frente a ese patógeno, es decir; si ha pasado la enfermedad y es inmune frente a ella. Y otro que detecta partes del virus (como la PCR que en este caso identificaría fragmentos de ARN viral). Este último resulta importante de realizar, sobretodo en zonas endémicas para casos en los que se va a proceder a realizar

donaciones de sangre y/o trasplantes (Shan et al., 2016). Además existen otros ensayos de diagnóstico como inmunoensayos para detectar antígenos, método ELISA, ensayo de neutralización de virus... (Girard et al., 2020).

Llevando el tema a la actualidad, resulta interesante conocer lo siguiente. Los síntomas de la enfermedad causada por DENV y COVID-19 son muy similares, por lo que el diagnóstico es complicado, sobre todo en zonas endémicas de DENV. A su vez, también pueden ser confundidos a la hora de realizar test serológico. De hecho, se han notificado dos falsos positivos de DENV en pacientes que resultaron ser positivos en COVID-19 después de hacer una prueba de hisopo nasofaríngeo (Yan et al., 2020). Esto ocurrió en Singapur (Yan et al., 2020). En Tailandia se ha notificado un caso de co-infección de Dengue y COVID-19 (Wu et al., 2020). Tanto en 2019 como en 2020, han aumentado notablemente los casos diagnosticados de Dengue en países como Ecuador. La llegada a América del Sur de la pandemia ocasionada por el virus COVID-19 ha supuesto una complicación tanto para el diagnóstico como para el control de ambas epidemias, ya que generalmente se trata de una zona con pocos recursos y su sistema de salud podría verse afectado (Navarro et al., 2020). El principal problema es que comparten características clínicas, además de que pueden notificarse falsos positivos, y esto sugiere que deben realizarse urgentemente test fiables para ambos virus, ya que la no identificación de personas infectadas por COVID-19 podría provocar unas consecuencias graves, como la propagación del virus (Navarro et al., 2020). Se recomienda, que como en zonas endémicas fallan los test rápidos y pueden dificultar el diagnóstico utilizar una prueba sensible y accesible como es la PCR (Wu et al., 2020).

2. OBJETIVOS

1. Describir la importancia de las enfermedades emergentes en la actualidad y la urgencia que supone el desarrollo de medidas preventivas y/o tratamiento.
2. Analizar las características estructurales de diversos virus pertenecientes al género *Flavivirus*, así como su ciclo de reproducción y genoma.
3. Realizar un estudio cronológico acerca de las diferentes vacunas que han sido desarrolladas a lo largo de la última década como profilaxis del Virus del Dengue y el Virus del Zika.
4. Detallar el reposicionamiento de fármacos utilizado frente a patologías causadas por virus del mismo género y los avances que se han logrado.

3. METODOLOGÍA

Se ha realizado una revisión bibliográfica sobre el género *Flavivirus* y los virus que pertenecen a él, así como sobre las enfermedades emergentes y re-emergentes relacionadas con ellos de importancia actual en salud pública.

La búsqueda de estos artículos se llevó a cabo mediante la utilización de diferentes bases de datos de tipo médicas y químicas como son: Scopus, Web of Science, Scifinder, PubMed y Science Direct. Se ha hecho uso de la Biblioteca virtual de la Universidad de Sevilla (BIBUS), y también de la herramienta Google Scholar (Google académico). Las palabras clave en inglés utilizadas en las bases de datos antes mencionadas fueron las siguientes: 'flaviviruses', 'arboviruses', 'emergent', 'Zika virus', 'Dengue virus', 'Yellow Fever virus', 'West Nile Virus', 'ZIKV', 'DENV', 'NS2B-NS3', 'NS3', 'NS5', 'inhibit', 'protease inhibitors', 'target', 'drug', 'drug development', 'drug target', 'vaccine', 'vaccine development', 'treatment', 'antiviral', 'dengue serotype', 'dengue treatments', 'antidengue drugs', 'review anti dengue', 'Antibody dengue' y 'screening flavivirus'. En todas las bases de datos se han utilizado los marcadores booleanos AND, OR y AND NOT y combinar los términos nombrados y de este modo refinar más los resultados y encontrar los artículos oportunos para cada uno de los apartados.

Se han tenido en cuenta criterios de inclusión y criterios de exclusión a la hora de realizar la búsqueda. Los criterios de inclusión utilizados fueron: publicaciones en idioma inglés o español, publicaciones posteriores a 2016 (si bien es cierto que se incluyeron algunos estudios anteriores a ese año que han sido considerados fundamentales) y publicaciones de acceso abierto ('free full text'). Por el contrario, se excluyeron aquellas publicaciones en idioma diferente al español o inglés y la información presente en otros trabajos de fin de grado o máster. También resultaron de utilidad documentos elaborados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y por la Organización Panamericana de la Salud (OPS). Para buscar información acerca de algunos fármacos que se nombran en los resultados se ha utilizado la página web de Vademécum y la página web de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS).

Por último también se han consultado dos libros cuyos títulos son: "Viral Polymerases. Structures, Functions and Roles as Antiviral Drug Targets" y "Recent Advances in the Discovery of Dengue Virus Inhibitors". Para realizar las estructuras químicas de los compuestos en el apartado "Resultados y discusión" se ha utilizado un programa informático denominado ChemDraw especializado en química orgánica

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Generalidades *Flavivirus*

4.1.1. *Ciclo de replicación*

Cuando se produce la infección, la proteína de la envoltura (proteína E) se une a los receptores de las células hospedadoras y permiten que el virus penetre por endocitosis. El hecho de que en los endosomas se encuentre acidificado el medio es lo que va a permitir que la fusión se realice correctamente (Chen *et al.*, 2017), ya que induce cambios conformacionales en la proteína E (Diosa-Toro *et al.*, 2020). Como se puede observar en la Figura 2, se libera el ARN viral en el citoplasma de la célula infectada (Tan *et al.*, 2020) y posteriormente dicho ARN se transporta al retículo endoplasmático (RE) donde tiene lugar la traducción (Diosa-Toro *et al.*, 2020). Se traduce como un único marco de lectura abierto que resulta ser precursor de una cadena polipeptídica (Patil *et al.*, 2019). Esa cadena abarca todas las proteínas virales: [C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5].

La traducción y el procesamiento de dicha poliproteína unida al retículo endoplasmático genera tres proteínas estructurales (C, prM/M y E) y siete proteínas no estructurales (NS): NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Diosa-Toro *et al.*, 2020). Las proteínas no estructurales participan en la replicación del ARN y en el ensamblaje del virión, que ocurre en las invaginaciones del RE. Una vez que se replica, el ARN viral se empaqueta junto con la proteína C y posteriormente se envuelve en una bicapa lipídica derivada de la célula hospedadora (Hitakarun *et al.*, 2020). La partícula viral inmadura que contiene proteína E y prM sale a la luz del RE y se transporta por el aparato de Golgi, donde se producen cambios conformacionales en E y prM, que provoca la escisión de prM gracias a la acción de la proteasa furina librándose así la proteína M. Una vez madura la partícula viral sale al medio extracelular (Diosa-Toro *et al.*, 2020).

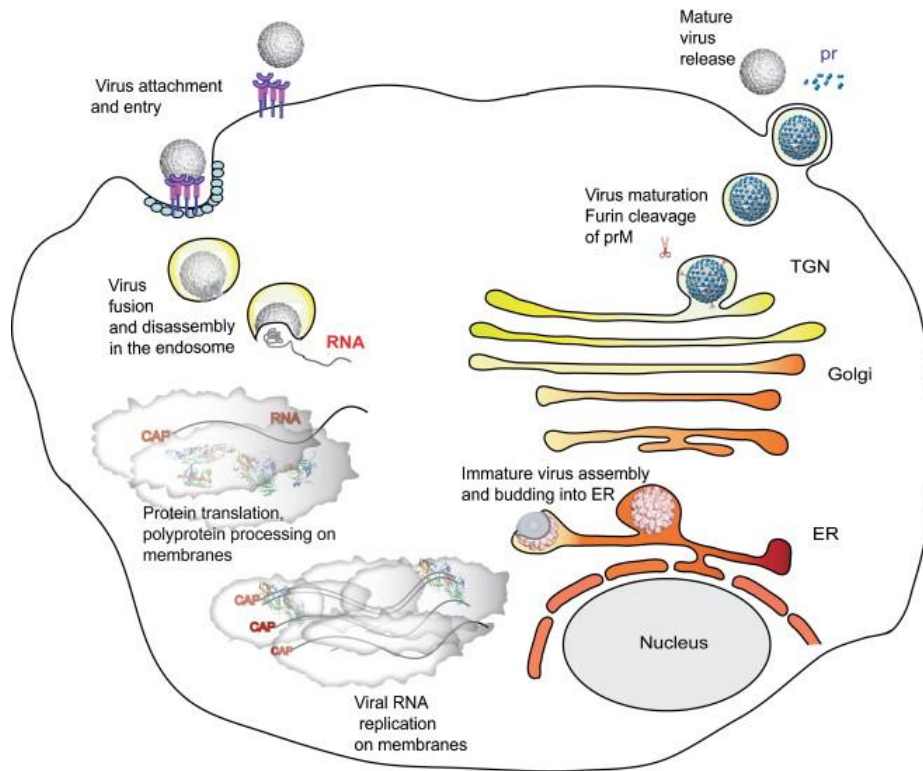


Figura 2. Ciclo de replicación del género Flavivirus (Sampath, Padmanabhan, 2009).

