# ESTUDIO DEL POTENCIAL ANTIVIRAL DE LA NICLOSAMIDA EN LÍNEAS CELULARES NEURONALES INFECTADAS CON VIRUS ZIKA

**Laura Karina López Ardila**

**Universidad El Bosque**

**Facultad de Ciencias - Programa de Química Farmacéutica**

**Bogotá DC. octubre 2022**

# ESTUDIO DEL POTENCIAL ANTIVIRAL DE LA NICLOSAMIDA EN LÍNEAS CELULARES NEURONALES INFECTADAS CON EL VIRUS ZIKA

**Laura Karina López Ardila**

**Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de:**

**Químico Farmacéutico**

**Modalidad de Investigación**

**Director: Félix Giovanni Delgado Tiria**

**Codirector: Sandra Johanna Morantes Medina**

**Línea de Investigación Patogénesis Viral**

**Universidad El Bosque**

**Facultad de Ciencias - Programa de Química Farmacéutica**

**Bogotá DC. octubre 2022**

# Hoja de identificación

| | |
|---|---|
| **Título:** | Estudio del potencial antiviral de la Niclosamida en líneas celulares neuronales infectadas con el virus Zika. |
| **Grupos de investigación** | Grupo de virología<br>Grupo de Investigación en Química Aplicada |
| **Línea de Investigación:** | Patogénesis Viral<br>Bioprospección y Biotecnología Farmacéutica |
| **Institución (es) Participante (s):** | Universidad El Bosque |
| **Tipo de Investigación:** | Estudio Cuantitativo Experimental |
| **Estudiante:** | Laura Karina López Ardila |
| **Director:** | Félix Giovanni Delgado Tiria |
| **Codirector:** | Sandra Johanna Morantes Medina |

# Dedicatoria o lema

“Quiero dedicar este logro a mis padres, familiares y amigos que me han brindado todo su apoyo y me han ayudado en los momentos más difíciles para continuar a lo largo de la carrera, siempre me han apoyado en la buenas y en las malas por esa razón dedico este proyecto a ellos”

# Agradecimientos

A mis padres Adriana Gómez y Diego López, por sus consejos, su paciencia y amor, porque han sido mi apoyo y mi motivación para cumplir todos mis objetivos.

A mi director Felix Giovanni Delgado y codirectora Sandra Johanna Morantes por permitirme realizar este proyecto, por ser unos excelentes docentes y apoyarme en todo momento.

A Dora Emilia Fierro, por ayudarme y brindarme todo su apoyo y conocimiento, por su paciencia, dedicación y orientación durante este largo proceso.

A mis amigos de la universidad, por ser parte de este largo proceso, por darme ánimo y por su amor y buena energía en los momentos más difíciles.

Por último, a la Universidad El Bosque, por brindarme el espacio y los equipos para llevar a cabo mi trabajo de grado.

# Tabla de contenido


1. Introducción. 1
2. Marco teórico. 2
2.1 Virus Zika. 2
2.2. Patologías asociadas. 5
2.3. Células SH-SY5Y. 6
2.4. Niclosamida. 6
2.5. Reposicionamiento de fármacos. 8
3. Planteamiento del problema. 9
4. Pregunta de investigación. 10
5. Objetivos. 11
5.1 Objetivo general. 11
5.2 Objetivos específicos. 11
6.1. Cultivo celular. 12
6.1.1. Células SH-SY5Y. 12
6.2. Solubilización de la Niclosamida. 12
6.3. Ensayo de citotoxicidad de la niclosamida. 13
6.4. Infección celular y tratamiento con niclosamida. 13
6.5. Evaluación del porcentaje de infección celular por citometría de flujo. 14
6.6. Pruebas estadísticas. 14
7. Resultados y análisis de resultados. 15
7.1. Cultivo celular. 15
7.2. Ensayo de citotoxicidad de la niclosamida. 15
7.3. Infección y tratamiento con niclosamida - Evaluación del porcentaje de infección celular por citometría de flujo. 19
8. Conclusiones. 29
9. Recomendaciones. 30
10. Referencias bibliográficas. 31

# Listado de figuras.


| Figura | Contenido | **Pág.** |
|---|---|---|
| Figura 1 | ***A**. Genoma del virus del zika delimitado por regiones no codificantes 5' y 3' y regiones de codificación de proteínas estructurales y no estructurales. **B.** Estructura general del virión.* | 3 |
| Figura 2 | *Replicación del virus Zika en la célula diana.* | 5 |
| Figura 3 | *Estructura del fármaco niclosamida* | 7 |
| Figura 4 | *Citotoxicidad en células SH-SY5Y. **A.** células sin tratamiento. **B.** Células en tratamiento con niclosamida 0,039* µM. **C.** *Células en tratamiento con niclosamida 10* µM | 20 |
| Figura 5 | *Resultados representativos de Infección celular de SH-SY5Y con ZIKV (Primera réplica). Comparación de porcentajes de infección por citometría de flujo en 7 diluciones seriadas 1:2.* | 21 |
| Figura 6 | *Resultados representativos de tratamiento pre-infección con niclosamida a diferentes concentraciones.* | 22 |
| Figura 7 | *Resultados representativos de tratamiento con niclosamida durante la infección, se emplea tratamiento con niclosamida a diferentes concentraciones.* | 23 |
| Figura 8 | *Resultados representativos de tratamiento post-infección con niclosamida a diferentes concentraciones* | 24 |

# Listado de Gráficas.


| Gráfica | Contenido | **Pág.** |
|---|---|---|
| Gráfica 1 | *Evaluación de la citotoxicidad de la niclosamida en células SH-SY5Y a 24 horas.* | 16 |
| Gráfica 2 | *Evaluación de la citotoxicidad de la niclosamida en células SH-SY5Y a 48 y 72 horas.* | 17 |
| Gráfica 3 | *Comparación de la viabilidad celular en línea SH-SY5Y a 24, 48 y 72 horas de exposición a niclosamida.* | 19 |
| Gráfica 4 | *Reducción del porcentaje de infección con ZIKAV por tratamiento con niclosamida. Porcentaje de reducción en la infección con dilución ½ de ZIKV en células SH-SY5Y luego de tratamiento pre-infección con niclosamida.* | 25 |
| Gráfica 5 | *Reducción del porcentaje de infección con ZIKAV por tratamiento con niclosamida. Porcentaje de reducción en la infección con dilución ½ de ZIKV en células SH-SY5Y luego de tratamiento con niclosamida a diferentes concentraciones durante la inoculación del virus.* | 25 |
| Gráfica 6 | *Reducción del porcentaje de infección con ZIKAV por tratamiento con niclosamida. Porcentaje de reducción en la infección con dilución ½ de ZIKV en células SH-SY5Y luego de tratamiento post infección con niclosamida a diferentes concentraciones.* | 26 |
| Gráfica 7 | *Comparación de porcentaje de reducción en la infección con dilución ½ de ZIKV en células SH-SY5Y luego de tratamiento pre-infección, durante y post infección. Tratamiento con niclosamida a diferentes concentraciones (0.039 µM, 0.078 µM, 0.156 µM, 0.312 µM, 0.625 µM y 1.5 µM).* | 27 |

# Lista de Símbolos y abreviaturas.

ZIKV: Virus del Zika

IFN: Interferón

ARNp: ARN polimerasa

NPCs: Células progenitoras neurales

OPS: Organización Panamericana de la Salud

OMS: Organización Mundial de la Salud

FDA: Food and Drug Administration

SFB: Suero Fetal Bovino

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico Complementario

ADNp: ADN polimerasa

# Resumen.

El virus del Zika es un arbovirus que se transmite por medio de la picadura de *Aedes aegypti* o *Aedes albopictus*, según la actualización epidemiológica propuesta por la Organización Panamericana de la Salud para 2021, se notifican 728.831 casos asociados a arbovirus, concentrándose en Colombia en zonas endémicas como Guainía, Caquetá, Arauca, Chocó, Huila y el archipiélago de San Andrés. El virus del Zika está asociado a enfermedades congénitas como la microcefalia, el síndrome de Guillain-Barré y otras patologías que implican una atenuación en el desarrollo y crecimiento neuronal del feto. En este trabajo, se evalúa a nivel in vitro el efecto antiviral del fármaco antihelmíntico niclosamida sobre la línea SH-SY5Y, una línea celular susceptible a la infección por el virus del Zika. La niclosamida por su parte, es un fármaco que pertenece a la categoría B de la clasificación del riesgo al feto propuesta por la FDA, lo que sugiere seguridad ante citotoxicidad congénita. Para esto, el proyecto se ejecutó en cuatro fases, en la primera se obtuvo un cultivo estable de la línea celular SH-SY5Y, en la segunda se realizaron pruebas de citotoxicidad con el fármaco niclosamida para seleccionar el rango adecuado de concentraciones a trabajar, en la tercera fase se llevó a cabo la infección celular con el fin de establecer la dilución de virus que no afecte la viabilidad de las células y al mismo tiempo obtener el nivel de infección adecuado. En la última fase, se evalúa el efecto de la niclosamida con nueve concentraciones entre 10uM y 0.039uM sobre los porcentajes de infección mediante citometría de flujo. Finalmente, es posible evidenciar una disminución en el porcentaje de infección luego de los tres esquemas de tratamiento con niclosamida, además de demostrar un porcentaje significativo de reducción en la infección con ZIKV posterior al tratamiento pre-infección con las concentraciones más altas de niclosamida. En conclusión, el estudio sugiere que la niclosamida presenta potencial antiviral siempre y cuando se cumplan ciertas condiciones experimentales como Infección celular con ZIKV dilución ½, y tiempo de tratamiento no mayor a 24 horas.



**Palabras Clave:** Zika, microcefalia, niclosamida, SH-SY5Y, antiviral

# Abstract.

Zika virus is an arbovirus transmitted by the bite of Aedes aegypti or Aedes albopictus, according to the epidemiological update proposed by the Pan American Health Organization for 2021, 728,831 cases associated with arbovirus are reported, concentrated in Colombia in endemic areas such as Guainía, Caquetá, Arauca, Chocó, Huila and the San Andrés archipelago. Zika virus is associated with congenital diseases such as microcephaly, Guillain-Barré syndrome and other pathologies that involve an attenuation in the development and neuronal growth of the fetus. In this work, the antiviral effect of the anthelmintic drug niclosamide on the SH-SY5Y line, a cell line susceptible to Zika virus infection, is evaluated in vitro. Niclosamide, on the other hand, is a drug that belongs to category B of the FDA's fetal risk classification, which suggests safety against congenital cytotoxicity. For this, the project was carried out in four phases: in the first phase, a stable culture of the SH-SY5Y cell line was obtained; in the second phase, cytotoxicity tests were performed with the niclosamide drug to select the appropriate range of concentrations to work with; in the third phase, cell infection was carried out in order to establish the dilution of the virus that does not affect the viability of the cells and at the same time obtain the appropriate level of infection. In the last phase, the effect of niclosamide with nine concentrations between 10 uM and 0.039 uM on the infection percentages was evaluated by flow cytometry. Finally, it is possible to demonstrate a decrease in the percentage of infection after the three treatment schemes with niclosamide, in addition to demonstrating a significant percentage reduction in ZIKV infection after pre-infection treatment with the highest concentrations of niclosamide. In conclusion, the study suggests that niclosamide has antiviral potential as long as certain experimental conditions are met, such as cell infection with ZIKV at ½ dilution, and treatment time no longer than 24 hours.