4.1.2. Genoma y proteínas

En la Figura 3 se representa de manera esquemática la región del genoma de ARN monocatenario que codifica a la poliproteína. Esta región está flanqueada por dos regiones no codificantes (NCR), una 5' terminal y otra 3' terminal.

En color celeste se encuentran las proteínas estructurales y en color gris las proteínas no estructurales. Los triángulos de diferentes colores indican los lugares en los que se escinde la poliproteína (Chen *et al.*, 2017). El extremo amino terminal (N- terminal) del genoma codifica 3 proteínas estructurales que forman la partícula viral y el genoma restante codifica para las demás proteínas no estructurales (Chen *et al.*, 2017).

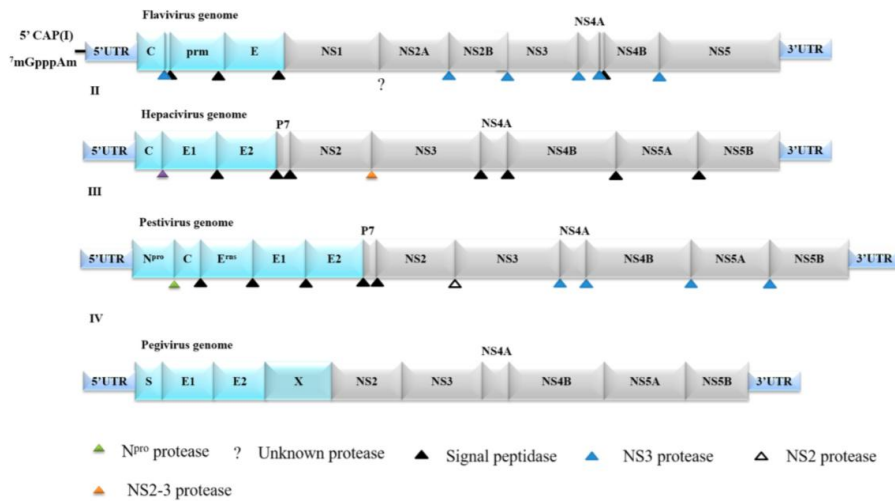


Figura 3. Representación esquemática del genoma viral de los cuatro géneros pertenecientes a la familia Flaviviridae: Flavivirus, Hepacivirus, Pestivirus y Pegivirus (Chen et al., 2017).

En la Figura 3 se puede observar la similitud que existe entre los 4 géneros en cuanto a su genoma, lo que podría explicar que el uso de un antiviral pueda ser activo frente a más de un género de esta misma familia. Las proteínas estructurales se utilizan para ensamblar nuevas capas de virus, mientras que las proteínas no estructurales presentan una gran implicación en la replicación del ARN viral (Tan et al., 2020).

Tabla 1. Funciones principales de las proteínas estructurales.

Proteínas estructurales	Función principal
Proteína C	Formación de la nucleocápside
prM	Precursor de la proteína M
Proteína M	Formación del canal iónico
Proteína E	Reconocimiento, unión, fusión y entrada del virus

La proteína C, también llamada proteína de la cápside interacciona con el ARN genómico para formar la nucleocápside (Sampath, Padmanabhan, 2009). El precursor de membrana (prM) protege al péptido para que no se produzca una fusión prematura (García et al., 2017). La escisión del precursor prM a M produce un cambio conformacional irreversible en la proteína E (proteína de envoltura), imprescindible para que se produzca un ensamblaje eficaz (Dios-Toro et al., 2020). La proteína M una vez escindida forma un canal iónico. La proteína E presenta como función principal el reconocimiento de la célula huésped y su posterior unión,

además permite la fusión de membranas (Khetarpal, Khanna, 2016). En la Tabla 1 se encuentran recogidas las principales funciones de cada proteína estructural.

Tabla 2. Funciones principales de las proteínas no estructurales del género *Flavivirus*.

Proteínas no estructurales	Función principal
NS1	Replicación de ARN viral
NS2A	Transporte de ARN recién sintetizado
NS2B	Cofactor de proteasa NS3
NS3	Proteasa y helicasa/NTPasa
NS4A	Alteración de membrana
NS4B	Escape del sistema inmune
NS5	ARN-polimerasa y metil-transferasa

En cuanto a las proteínas no estructurales, ni NS1 ni NS2A tiene aún función específica definida. Estudios recientes afirman que NS2A se encarga de transportar ARN viral recién sintetizado desde el complejo de replicación hasta el lugar de ensamblaje (Diosa-Toro *et al.*, 2020), mientras que NS1 participa en la replicación viral. NS2B es una proteína integral de membrana que se une como cofactor a NS3 necesario para la maduración del complejo de replicación (García *et al.*, 2017).

La proteasa viral se encuentra en el dominio N-terminal de la proteína NS3 que se encarga de escindir la poliproteína viral (Patil *et al.*, 2019). Está formada por una triada catalítica de serina, histidina y aspartato (Voss and Nitsche, 2020). En el dominio C-terminal de NS3 se encuentra la actividad helicasa/NTPasa, cuya función también es imprescindible en el ciclo de replicación. Su acción se ve favorecida por un aporte de energía proporcionado por la enzima (adenosín trifosfatasa) ATP-asa, que se encarga de la hidrólisis de ATP, presente también en esta proteína (Luo *et al.*, 2015).

Además de su actividad esencial en la replicación del genoma del virus, también interacciona con el sistema inmune del paciente, en concreto es su dominio helicasa el que inhibe la vía de señalización de IFN-I, evitando así la producción de genes antivirales por parte de la célula hospedadora (Xiang Setoh *et al.*, 2017). Por último NS4A y NS4B se obtienen gracias a la escisión de la proteína NS4 mediante la actividad proteasa de la NS3 (Chen *et al.*, 2017). NS4A altera la membrana para mejorar la replicación del virus y NS4B ayuda al virus a escapar de la respuesta inmune de la célula hospedadora gracias al bloqueo de la señal inducida por

interferón α/β (IFN α/β) (Khetarpal, Khanna, 2016). Estos dos últimos no tienen mucha relevancia en cuanto a la búsqueda de inhibidores (García *et al.*, 2017), los que sí tendrían más relevancia son NS3 y NS5 ya que poseen actividades enzimáticas (Li, Kang, 2020). NS5 es la más grande y conservada, se trata de una polimerasa esencial en la replicación, que presenta dos actividades enzimáticas independientes: SAM (S-adenosilmetiltransferasa) y RdRp (ARN-polimerasa dependiente de ARN), que es el que inicia la síntesis de ARN. En la Tabla 2 se establece un resumen con las principales funciones de cada proteína.

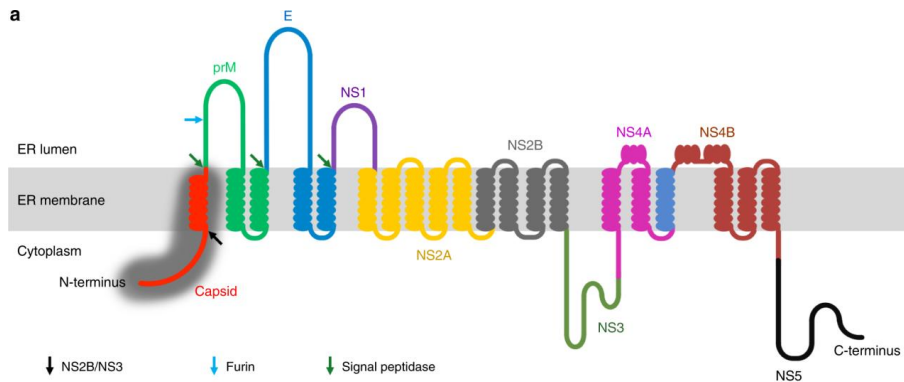


Figura 4. Secuencia de la poliproteína traducida (Tan *et al.*, 2020).

En la Figura 5 se pueden visualizar las funciones explicadas anteriormente de cada proteína. Las proteínas estructurales (C, prM y E) son las que forman la partícula viral. NS5 es la que lleva a cabo la replicación como se puede ver en la parte inferior de la imagen, y NS3 es la proteasa que lleva a cabo la escisión de la poliproteína, ayudada de NS2B como cofactor. NS1 posteriormente se une a NS3 para el ensamblaje de nuevas partículas de virus (Diosa-Toro *et al.*, 2020).