**Keywords:** Zika, microcephaly, niclosamide, SH-SY5Y, antiviral.

# 1. Introducción.

El virus del zika recibe su nombre por su primera aparición en el bosque Zika en Uganda, África en el año 1947, posterior a esto para el año 2007 se reportaron brotes de infección por Zika en las islas Yap del pacifico y para el 2015 el virus ya se había propagado a Brasil en donde se detectan los primeros casos de síndromes congénitos asociados a la infección (1). A partir de este momento, la Organización Mundial de la Salud declaró el virus del Zika como la primera emergencia sanitaria global para el año 2016 por su rápida propagación a 87 países y territorios (2).

El virus del Zika hace parte de un grupo de virus conocido como arbovirus, hace referencia a la transmisión que se da por medio de artrópodos hematófagos conocidos como vectores, en este caso la picadura de mosquitos del género *Aedes aegypti* y Aedes *albopictus*, cuya propagación se favorece en zonas tropicales y subtropicales (3)(4).

Por otro lado, a nivel epidemiológico la Organización Panamericana de la Salud ha catalogado a la infección con Zika como una de las problemáticas más grandes de salud pública a nivel mundial, a la que se suma el reporte de miles de casos asociados a síndromes neurológicos y patologías congénitas debido a la infección prenatal. Por un lado, se presenta el síndrome de Guillain-Barré con afecciones nerviosas que desencadenan parálisis y por otro, la microcefalia en la que hay una reducción del perímetro craneal del recién nacido. Actualmente, aunque no se reportan cifras alarmantes por ZIKV aún se siguen presentando casos y la necesidad de una solución rápida sigue latente. Sin embargo, actualmente no existe vacuna ni tratamiento específico para la infección por el virus del Zika y la única manera de mitigar la problemática es mediante estrategias de prevención (5).

Teniendo en cuenta lo anterior, mediante el reposicionamiento de fármacos como una alternativa para resolver los problemas que conlleva la investigación y desarrollo de moléculas innovadoras, se espera obtener resultados positivos en el potencial antiviral de la niclosamida evaluando la actividad de este fármaco sobre una línea celular neuronal asociada a la enfermedad. De esta manera se evidencian los mayores porcentajes de reducción a la infección por ZIKV al hacer tratamiento pre-infección con niclosamida.

# 2. Marco teórico.

*2.1 Virus Zika.*

Es importante destacar que en el año 2016 se dio a conocer la primera alerta de emergencia de salud pública a causa de la infección por el virus del Zika. De esta manera, se fue extendiendo inicialmente en regiones tropicales de Sudamérica y luego a Centroamérica y Estados Unidos. Mientras tanto, en Colombia las autoridades sanitarias reportaron a la Organización Mundial de la Salud y a la Organización Panamericana de la Salud el primer caso en el departamento del bolívar y este mismo año se inició el reporte de enfermedades asociadas a la infección por ZIKV (6).

El virus del Zika también conocido como ZIKAV pertenece a la familia flaviviridae del género flavivirus y es denominado por la Organización Mundial de la Salud como un arbovirus, es decir que se transmite por medio de artrópodos hematófagos, en este caso la picadura de mosquitos Aedes *aegypti y Aedes albopictus.* Las principales características estructurales que comparten los flavivirus es la conformación por una cadena positiva monocatenaria de RNA de 10 a 11 kilo bases con un genoma que se rodea por dos regiones no codificantes; en un extremo la región 5' NCR y en el otro la región 3' NCR lo que permite la formación de una envoltura lipídica con adición de glicoproteínas que rodean una nucleocápside esférica con simetría icosaédrica cuyo genoma codifica para tres proteínas estructurales y siete proteínas no estructurales.

Las proteínas estructurales se encargan del ensamblaje de los viriones, dentro de estas se encuentra la proteína M como precursora de membrana y participe del plegamiento de la proteína E, la cual corresponde a las glicoproteínas de ensamblaje que conforman la envoltura del virus y que le van a permitir iniciar el proceso de adhesión a las membranas celulares. Por último, la proteína C a nivel de la cápside que se asocia con el RNA genómico formando la nucleocápside. Por otro lado, las proteínas no estructurales participan en la replicación del RNA viral y son necesarias para la continuidad del ciclo de vida del virus asociado a la virulencia y patogenicidad, estas proteínas se identifican como: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Figura 1) (7).

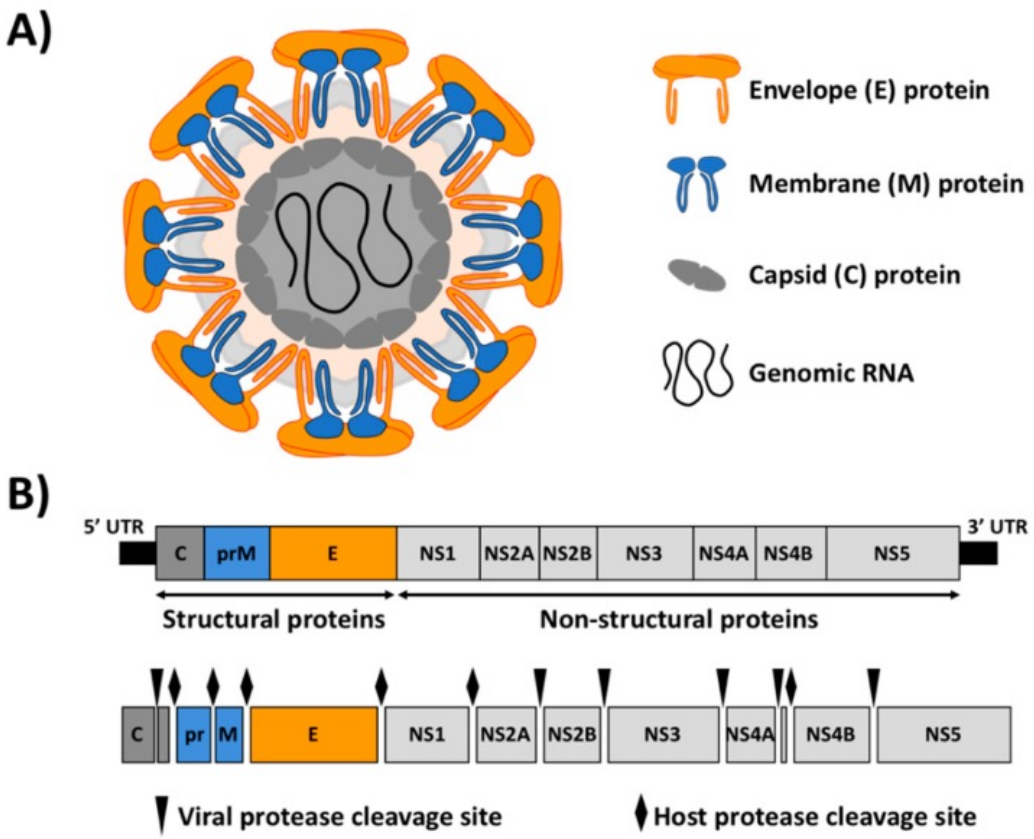



**Figura 1.** ***A****. Estructura general del virión.* ***B.*** *Genoma del virus del zika delimitado por regiones no codificantes 5' y 3' y regiones de codificación de proteínas estructurales y no estructurales. Fuente: Tomado de Avila-Perez, G., Nogales, A., Martin, V., Almazan, F., Martinez-Sobrido, L. Reverse Genetic Approaches for the Generation of Recombinant Zika Virus. Viruses. 10, (11), (2018).*

La proteína NS2A es importante en el ensamblaje de los viriones y la permeabilización de la membrana, esta proteína degrada los factores de transcripción STAT1 y STAT2, lo que limita la señalización del IFN tipo I y por ende la respuesta antiviral celular. Ahora, la proteína NS2B Y NS3 actúan de forma sinérgica para formar un virión maduro, la proteína transmembrana NS4B actúa del mismo modo como antagonista del IFN tipo I y finalmente la proteína no estructural NS5, uno de los productos más importantes de la codificación ya que es la encargada de la evasión del sistema inmunitario (8)(9)(10).

El mecanismo de transmisión empieza cuando el agente infeccioso es introducido al huésped por medio de la picadura, es así como el vector ingiere los microorganismos patógenos junto con la sangre de un portador infectado y posteriormente los inocula en un nuevo portador al ingerir su sangre. A partir de allí, las manifestaciones clínicas, aunque sean bastante similares a las del dengue y chikungunya, se caracterizan por fiebre leve, cefalea, dolor en las articulaciones, conjuntivitis y exantemas. Estas manifestaciones, inician en pocos días después de la exposición, aun así, el periodo de incubación no está bien definido y generalmente la sintomatología puede perdurar de 3 a 7 días.

En relación con lo anterior, para el mecanismo de replicación inicialmente se describe el ingreso del virus a una célula huésped en forma de endosoma mediado por clatrina, este componente estructural es necesario para formar la vesícula de forma que pueda ser internalizada. Posterior a ello, bajo cambios de pH de la glicoproteína E y por la acción de proteasas específicas se abre paso a la fusión entre la membrana viral y la membrana del endosoma para liberar el genoma viral en el citoplasma. A partir de allí, el genoma del ZIKV queda libre en el citoplasma como RNA positivo monocatenario y ya que hace el papel de RNA mensajero, la traducción inicia inmediatamente después de su liberación. En este caso, el virus emplea la maquinaria de la célula para sintetizar tanto proteínas estructurales como no estructurales, estas últimas forman un complejo de replicación copiando el RNA positivo de cadena sencilla a una molécula de cadena doble y posteriormente la helicasa desenrolla las hebras y libera dos hebras por separado de RNA de cadena sencilla, una consentido positivo y otra con sentido negativo. De esta forma la cadena sencilla positiva se une con las proteínas estructurales para la formación de viriones inmaduros. Por último, los viriones viajan de forma inmadura hacia el aparato de Golgi donde finalmente adoptan un carácter infeccioso y son liberados mediante exocitosis (Figura 2) (11).