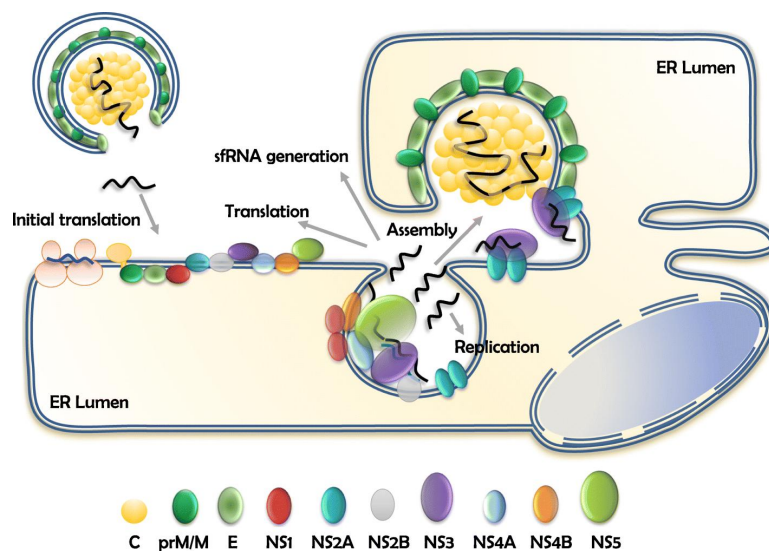


Figura 5. Funciones de las proteínas de forma esclarecida (Diosa-Toro *et al.*, 2020).

4.2. Vacunación frente a *Flavivirus*

Entre todos los flavivirus hay algunos que presentan una gran similitud en su secuencia genómica, donde nos encontramos ante un problema de reactividad cruzada de anticuerpos a la hora del diagnóstico y/o vacunación, lo que dificulta la búsqueda de antivirales y vacunas (Diamond *et al.*, 2019). Además, esto puede influir en la patogénesis de la enfermedad, que puede llegar a resultar muy peligroso (Diamond *et al.*, 2019).

4.2.1. *Actualidad sobre la vacunación frente al DENV*

Como se ha comentado en la introducción, DENV presenta cuatro serotipos, y cualquiera de ellos puede causar la fiebre del dengue, el dengue hemorrágico y terminar en shock o muerte. Cuando se presenta la infección se produce una cantidad importante de anticuerpos, que protege de forma homotípica (frente al mismo serotipo) a largo plazo, pero la protección frente a los demás serotipos (heterotípica) sólo dura aproximadamente 2 años (Deng *et al.*, 2020).

Los anticuerpos que confieren protección frente a la infección son los anticuerpos no neutralizantes, no los neutralizantes o de reactividad cruzada (Khetarpal, Khanna, 2016). El problema surge cuando un anticuerpo no neutralizante sintetizado frente al serotipo del que ha sido infectado, reacciona con otro serotipo diferente cuando se produce una segunda infección. Esta interacción produce un aumento en el número de células infectadas y es lo que va a aumentar la carga viral en el paciente, desencadenando una producción masiva de citocinas provocando la disfunción endotelial típica del dengue hemorrágico (Cáceres *et al.*, 2019).

A este fenómeno se le denomina amplificación de la infección dependiente de anticuerpos, cuyas siglas son ADE (Antibody Dependent Enhancement) y es por ello por lo que una segunda infección presenta más riesgos de desarrollar complicaciones como dengue grave o dengue hemorrágico e incluso la muerte (Deng *et al.*, 2020). Es muy importante conocer el mecanismo de la respuesta inmune frente al DENV para poder desarrollar una vacuna efectiva (Cáceres *et al.*, 2019).

Encontrar una vacuna frente al Dengue se considera todo un desafío, tanto por el efecto ADE explicado anteriormente como el desconocimiento de ciertos mecanismos (Deng *et al.*, 2020). Además la vacuna tiene que cumplir un requisito, y es que debe ser tetravalente, para generar inmunidad equilibrada entre todos los serotipos del DENV evitando el fenómeno ADE, ya que

no solo se produce por una previa infección, sino también puede ser producido por la inmunidad parcial que proporciona una vacuna (Cáceres *et al.*, 2019).

En la Figura 6 se esquematiza el proceso explicado con anterioridad.

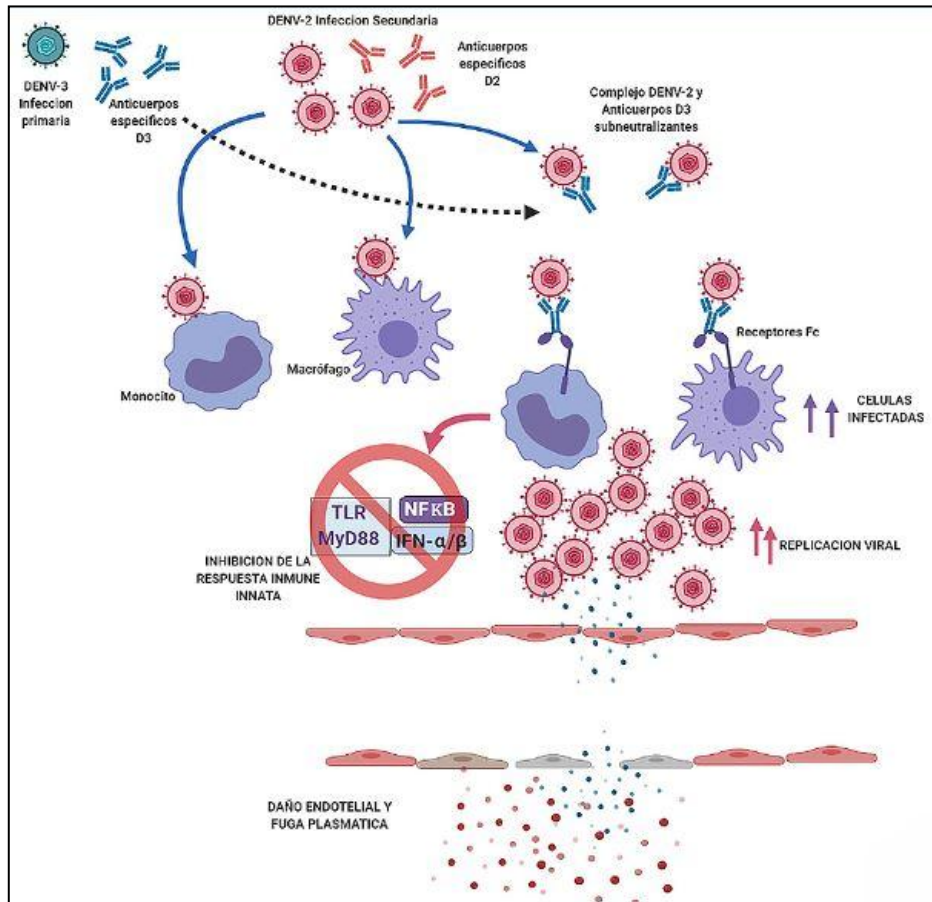


Figura 6. Esquema donde se intenta explicar el fenómeno 'Mejora dependiente de anticuerpos' (Cáceres *et al.*, 2019).

Se han intentado desarrollar hasta 5 tipos de vacunas contra el Dengue: viva atenuada, inactivada, de subunidad recombinante, vectorizada y de ADN.

Para desarrollar cualquier vacuna de virus vivos atenuados, hay que utilizar una cepa que esté debidamente atenuada para que produzca en el individuo una infección asintomática pero que sea segura, además de dotar al organismo de inmunidad frente a una posterior infección (Choy *et al.*, 2020). A principios de 2016 fue cuando se comercializó la primera vacuna frente al DENV en varios países (Patil *et al.*, 2019). Esta vacuna se trata de una vacuna viva atenuada quimérica tetravalente denominada *Dengvaxia* que se basa en la vacuna 17D frente al YFV ya comercializada. Fue comercializada en varios países pero no ha resultado ser del todo eficaz, y esto podría deberse a que posee el esqueleto de otro virus (Khetarpal, Khanna, 2016). Ésta no

protege frente a todos los serotipos, su uso es limitado debido a su incapacidad para neutralizar el serotipo DENV-2.

Por el contrario, la vacuna de subunidad recombinante es más probable de desarrollar inmunidad frente a los cuatro serotipos, pero presenta problemas de toxicidad. La vacuna de ADN presenta ventajas como su fácil manipulación genética y alto nivel de expresión en proteínas, además de ser estables y de bajo costo, aunque también presenta inconveniente, que es su baja capacidad de inducir inmunidad (Deng *et al.*, 2020).