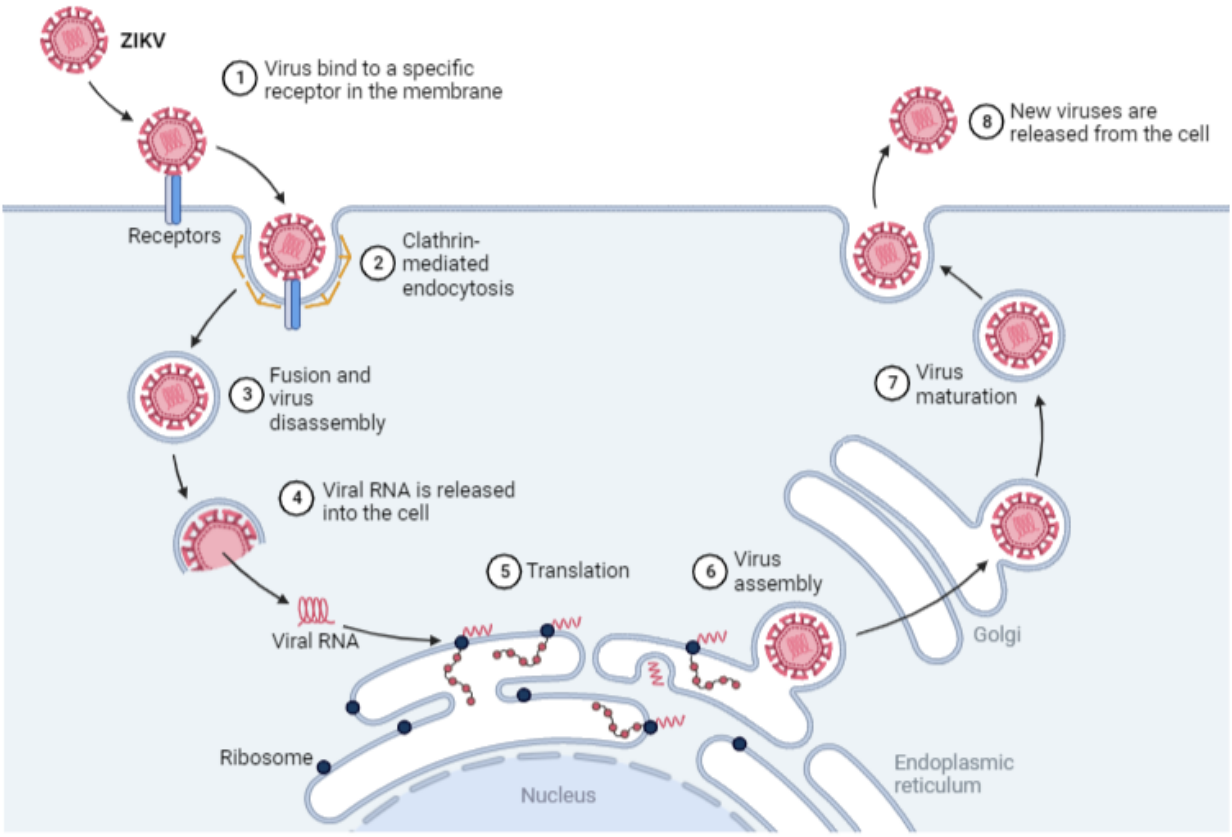



**Figura 2.** *Replicación del virus Zika en la célula diana. Fuente: Tomado de BioRender.com*

## *2.2. Patologías asociadas.*

La infección por el virus Zika se ha asociado a patologías severas debido a alteraciones congénitas. De acuerdo con esto se destaca en primera instancia el síndrome de Guillain-Barré en el que se presentan una serie de afecciones nerviosas que provocan la debilidad inicialmente en las extremidades inferiores y más adelante con pérdida de reflejos tendinosos profundos, desencadenando parálisis aguda (12)(13). Del mismo modo, estudios señalan que el momento justo en el que las células progenitoras neurales (NPCs) se auto renuevan, se diferencian y hacen una migración y maduración neuronal es primordial para el desarrollo normal del cerebro y cualquier alteración, ya sea mínima de estos procesos conduce a trastornos del desarrollo del cerebro. Es aquí donde se destaca la microcefalia, una enfermedad congénita caracterizada por la reducción del perímetro craneal del recién nacido. Lo anterior, se debe al tropismo del virus hacia el sistema

nervioso central, por lo cual se limita el crecimiento neuronal y por ende el neurodesarrollo. No obstante, además de este para de complicaciones, se evidencian otros hallazgos a nivel del complejo neurológico como: desproporción craneofacial, espasticidad generalizada, convulsiones, anormalidades oculares y auditivas.

En este orden de ideas, se determina una infección por vía transplacentaria y la posibilidad de que el virus Zika infecte a los trofoblastos Inter vellosos e ingrese en la circulación fetal (14)(15). Por otro lado, se destacan receptores de membrana presentes en las células huésped, especialmente en células neuronales y que son candidatos para la infección por ZIKV. Algunos estudios señalan que parte de las funciones de las proteínas no estructurales NS4A y NS4B es la inducción de autofagia en NPCs, de esta manera disminuye la actividad de la ruta de señalización intracelular PI3K/AKT/mTOR la cual interactúa con los mecanismos de control de obtención de energía celular y metabolismo de la glucosa, procesos fundamentales para la transcripción de genes, traducción de proteínas, metabolismo, crecimiento y proliferación celular (16).

### *2.3. Células SH-SY5Y.*

La línea celular SH-SY5Y son células adherentes derivadas de neuroblastoma humano, provenientes de metástasis en médula ósea y es una representación de un modelo de neuronas humanas inmaduras con capacidad de diferenciación neuronal que crece de forma adherente (17). Por otro lado, SH-SY5Y es una línea con actividad sobre dopamina-β-hidroxilasa y puede convertir el glutamato en el neurotransmisor GABA y probablemente es la línea celular humana más usada para la investigación en biología celular neuronal. Esta línea desde su morfología presenta cuerpos celulares poligonales con procesos cortos que se alejan de la morfología de una célula neuronal madura. Ahora bien, en cuanto a su proliferación, estas pueden iniciar como células bastante similares a los neuroblastos adherentes con diferencias significativas si se compara a las células epiteliales. Por lo anterior, estas células de coriocarcinoma se han utilizado ampliamente como modelo para la invasión fisiológica del trofoblasto a pesar de sus características tumorigénicas (18).

### *2.4. Niclosamida.*

La niclosamida es un fármaco antihelmíntico que pertenece al grupo de las benzanilidas, compuesto aromático que contiene un grupo anilina en el que el grupo carboxamida ha sido sustituido con un anillo de benceno (Figura 3). Su mecanismo de acción corresponde a un efecto anticestodal en el que se inhibe la fosforilación oxidativa y se estimula la actividad de la adenosina trifosfatasa en las mitocondrias. Ahora, en los últimos años, la niclosamida ha sido reconocida como un fármaco multifuncional a través del reposicionamiento de fármacos, debido a su capacidad para regular múltiples vías de señalización y procesos biológicos en los que se incluye: β-catenina, mTORC1, STAT3, NF-κB, Notch, interacción NS2B-NS3 y valores de pH entre 13 y 14. De esta forma, la niclosamida como fármaco antihelmíntico es capaz de inducir la degradación del receptor de andrógenos por medio de una vía mediada por proteínas. Del mismo modo, la niclosamida detiene la fosforilación y activación de STAT evitando que se evidencien los genes STAT3, por lo que se dice que este fármaco puede reducir e inhibir la progresión tumoral en modelos in vivo e in vitro (19) (20).

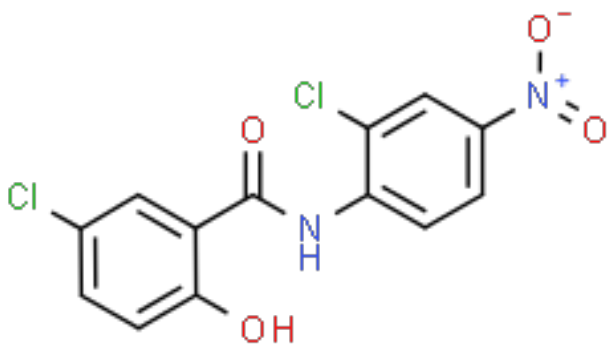



**Figura 3.** *Estructura del fármaco niclosamida.*
*Fuente: Tomado de chemspider.com*

La niclosamida fue aprobado por la FDA en el año 1985 sin ningún tipo de complicación asociado a citotoxicidad congénita, además es un fármaco seguro para mujeres embarazadas por lo que se categoriza en el grupo B según lo establecido por la FDA frente al riesgo para el feto. Se señala también, que este antihelmíntico durante varias décadas se empleó para tratar infecciones por Tenia y actualmente, aparece en la lista de medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud (20).

## *2.5. Reposicionamiento de fármacos.*

En el último año, el reposicionamiento de fármacos ha causado revuelo, considerándose una alternativa clave para mitigar la pandemia causada por el Covid-19, además surge como estrategia para dar solución a los problemas que conlleva la investigación y desarrollo de moléculas innovadoras. Se entiende al reposicionamiento como la identificación de nuevas indicaciones terapéuticas para fármacos aprobados y comercializados, y que actualmente se utilizan en un entorno clínico. De esta forma, la evidencia de datos previos permite omitir ciertos pasos, reduciendo los tiempos y los costos de manera significativa (21). De acuerdo con lo anterior, se plantea una visión general de esta nueva alternativa y se describe como paso inicial la identificación del compuesto potencial, posterior a ello, se evalúan los aspectos asociados a su adquisición; considerando patente, disponibilidad en el mercado o su obtención mediante síntesis química. Ahora, vale la pena mencionar que la posibilidad de pasar a un estadio preclínico o directamente a uno clínico dependerá de las indicaciones del fármaco.

# 3. Planteamiento del problema.

El desarrollo de vacunas y fármacos de síntesis química es un proceso tedioso que incluye períodos extensos de investigación y rubros elevados en materia de dinero, procesos en los que se busca demostrar por diferentes métodos la eficacia y seguridad de una vacuna. Para los investigadores, encontrar un tratamiento para la infección por ZIKV y más aún sobre los efectos que este conlleva se ha convertido en un desafío debido a los hallazgos clínicos acerca del efecto directo del virus sobre la placenta y las malformaciones presentes en el desarrollo fetal. Lo anterior, ciertamente dificulta el reto pues una vez se inicia el proceso de infección y se desarrollan anomalías neuronales no hay posibilidad de dar vuelta atrás (22).

En los últimos años, para el desarrollo de una vacuna contra ZIKV se han planteado algunos desafíos que incluyen la complejidad de transferencia de inmunidad desde la madre hacia el feto en desarrollo y el recién nacido, la dificultad de evaluar la eficiencia clínica cuando el 80% de las infecciones son asintomáticas, la necesidad de desarrollar de forma segura respuestas inmunitarias protectoras entre subgrupos de la población acogiendo adultos sanos, niños y mujeres embarazadas y por último, considerar que cada uno podría requerir diferentes niveles de inmunidad. Aun así, aunque investigadores de distintas partes del mundo suman sus esfuerzos para encontrar una solución y farmacéuticas como Inovio, PaxVax, Moderna, GlaxoSmithKline se encuentran en etapas preclínicas de investigación, actualmente no existe vacuna ni tratamiento específico para la infección por ZIKV, y la única manera de mitigar la problemática es mediante las estrategias de prevención que que propone la OPS, cuyo fin es la reducción de los vectores del virus. Estas medidas incluyen evitar conservar agua en recipientes ubicados al aire libre, el uso de repelente y el uso de mosquiteros en puertas y ventanas. Sin embargo, las cifras de contagio no desaparecen y año tras año se reportan casos de niños recién nacidos con defectos congénitos asociados a ZIKV, por lo que estas alternativas no son suficientes (5). Teniendo en cuenta lo anterior, se considera pertinente estudiar el reposicionamiento de fármacos como una alternativa para resolver los problemas que conlleva la investigación y desarrollo de moléculas innovadoras, para esto se propone evaluar en una línea celular asociada a la infección el potencial antiviral de la niclosamida, un fármaco antihelmíntico aprobado por la FDA para su uso en el tratamiento de la helmintiasis y que en la actualidad cuenta con evidencia que respalda su

efectividad contra diferentes infecciones virales como SARS CoV, Hepatitis C, virus Chikungunya y virus Epstein-Barr (23) (24) (25) (26).