Es necesario seguir la investigación para dar con la vacuna que proteja frente a los cuatro serotipos, y para ello es imprescindible conocer las bases genéticas y moleculares de la atenuación del virus en cuestión (Cáceres *et al.*, 2019). En un reciente estudio realizado por Milly *et al.*, se utilizó la cepa DENV-2 PDK53, derivada de la cepa natural DENV-2 16681 aislada de un paciente. En dicho estudio se sostiene que una mutación atenuante provoca una errónea glicosilación, que aumenta el estrés oxidativo, aumentando la expresión de IFN tipo 1. Esta mutación consiste en una sustitución de aminoácidos en la proteína NS1, en concreto NS1 G53D (sustitución de un residuo de Glycina en la posición 53 por un residuo de Aspartato), aunque no es la única mutación responsable de la atenuación. Esto tiene como consecuencia la limitación en la capacidad de propagación del virus (Choy *et al.*, 2020), que puede resultar interesante para el desarrollo de una próxima vacuna.

4.2.2. Actualidad sobre la vacunación frente al ZIKV

Durante el embarazo, la infección causada por el virus del Zika se ha asociado a casos de microcefalia en fetos, además de déficit visuales y auditivos, así como dificultades en el aprendizaje. Se ha demostrado que el virus del Zika puede invadir directamente la placenta y puede transmitirse a través de contacto sexual (Maslow, 2019).

No se considera necesaria la vacunación en adultos, ya que generalmente resultan ser asintomáticos y es muy poco probable que se den complicaciones neurológicas. Si que se considera prudente la vacunación en mujeres en edad fértil y en sus parejas, por el riesgo ya mencionado (Maslow, 2019).

No existe aún una vacuna comercializada efectiva frente al ZIKV, aunque su investigación no ha cesado ya que continúa con múltiples candidatas en ensayos clínicos (Maslow, 2019). En la mayoría de las vacunas que se encuentran en ensayos clínicos se han utilizado como antígenos partículas subvirales (SVP). Se asemejan a virus auténticos pero solo contienen proteínas estructurales que se repiten para inducir respuesta inmune humoral y celular (Hui Wong *et al.*,

2019). Esto hace que se muestren como candidatas frente a múltiples flavivirus, ya que comparten muchas propiedades antigénicas (Diamond *et al.*, 2019).

Se encuentran hoy en día en ensayos clínicos cuatro tipos de vacunas: vacunas de ADN, vacunas de ARNm, vacunas vectorizadas y vacunas inactivadas. De todas ellas sólo 1 se encuentra en fase II de los ensayos clínicos, una vacuna de ADN, VRC5283 (Diamond *et al.*, 2019).

En los últimos años la mayoría de las vacunas comercializadas han sido vacunas vivas atenuadas, pero gracias a los grandes avances en biología molecular se están llevando a cabo investigaciones sobre otros tipos de vacunas, como las vacunas basadas en partículas similares a virus (VLP). En una investigación llevada a cabo por Himanshu *et al.* se desarrolla un posible candidato a vacuna basado en VLP dirigido al ZIKV, YFV, JEV y a un virus perteneciente al género *Alphavirus* denominado Virus chikungunya (CHIKV). Esta vacuna tetravalente resulta ser beneficiosa para su aplicación en personas residentes de zonas endémicas (Garg *et al.*, 2020). En los resultados se ha confirmado que proporciona fuertes títulos de anticuerpos neutralizantes en las líneas celulares utilizadas frente a los cuatro virus mencionados anteriormente, es decir; gran cantidad de anticuerpos neutralizantes en sangre, aunque se necesitan más estudios en modelos animales apropiados para que la eficacia sea bien definida (Garg *et al.*, 2020).

4.3. Tratamiento antiviral

Para el estudio del tratamiento viral esta revisión se centrará en ZIKV y DENV.

El reposicionamiento de fármacos es una estrategia que consiste en reutilizar fármacos ya comercializados con indicación para una o varias patologías, en enfermedades para las cuales aún no existe tratamiento específico o suficientemente eficaz (Pillaiyar *et al.*, 2020). Resulta muy importante utilizar esta estrategia en infecciones emergentes (Stefanik *et al.*, 2020). Entre los medicamentos y vacunas recientemente aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) aproximadamente el 30% han sido reutilizados con éxito frente a otras enfermedades. Esto aporta una reducción en costes y tiempo (Pillaiyar *et al.*, 2020).

Algunos medicamentos ya comercializados y aprobados por la FDA que se encuentran en estudio para combatir al ZIKV, son: efavirenz, tipranavir y dasabuvir. Efavirenz es un

medicamento antirretroviral (ARV) indicado en el tratamiento del Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1 (VIH-1) en adultos (Chen *et al.*, 2020), cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la enzima transcriptasa inversa del VIH-1 (Stefanik *et al.*, 2020). Tipranavir también está indicado en el tratamiento antirretroviral combinado del VIH-1, pero su mecanismo de acción es diferente. Éste es un inhibidor no peptídico de la proteasa del VIH-1. Por el contrario, dasabuvir no está indicado en el tratamiento del VIH-1, sino en el de la Hepatitis C crónica producida por el Virus de la Hepatitis C (VHC). Es un inhibidor no nucleósido de la ARN polimerasa dependiente de ARN del VHC, por lo que impide que el virus se replique. Valorando la similitud que existe entre las estructuras de las ARN polimerasas del VHC y de los flavivirus, su mecanismo de acción frente a éstos podría ser análogo (Stefanik *et al.*, 2020).

Después de un cribado *in vitro* de medicamentos aprobados por la FDA, se realizan ensayos de acoplamiento para valorar la capacidad de inhibición de la replicación de flavivirus de estos tres principios activos. Se estudia en tres líneas celulares diferentes, entre las que se encuentran las células Vero (aisladas del tejido epitelial del riñón de la especie primate *Chlorocebus sabaeus*) infectadas con tres flavivirus: ZIKV, WNV y TBEV. Se obtienen como resultados la unión de dasabuvir y tipranavir al dominio metiltransferasa de la proteína NS5, y de efavirenz al dominio proteasa de la proteína NS3 con potencia antiviral contra ZIKV, WNV y TBEV (Stefanik *et al.*, 2020).

El ZIKV se replica en las neuronas de forma preferente produciendo neurodegeneración, que puede ser debida a la excitotoxicidad del glutamato. Para prevenir la muerte neuronal se utilizan fármacos aprobados con la FDA antagonistas de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDAR). Un ejemplo es la memantina, aunque no reduce la carga viral, ya que solo evita la muerte neuronal mejorando los síntomas neuronales (Baz, Boivin, 2019).

Lo más importante en cuanto al desarrollo de medicamentos inhibidores de la replicación del DENV es que actúe frente a los cuatro serotipos. Algunos medicamentos con diferentes mecanismos de acción se han utilizado para combatir el DENV como antipalúdicos, antiparasitarios, antihistamínicos y estatinas. Dos de los medicamentos aprobados por la FDA que han resultado ser seguros en pacientes infectados son Ivermectina y Ketotifeno, y se ha visto que reduce los niveles de partículas virales en sangre y la temperatura corporal, por lo que combate la fiebre del DENV (Pillaiyar *et al.*, 2020).

En definitiva, los agentes antivirales pueden actuar a diferentes niveles como inhibiendo la entrada del virus en la célula hospedadora, las proteínas estructurales, o diferentes actividades

enzimáticas de las proteínas no estructurales imprescindibles en la replicación del virus. Éste último se considera el enfoque más exitoso (Patil *et al.*, 2019).

4.3.1. NS5 como diana terapéutica

En la proteína NS5 existen dos actividades que pueden ser inhibidas: ARN polimerasa y helicasa. La ARN polimerasa NS5 de DENV presenta dos tipos de inhibidores: inhibidores de nucleósidos (NI) e inhibidores de no nucleósidos (NNI) (García *et al.*, 2017). El estudio de los NI floreció a partir de su éxito frente al VIH (Chen *et al.*, 2015) y su función es competir con el sustrato natural de los nucleósidos trifosfato (NTP) para incorporarse a la cadena de ARN causando mutación y error (Patil *et al.*, 2019). En cambio, los NNI no compiten con ningún elemento, sino que bloquean a la enzima en su forma inactiva evitando así que se produzca el inicio o la continuación de la síntesis de ARN. Un ejemplo de NNI es la Ivermectina (García *et al.*, 2017). A diferencia de los NI que se incorporan directamente a la polimerasa viral, los NNI necesitan una fosforilación previa y convertirse en nucleósidos trifosfatos para unirse a la cadena de ARN o ADN y así producir el error en la lectura (Chen *et al.*, 2015). Puede existir un problema, y es que los virus pueden hacerse resistentes frente a este tipo de inhibidores, que podría evitarse según Patil *et al.*, administrándose en combinación con un NI u otro fármaco de acción directa.

Muchos han sido los NI desarrollados con buenas características farmacocinéticas pero que no han logrado superar los ensayos *in vitro* debido a su toxicidad, y como consecuencia han sido descartados (Patil *et al.*, 2019). Algunos de los ejemplos son los siguientes. Existen análogos de adenosina que inhiben la replicación de DENV como MK-0608, NITD-449, NITD-203 y NITD-008. Éstos mostraron actividad antiviral en células Vero además de frente el DENV, frente el ZIKV (Baz, Boivin, 2019). Las diferencias estructurales entre estos compuestos se pueden observar en las Figuras 7, 8 y 9.