# 4. Pregunta de investigación.

¿El tratamiento con el fármaco niclosamida induce cambios en la replicación viral en líneas celulares infectadas con el virus Zika?

# 5. Objetivos.

*5.1 Objetivo general.*

- Evaluar la actividad antiviral del fármaco antihelmíntico niclosamida sobre la replicación del virus Zika en línea celular neuronal SH-SY5Y.

*5.2 Objetivos específicos.*

- Determinar el efecto citotóxico de la niclosamida sobre la línea celular SH-SY5Y.
- Evaluar el efecto de la niclosamida sobre la replicación viral en la línea celular SH-SY5Y infectada con el virus Zika.

# 6. Metodología.

## *6.1. Cultivo celular.*

### *6.1.1. Células SH-SY5Y.*

Para establecer el modelo de infección in vitro con ZIKV se empleó la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y, esta línea se mantuvo inicialmente con DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplemento con SFB al 10% y gentamicina 25 µg/mL a 37 ºC con atmósfera de $CO_2$ al 5%. Ahora bien, para los nuevos subcultivos se trabajaron cajas T75 con 300 µL de suspensión celular y cajas T25 con 100 µL, teniendo en cuenta para ambos casos una densidad celular aproximada de 600.000 células/ mL.

## *6.2. Solubilización de la Niclosamida.*

Para tener disponible la solución de niclosamida se llevó a cabo el proceso de solubilización en tres solventes diferentes siguiendo los mismos pasos para los tres casos y teniendo en cuenta la solubilidad teórica del fármaco en cada uno de ellos: etanol, DMSO y PBS. Inicialmente, se preparó una solución estándar de niclosamida (10mM), para esto en un eppendorf de 1,5 mL se adicionaron 3,3 mg de Niclosamida en 1 mL del solvente. Luego, teniendo en cuenta los parámetros de estabilidad de la niclosamida; la estabilidad al calor, estabilidad a temperaturas de almacenamiento entre 15 y 30 grados y además que cuenta con una vida media de descomposición de 18 días a pH de 13, la solución se llevó a agitación a 1500 rpm durante 15 minutos a 37°C. Pasado el tiempo de agitación, sólo el etanol y el dimetilsulfóxido son capaces de solubilizar completamente el fármaco. Finalmente, se selecciona el dimetilsulfóxido por ser el solvente del que se tiene más información por ser utilizado en cultivos celulares como solvente de preferencia en otros proyectos. Por último, en un eppendorf de 1,5 mL se adicionaron 8 uL de la solución stock (10 mM) y se completó a 1 mL con medio de cultivo completo para la obtención de una solución 80 µM.

### *6.3. Ensayo de citotoxicidad de la niclosamida.*

Para evaluar la viabilidad de las células SH-SY5Y frente a la exposición a niclosamida, se llevó a cabo el ensayo de reducción de resazurina con nueve concentraciones del fármaco (0.039 µM, 0.078 µM, 0.156 µM, 0.312 µM, 0.625 µM, 1.5 µM, 2.5 µM, 5 µM y 10 µM) con periodos de incubación de 24h 48h y 72h. Para esto, las células fueron sembradas en placas de 92 pozos utilizando densidades celulares de 8.000 y 10.000 células SH-SY5Y/pozo para 24h y 48h, y 5.000 células SH-SY5Y/pozo para 72h. Posteriormente, se adicionó la solución de niclosamida en el rango de concentraciones seleccionado usando como control positivo de muerte celular DMSO 25%. Finalmente, el medio con el tratamiento se reemplazó por 100 µL de resazurina 44 µM, las placas se incubaron a 37 ºC con atmósfera de $CO_2$ al 5% y luego de 4 horas, la fluorescencia se cuantificó en un espectrofluorómetro TECAN Infinite M200 PRO a una longitud de onda de excitación de 530 nm y de emisión de 590 nm.

### *6.4. Infección celular y tratamiento con niclosamida.*

La infección de células SH-SY5Y se realizó con las cosechas EXP 10221 2019 P#5 y EXP 11778 2022 P#3 disponibles en el laboratorio de virología a un MOI de 1. Para establecer la dilución de virus a utilizar, inicialmente las células SH-SY5Y fueron sembradas en una placa de cultivo celular de 24 pozos a una densidad de 50.000 células SH-SY5Y/pozo. Al mismo tiempo, en siete eppendorf se adicionaron 500 µL de medio para infección (DMEM-Dulbecco's Modified Eagle's Medium suplemento con SFB al 2%) y se hicieron diluciones seriadas 1:2 (1/2, 1/4, 1/8,1/16, 1/32, 1/64, 1/128*)* dejando un pozo de control negativo para células no infectadas. Luego, a cada placa se retiró el medio de cultivo completo y se inoculó con las diluciones del virus incubando por 2 horas a 37 ºC con una atmósfera de $CO_2$ al 5%. Pasado el tiempo, se retiró el inóculo viral, se adicionó medio fresco suplementado con SFB al 2% incubando nuevamente a 37 ºC con una atmósfera de $CO_2$ al 5% por 24 horas adicionales. Por último, pasadas las 24 horas se trataron las células con tripsina 0,25% y EDTA 0.5 mM y se llevó a cabo la marcación celular para su posterior análisis por citometría de flujo, teniendo en cuenta que este ensayo se hace por duplicado.