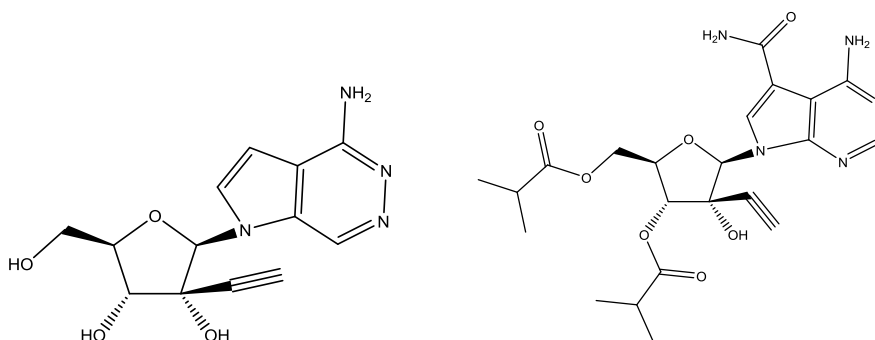


Figura 7. Estructuras químicas de los inhibidores NITD-008 y NITD-203.

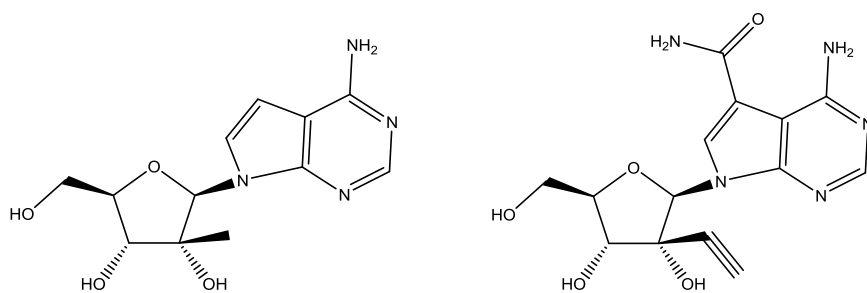


Figura 8. Estructuras químicas de los inhibidores MK-0608 y NITD-449.

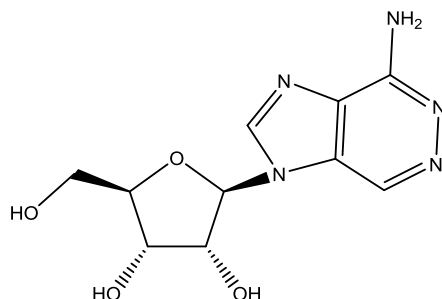


Figura 9. Estructura química de la molécula adenosina, similar al inhibidor NITD-008.

Sinefungina es un fármaco antifúngico aislado de *Streptomyces griseoleus*, que se une a bolsillo hidrofóbico del dominio metiltransferasa de la proteína NS5 de ZIKV y DENV (Baz, Boivin, 2019). Esto es debido a que es un análogo de SAM (S-Adenosil-L-Metionina), que presenta en lugar de un azufre metilado un carbono unido a un grupo amino, que permite que se una pero que no se establezcan las interacciones necesarias para continuar con su actividad natural. Ensayos muestran que la afinidad del fármaco es mucho mayor que la del sustrato natural (García *et al.*, 2017). Sin embargo, también ha resultado tener problemas relacionados con la toxicidad por lo que se ha obstaculizado su uso clínico (Baz, Boivin, 2019). En las figuras 10 y 11 se pueden observar las diferencias estructurales entre ambas moléculas.

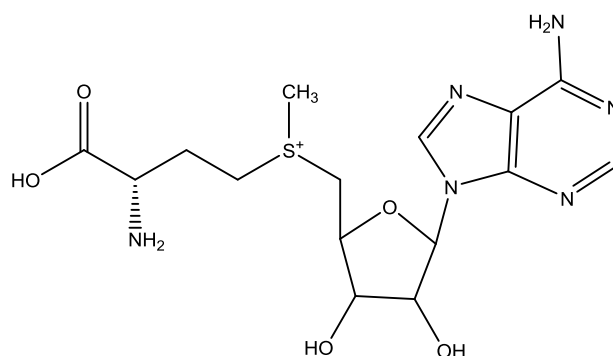


Figura 10. Estructura química de SAM.

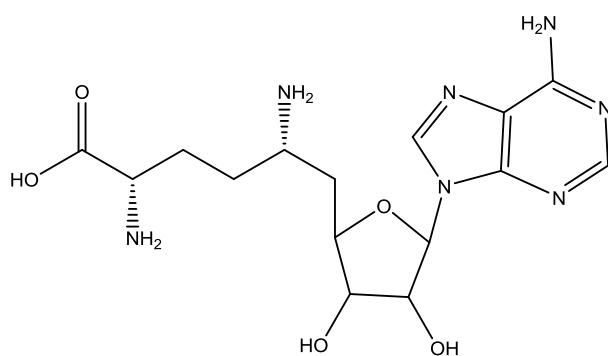


Figura 11. Estructura química del inhibidor Sinefungina donde se puede observar la diferencia estructural que existe entre éste y la molécula SAM.

Debido a la similitud genómica existente entre el VHC y algunos flavivirus, un NI del VHC ha resultado efectivo frente al DENV, aunque tuvo que retirarse cuando llegó a la fase in vitro debido también a problemas de toxicidad. Se investiga si su toxicidad puede ser mejorada combinada con ribavirina, un inhibidor análogo de guanosina de amplio espectro capaz de inhibir la síntesis de ADN y ARN de varios virus (Baz, Boivin, 2019). Otro ejemplo de inhibidor análogo de guanosina sería el INX-08189, con potencia mejorada debido a su estructura de profármaco de monofosfato (Chen *et al.*, 2015).

Un estudio realizado por Baz y Boivin demuestra la actividad inhibitoria de la ribavirina en ZIKV. Inhibe la síntesis de purinas, debido a su similitud estructural con el nucleósido natural guanosina, paralizando la actividad del dominio metiltransferasa de la proteína NS5, frenando así la replicación del virus (García *et al.*, 2017). En la Figura 12 se puede observar dicha similitud.

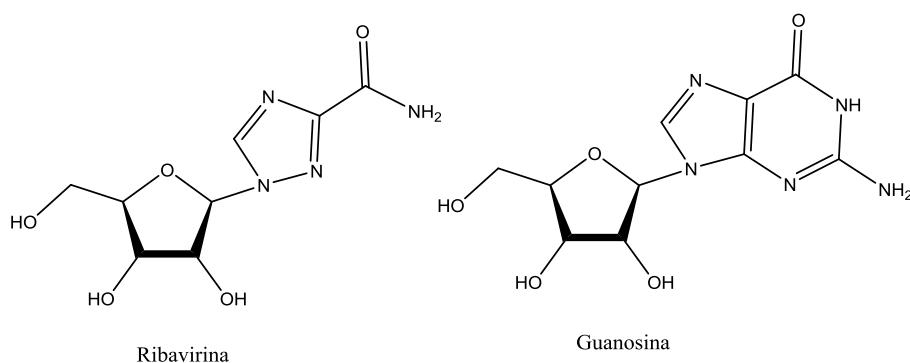


Figura 12. Estructuras químicas del inhibidor ribavirina y del nucleósido guanosina.

Además de los análogos de adenosina y guanosina se han utilizado análogos de citidina como el balapiravir (RG-1626) que es un profármaco de un análogo de nucleósidos que debe ser fosforilado para ser activo (Tayade *et al.*, 2018). Originalmente se estudió para tratar el VHC

aunque su toxicidad hizo que se interrumpieran los ensayos clínicos. Se ensayó in vitro y presentó actividad anti dengue aunque en humanos este compuesto no fue capaz de reducir la viremia en comparación con lo ocurrido en los ensayos anteriores. Esto podría ser debido a la producción de citocinas que disminuyen la capacidad de conversión del balapiravir en su forma trifosfato (Chen *et al.*, 2015). En la Figuras 13 se observan el antiviral balapiravir y su análogo natural citidina.

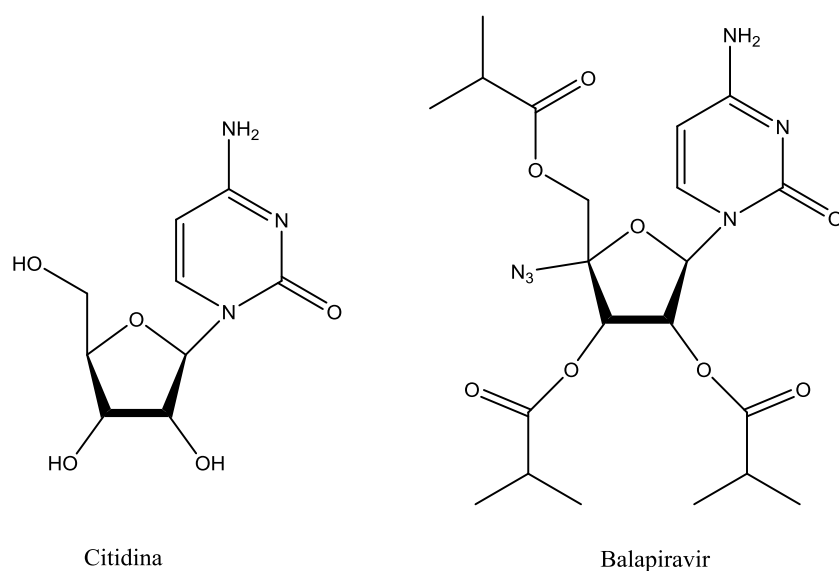


Figura 13. Estructuras químicas del inhibidor balapiravir y del nucleósido citidina.

En cuanto al dominio helicasa de la proteína NS5 de DENV y otros dos flavivirus, este resulta ser inhibido por un fármaco antihelmíntico denominado Ivermectina (NNI), que a su vez también inhibe el dominio ARN polimerasa, por lo que va a frenar la replicación del virus. Se ha demostrado que es muy efectivo, ya que produce una reducción importante de la carga viral, pero también presenta problemas de toxicidad (García *et al.*, 2017). Ketotifeno es un antihistamínico H1 con eficacia comprobada frente al virus del Dengue (Pillaiyar *et al.*, 2020). Su lugar de unión específico es desconocido.

Otros que han sido examinados y comprobada su eficacia en tres líneas celulares son: ácido aminolevulínico, ácido azelaico, clorhidrato de mitoxantrona (antineoplásico) y sulfato de quinina (antimalárico) (Pillaiyar *et al.*, 2020).

4.3.2. NS3 como diana terapéutica

La proteasa NS2B-NS3 ha sido objeto de estudio, ya que se trata de una enzima altamente conservada dentro del género *Flavivirus* (Li *et al.*, 2018), además presenta un papel esencial en el proceso de replicación genómica del virus, por lo que puede suponer una diana muy interesante para el desarrollo de fármacos antivirales (Kang *et al.*, 2017). Ha sido muy complicada la tarea de desarrollar inhibidores de esta enzima, aunque en las últimas investigaciones se estudia con esperanza la inhibición de las interacciones entre la proteína NS3 y su cofactor NS2B y la identificación de sitios alostéricos en dicha proteína (Voss and Nitsche, 2020).

En un artículo basado en una investigación reciente realizada por Zhong *et al.*, se estudia un aditivo alimentario aprobado por la FDA, eritrosina B (E127), como potente inhibidor de la proteasa NS2B-NS3 de ZIKV y DENV. Su mecanismo de acción es una inhibición ortostérica de las interacciones entre la enzima NS3 y su cofactor NS2B a través de un mecanismo no competitivo. Los análisis realizados informaron que no sólo inhibía la proteasa, sino que también reducía notablemente la síntesis de ARN viral y la expresión de proteínas (Li *et al.*, 2018). La biodisponibilidad resultó ser baja, por lo que podría ser necesaria una formulación mejorada para aumentar dicha biodisponibilidad. Además la eritrosina B no ha resultado ser dañina en el embarazo, ya que se encuentra en la categoría C. Esto resulta interesante para su administración a pacientes con ZIKV ya que uno de los principales riesgos de la infección por ZIKV es microcefalia en fetos (Li *et al.*, 2018).

Una serie de inhibidores tetrapéptidos han sido sintetizados y pueden unirse covalentemente con la enzima NS3-2B. Estos son un derivado del ácido borónico y la trifluorometilcetona (Green *et al.*, 2012). En la Figura 14 se observan sus estructuras.

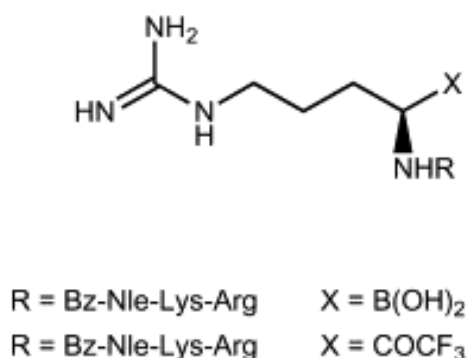


Figura 14. Estructura química del derivado del ácido borónico y la trifluorometilcetona; respectivamente (Green *et al.*, 2012).

Las arilcianoacrilamidas, que son inhibidores de la tirosin quinasa, también tienen efecto inhibitorio sobre la proteasa NS3-NS2B. Tanto el doble enlace como el grupo arilo le proporcionan una densidad electrónica clave en su actividad. El compuesto cuya estructura podemos ver en la Figura 15 es el inhibidor más potente de esta serie de compuestos (Green *et al.*, 2012).

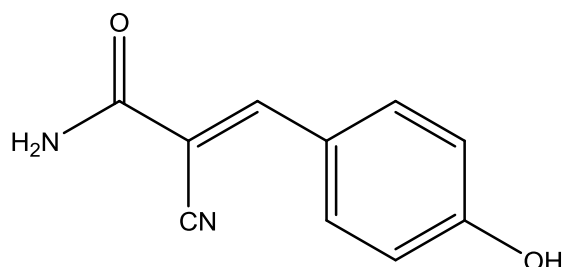


Figura 15. Estructura química del compuesto de tipo arilcianoacrilamida que ha demostrado poseer mayor potencia.

Existen pocos estudios acerca de los inhibidores del dominio helicasa de la proteína NS3, aunque un estudio reciente afirma que la suramina, un fármaco antiparasitario, ha resultado ser un inhibidor no competitivo de dicha actividad (Mottin *et al.*, 2018).

4.3.3. Proteína E como diana terapéutica

El compuesto BP34610 ha demostrado ser un inhibidor de los cuatro serotipos del DENV. Su mecanismo de acción detallado está aún por especificar, pero puede afectar a la entrada del virus en la célula, ya que parece ser que afecta a la fusión de membrana mediada por la proteína de envoltura E, una de las primeras etapas presentes en el ciclo de infección de flavivirus. Puede resultar una estrategia novedosa el hecho de combinar este inhibidor con ribavirina para el tratamiento de la infección por flavivirus. La combinación resulta en una acción antiviral sinérgica mejorada sin observación de efectos tóxicos (Yang *et al.*, 2019).

El galato de epigallocatequina (EGCG) es un polifenol natural presente en gran cantidad en el té verde que ha demostrado tener actividad antiviral frente a varios virus de diferentes familias (Figura 16). En esta revisión interesa conocer que presenta capacidad de interferir en la entrada del ZIKV en la célula hospedadora en un estudio con células Vero E6. Su mecanismo de acción podría estar relacionado con la interacción directa del fármaco con la envoltura lipídica, es decir con la proteína E. Se ha demostrado que puede atravesar la barrera placentaria, por lo que podría minimizar el daño al feto, dado que el ZIKV es un virus teratógeno (Carneiro *et al.*,

2016). Este fármaco podría ser interesante tanto para la terapia como para la prevención de la infección por ZIKV.

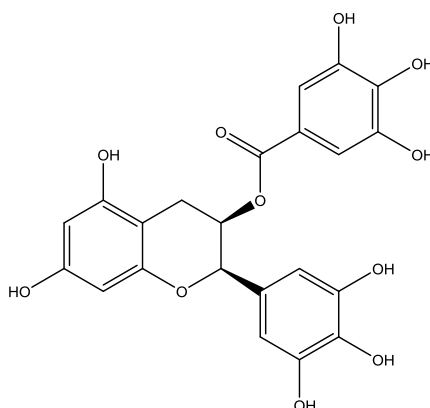


Figura 16. Estructura química de la molécula con actividad antiviral EGCG (Carneiro et al., 2016).

4.3.4. Otras dianas terapéuticas

Los lípidos que derivan de la célula infectada constituyen aproximadamente un 17% del virus. Se cree que los flavivirus modifican el metabolismo de la célula huésped para aumentar la β -oxidación de los ácidos grasos aumentando así la producción de energía necesaria para la replicación. Además, se ha visto que los lípidos son esenciales para la correcta formación de la nucleocápside (Hitakarun *et al.*, 2020). Esto puede resultar interesante para el desarrollo de fármacos.

El orlistat (tetrahidrolipstatina), un medicamento aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), inhibe el dominio tioesterasa de la sintasa de ácido graso (FASN), una enzima clave responsable de la *síntesis de novo* de ácidos grasos de cadena larga. Al inhibir las lipasas pancreáticas se ha utilizado para bajar de peso. Debido a que los altos niveles de ácido graso de la biosíntesis de lípidos pueden promover el rápido crecimiento y la división de las células cancerosas, orlistat también se ha evaluado para la terapia de una serie de cánceres (Hitakarun *et al.*, 2020).

A su vez, se ha descubierto que las estatinas presentan actividad anti-Dengue tanto en cultivo celular como en células de ratón, ya que reducen los lípidos y por lo tanto la mortalidad en la enfermedad cardiovascular al ser inhibidores de la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa) (Tayade *et al.*, 2018).

Otra diana terapéutica posible podría ser el pH del endosoma. Aumentar el pH del mismo podría suponer un desajuste en el mecanismo de fusión y entrada a la célula huésped de la

partícula viral. Este mecanismo de acción lo presenta la Cloroquina, un antipalúdico con actividad anti-Dengue por aumento de pH (Tayade *et al.*, 2018). Otros compuestos que presentan el mismo mecanismo de acción son: quinacrina y mefloquina. Más ejemplos de fármacos en estudio que inhiben la entrada del virus en la célula son: obatoclax y salifenilhalamida (Mottin *et al.*, 2018).

4.3.5. Estudio de plantas medicinales con actividad antiviral

Desde la antigüedad, las plantas han sido una fuente importante de medicina tradicional, ya que son más aceptables por los pacientes, a la vez que menos tóxicas y menos costosas. (Abd Kadir *et al.*, 2013). Algunas especies de plantas medicinales han sido utilizadas para combatir la infección por DENV. Los profesionales creen que las hojas de "tawa-tawa" (*Euphorbia hirta*) evitan que la fiebre pase a estados críticos porque previene el sangrado, y que las hojas de *Psidium guajava* estimulan la producción de plaquetas, lo que ayuda en el curso de la enfermedad. Además las hojas de guayaba contienen quercetina, un principio activo que actúa inhibiendo la formación de ARNm viral. *Carica papaya* se ha utilizado también tradicionalmente contra la fiebre del Dengue con capacidad de aumentar el recuento de plaquetas, de glóbulos blancos y de neutrófilos (Abd Kadir *et al.*, 2013). Una planta acuática como es *Marina Zostera*, también presenta actividad anti-Dengue gracias a un compuesto derivado de ella denominado ácido zostérico (Figura 17).

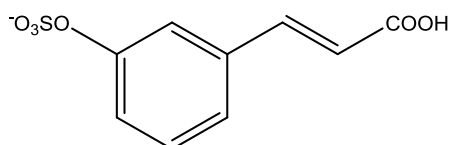


Figura 17. Ejemplo de metabolito natural y su estructura química, Ácido zostérico.

El extracto del rizoma de *Curcuma longa* muestra actividad inhibiendo la topoisomerasa I y II. Se obtienen 3 compuestos del extracto donde el más potente es la curcumina III. Además el aceite volátil de la misma presenta actividad mosquicida. Los galactomananos extraídos de las semillas de *Mimosa scabrella* también han demostrado tener actividad anti-Dengue, pero en este caso sólo sobre el serotipo I (Prakash *et al.*, 2018).

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones extraídas una vez realizada la revisión bibliográfica son las siguientes:

1. Las enfermedades emergentes causadas por las diferentes especies del género *Flavivirus*, que en su mayoría antes afectaban solo a ciertas áreas tropicales y subtropicales, han pasado a afectar a casi toda la población mundial, lo que supone un problema de salud pública. La ausencia de tratamientos antivirales específicos frente al virus del Dengue, al virus del Zika y otros del mismo género dificulta el control de la expansión del virus. Son arbovirus; es decir, se transmiten por artrópodos, que en su mayoría son mosquitos, pero el simple control de la población de mosquitos no es suficiente, ya que no se dispone de los recursos suficientes en todas las áreas del mundo. Es por ello por lo que en esta revisión se define como urgente la búsqueda de nuevas vacunas y nuevos fármacos que frenen la expansión de estos virus.

2. Presentan una poliproteína con proteínas estructurales y no estructurales importantes en su ciclo de reproducción. Su genoma se conserva en su gran mayoría en casi todas las especies pertenecientes a este género, por lo que va a cobrar importancia el término ADE (mejora dependiente de anticuerpos), que no es más que un desajuste del sistema inmune por una neutralización incorrecta de anticuerpos.

3. Esta revisión se centra en el desarrollo de vacunas frente a DENV y ZIKV. Para desarrollar la vacuna es muy importante conocer anteriormente el mecanismo de respuesta inmune del hospedador. De todas las vacunas que se han ido estudiando para el género *Flavivirus* sólo muy pocas han superado los ensayos clínicos. En el DENV, se comercializó una vacuna viva atenuada cuyo uso es limitado porque no protege frente a los 4 serotipos. En el ZIKV, no existe aun ninguna comercializada, aunque su investigación no ha cesado.

4. Como bien se explica anteriormente, es urgente el desarrollo de vacunas y tratamiento. Es por ello que para ahorrar tanto en costes como en tiempo se decide utilizar una estrategia denominada reposicionamiento de fármacos, en la que se utilizan fármacos ya comercializados buscando una reducción notable de la carga viral en pacientes infectados con estos virus. Las dianas terapéuticas en las que se están basando la mayoría de estudios recientes e investigaciones son proteínas sobretodo no estructurales como NS3 y NS5 que desempeñan un papel importante en la replicación del virus, por lo que si se consigue inhibirlas se conseguirá paralizar la replicación. Además también se estudian como posibles dianas terapéuticas algunas proteínas estructurales como la proteína E, la proteína de envoltura.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abd Kadir SL, Yaakob H, Mohamed Zulkifli R. Potential anti-dengue medicinal plants: A review. *J Nat Med.* 2013; 67(4): 677–689.
- Baz M, Boivin G. Antiviral agents in development for zika virus infections. *Pharmaceuticals.* 2019; 12(3).
- Bell SM, Katzelnick L, Bedford T. Dengue genetic divergence generates within-serotype antigenic variation, but serotypes dominate evolutionary dynamics. *Elife.* 2019; 8: 1–22.
- Brown JA, Singh G, Acklin JA, Lee S, Duehr JE, Chokola AN, et al. Dengue Virus Immunity Increases Zika Virus-Induced Damage during Pregnancy. *Immunity.* 2019; 50(3): 751-762.
- Burkhard J, Ciurea A, Gabay C, Hasler P, Müller R, Niedrig M, et al. Long-term immunogenicity after yellow fever vaccination in immunosuppressed and healthy individuals. *Vaccine.* 2020; 38 (19): 3610-3617.
- Cáceres Munar BA, Castellanos Parra JE, Rodríguez Panduro MH. Antibody-dependent enhancement in the immunopathogenesis of severe dengue, implications for the development and use of vaccines. *Acta Biol Colomb.* 2019; 24(3): 439–451.
- Campos D, Navarro S, Llamas-González YY, Sugasti M, González-Santamaría J. Broad Antiviral Activity of Ginkgolic Acid against Chikungunya, Mayaro, Una, and Zika Viruses. *Viruses.* 2020; 12(4): 449.
- Carneiro BM, Batista MN, Braga ACS, Nogueira ML, Rahal P. The green tea molecule EGCG inhibits Zika virus entry. *Virology.* 2016; 496: 215–218.
- Chen J, Chen R, Shen Y, Wei H, Wang X, Zhang R, et al. Efficacy and safety of lower dose tenofovir disoproxil fumarate and efavirenz versus standard dose in HIV-infected, antiretroviral-naive adults: a multicentre, randomized, noninferiority trial. *Emerg Microbes Infect.* 2020; 9(1): 843–50.
- Chen S, Wu Z, Wang M, Cheng A. Innate immune evasion mediated by flaviviridae non-structural proteins. *Viruses.* 2017; 9(10): 1–19.
- Chen YL, Yokokawa F, Shi PY. The search for nucleoside/nucleotide analog inhibitors of dengue virus. *Antiviral Res.* 2015; 122: 12–19
- Choy MM, Ng DHL, Siriphanitchakorn T, Ng WC, Sundstrom KB, Tan HC, et al. A Non-structural 1 Protein G53D Substitution Attenuates a Clinically Tested Live Dengue Vaccine. *Cell Rep.* 2020; 31(6): 107617.

- Christova I, Papa A, Trifonova I, Panayotova E, Pappa S, Mikov O. West Nile virus lineage 2 in humans and mosquitoes in Bulgaria, 2018–2019. *J Clin Virol.* 2020; 127: 104365.
- Crance JM, Scaramozzino N, Jouan A, Garin D. Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: Antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. *Antiviral Res.* 2003; 58(1): 73-79.
- Del Carpio Orantes L, Juárez Rangel FJ, García-Méndez S. Incidencia de síndrome de Guillain-Barré durante la oleada de zika del 2016 en un hospital de segundo nivel. *Neurología.* 2020; 35(3): 160–164.
- Deng SQ, Yang X, Wei Y, Chen JT, Wang XJ, Peng HJ. A review on dengue vaccine development. *Vaccines.* 2020; 8(1): 1–13.
- Diamond MS, Ledgerwood JE, Pierson TC. Zika Virus Vaccine Development: Progress in the Face of New Challenges. *Annu Rev Med.* 2019; 70(1): 121–35.
- Diosa-Toro M, Prasanth KR, Bradrick SS, Garcia Blanco MA. Role of RNA-binding proteins during the late stages of Flavivirus replication cycle. *Virol J.* 2020; 17(1): 1–14.
- García-Bocanegra I, Paniagua J, Gutiérrez-Guzmán A V., Lecollinet S, Boadella M, Arenas-Montes A, et al. Spatio-temporal trends and risk factors affecting West Nile virus and related flavivirus exposure in Spanish wild ruminants. *BMC Vet Res.* 2016; 12(1): 1-9.
- García LL, Padilla L, Castaño JC. Inhibitors compounds of the flavivirus replication process. *Virol J.* 2017; 14(1): 1–12.
- Garg H, Mehmetoglu-Gurbuz T, Joshi A. Virus Like Particles (VLP) as multivalent vaccine candidate against Chikungunya, Japanese Encephalitis, Yellow Fever and Zika Virus. *Sci Rep.* 2020; 10(1): 1–13.
- Girard M, Nelson CB, Picot V, Gubler DJ. Arboviruses: A global public health threat. *Vaccine.* 2020; 38(24): 3989–3994.
- Green J, Bandarage U, Luisi K, Rijnbrand R. Recent Advances in the Discovery of Dengue Virus Inhibitors. 1st ed. Vol. 47, *Annual Reports in Medicinal Chemistry.* Elsevier Inc.; 2012. 297–317.
- Gwon YD, Strand M, Lindqvist R, Nilsson E, Saleeb M4, Elofsson M et al. Antiviral Activity of Benzavir-2 against Emerging Flaviviruses. *Viruses.* 2020; 12(3).
- Hitakarun A, Khongwichit S, Wikan N, Roytrakul S, Yoksan S, Rajakam S, et al. Evaluation of the antiviral activity of orlistat (tetrahydrolipstatin) against dengue virus, Japanese encephalitis virus, Zika virus and chikungunya virus. *Sci Rep.* 2020; 10(1).

- Kampen H, Holicki CM, Ziegler U, Groschup MH, Tews BA, Werner D. West Nile virus mosquito vectors (Diptera: Culicidae) in Germany. *Viruses*. 2020; 12(5): 1–14.
- Kang CB, Keller TH, Luo D. Zika Virus Protease: An Antiviral Drug Target. *Trends Microbiol*. 2017; 25(10): 797–808.
- Khetarpal N, Khanna I. Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies. *J Immunol Res*. 2016; 2016(3).
- Kobayashi S, Kaneko C, Kawakami R, Hasebe R, Sawa H, Yoshii K, et al. Amino acid 159 of the envelope protein affects viral replication and T-cell infiltration by West Nile virus in intracranial infection. *Sci Rep*. 2020; 10(1): 1–9.
- Lee IK, Hsieh CJ, Lee C Te, Liu JW. Diabetic patients suffering dengue are at risk for development of dengue shock syndrome/severe dengue: Emphasizing the impacts of co-existing comorbidity(ies) and glycemic control on dengue severity. *J Microbiol Immunol Infect*. 2020; 53(1): 69–78.
- Li Q, Kang C. Insights into structures and dynamics of flavivirus proteases from NMR studies. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(7).
- Li Z, Sakamuru S, Huang R, Brecher M, Koetzner CA, Zhang J, et al. Erythrosin B is a potent and broad-spectrum orthosteric inhibitor of the flavivirus NS2B-NS3 protease. *Antiviral Res*. 2018; 150(June 2017): 217–225.
- Luo D, Vasudevan SG, Lescar J. The flavivirus NS2B-NS3 protease-helicase as a target for antiviral drug development. *Antiviral Res*. 2015; 118: 148–58.
- Maslow JN. Zika vaccine development-current progress and challenges for the future. *Trop Med Infect Dis*. 2019; 4(3).
- Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Informes de situación y evaluación de riesgos publicados por CCAES. España: 2017. [En línea]. [Consultado en mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.mscbs.gob.es/gl/profesionales/saludPublica/ccayes/analisisituacion/infoSitua.htm>
- Mottin M, Borba JVV, Braga RC, Torres PHM, Martini MC, Proenca-Modena JL, et al. The A–Z of Zika drug discovery. *Drug Discov Today*. 2018; 23(11): 1833–1847.
- Navarro JC, Arrivillaga-Henríquez J, Salazar-Loor J, Rodríguez-Morales AJ. COVID-19 and dengue, co-epidemics in Ecuador and other countries in Latin America: Pushing strained health care systems over the edge. *Travel Med Infect Dis*. 2020: 101656.

- Norman FF, Henríquez-camacho C, Díaz-menendez M, Chamorro S, Pou D, Molina I, et al. Imported Arbovirus Infections in Spain, 2009–2018. *Emerg Infect Dis* 2020; 26(4): 658-666.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Emergencias sanitarias. España: 2020. [En línea]. [Consultado en Abril de 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/emergencias/es/>
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). Zika. España: 2020. [En línea]. [Consultado en Abril de 2020]. Disponible en: <https://www.paho.org/en/topics/zika>
- Patil VM, Balasubramanian K, Masand N. Dengue virus polymerase: A crucial target for antiviral drug discovery. *Viral Polymerases: Structures, Functions and Roles as Antiviral Drug Targets*. Elsevier Inc.; 2018. 387–428. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-815422-9.00014-0>.
- Pillaiyar T, Meenakshisundaram S, Manickam M, Sankaranarayanan M. A medicinal chemistry perspective of drug repositioning: Recent advances and challenges in drug discovery. *Eur J Med Chem*. 2020; 195.
- Prakash D, Vivek S, Shikhar V. Current perspectives of medicinal plants having anti dengue potential. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2018; 49(2): 91–96.
- Redondo-Bravo L, Ruiz-Huerta C, Gomez-Barroso D, Sierra-Moros MJ, Benito A, Herrador Z. Imported dengue in Spain: A nationwide analysis with predictive time series analyses. *J Travel Med*. 2019; 26(8): 1-9.
- Roberts L. Pandemic brings mass vaccinations to a halt. *Science*. 2020; 368(6487): 116–117.
- Rollins D, Ramsey R, Parsh B. Yellow fever. *Nursing*. 2017; 47(9): 69-70.
- Sampath A, Padmanabhan R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. *Antiviral Res*. 2009; 81(1): 6–15.
- Setoh YX, Periasamy P, Peng NYG, Amarilla AA, Slonchak A, Khromykh AA. Helicase domain of west nile virus NS3 protein plays a role in inhibition of type I interferon signalling. *Viruses*. 2017; 9(11): 1–13.
- Shan C, Xie X, Barrett ADT, Garcia-Blanco MA, Tesh RB, Vasconcelos PFDC, et al. Zika Virus: Diagnosis, Therapeutics, and Vaccine. *ACS Infect Dis*. 2016; 2(3): 170-172.
- Stefanik M, Valdes JJ, Ezebuo FC, Haviernik J, Uzochukwu IC, Fojtikova M, et al. Fda-approved drugs efavirenz, tipranavir, and dasabuvir inhibit replication of multiple flaviviruses in vero cells. *Microorganisms*. 2020; 8(4).

- Tan TY, Fibriansah G, Kostyuchenko VA, Ng TS, Lim XX, Zhang S, et al. Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. *Nat Commun.* 2020; 11(1).
- Tayade MR, Shinkar DM, Patil PB and Saudagar RB. Emerging Therapy for Dengue. *Int J Curr Pharm Res.* 2018; 10(2): 1.
- Vademecum [en línea]. [Consultado en Mayo 2020]. Disponible en: <https://www.vademecum.es/>
- Voss S, Nitsche C. Inhibitors of the Zika virus protease NS2B-NS3. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2020; 30(5): 126965.
- Wong SH, Jassey A, Wang JY, Wang WC, Liu CH, Lin LT. Virus-like particle systems for vaccine development against viruses in the flaviviridae family. *Vaccines.* 2019; 7(4): 1–20.
- Wu D, Lu J, Liu Q, Ma X, He W. To alert co-infection of SARS-COV-2 and dengue virus in developing countries in the dengue-endemic area. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2020; 2020
- Yang CC, Hu HS, Lin HM, Wu PS, Wu RH, Tian JN, et al. A novel flavivirus entry inhibitor, BP34610, discovered through high-throughput screening with dengue reporter viruses. *Antiviral Res.* 2019; 172.
- Yan G, Lee CK, Lam LTM, Yan B, Chua YX, Lim AYN, et al. Covert COVID-19 and false-positive dengue serology in Singapore. *Lancet Infect Dis.* 2020; 20(5): 536.
- Zou J, Shi PY. Strategies for Zika drug discovery. *Curr Opin Virol.* 2019; 35: 19–26.