Por otra parte, el tratamiento de las células infectadas con ZIKV se estableció en tres tiempos: 1 hora antes de la adición del inóculo viral, durante la infección y 4 horas después

de retirado el inóculo viral. Para el tratamiento con niclosamida se sembraron placas de 24 pozos a una densidad de 50.000 células /pozo, la infección de las células SH-SY5Y se realizó usando la dilución 1/2 de las cosechas EXP 11778 2022 P#3 y EXP 11818 2022 P#3 dejando un tiempo de inoculación de 2 horas y de infección de 24 horas. En este sentido, las concentraciones que se emplearon fueron las determinadas según los ensayos de citotoxicidad. Pasadas las 24 horas las células fueron marcadas inmediatamente para evaluar la infección celular por citometría de flujo.

### *6.5. Evaluación del porcentaje de infección celular por citometría de flujo.*

Las células se fijaron e impermeabilizaron con el Kit Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience) siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego se hizo el marcaje de la proteína E del virus al interior de la célula empleando 50 µL del anticuerpo 4G2 acoplado al fluorocromo Alexa Fluor 488, dejándolo en incubación a 4 ºC durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con 200 µL solución Perm/Wash 1X (BD Bioscience) y finalmente, se llevaron al citómetro de flujo BD Accuri C6 (BD Bioscience) para su analisis. El cálculo del porcentaje de infección celular se realizó empleando el software BD CSampler (BD Bioscience). Posterior a esto, el cálculo del porcentaje de reducción de infección se calculó de la siguiente manera:

$$\%Reducción\ de\ infección = \left(1 - \frac{porcentaje\ de\ células\ infectadas\ con\ tratamiento}{porcentaje\ de\ células\ infectadas\ sin\ tratamiento}\right) * 100$$

### *6.6. Pruebas estadísticas.*

Se realizó un análisis exploratorio de los datos de las variables con métodos gráficos y con medidas de tendencia central, de posición y de dispersión según la naturaleza cuantitativa de las variables. Se utilizaron métodos estadísticos paramétricos y no paramétricos, según su pertinencia y para variables cuantitativas, se evaluó la distribución de los datos. Las comparaciones entre grupos se realizaron con análisis de varianza (ANOVA), con análisis post-hoc para comparaciones múltiples con prueba de Tukey. Para otras variables, las comparaciones entre los grupos se realizaron con pruebas no paramétricas como kruskal wallis.

# 7. Resultados y análisis de resultados.

## *7.1. Cultivo celular.*

El uso de la línea celular SH-SY5Y se plantea como modelo de estudio por poseer características bioquímicas y funcionales de las neuronas que simulan las principales características de un modelo neuronal. Por otro lado, en literatura se describe que la línea celular SH-SY5Y tienen la capacidad de proliferar y mantenerse por largos periodos sin contaminación lo que facilita el cultivo celular. No obstante, durante el estudio se evidencia la influencia del medio de cultivo y sus condiciones en el crecimiento de las células, por esto se considera de vital importancia para el estudio imitar estrechamente las condiciones in vivo de los cultivos celulares para que mantengan sus características morfológicas y fisiológicas. Se denota un crecimiento acelerado cuando se emplea DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplemento con SFB al 10% y gentamicina 25 µg/mL y la disminución en el tiempo de replicación haciendo el cambio a DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Nutrient Mixture F-12) y SFB al 5%.

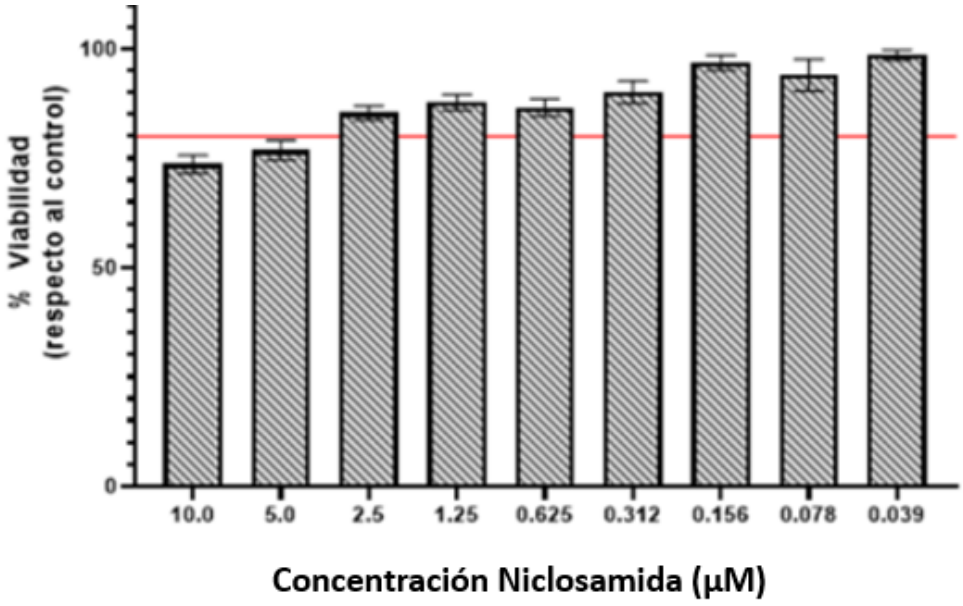
## *7.2. Ensayo de citotoxicidad de la niclosamida.*

Para evaluar el efecto de la niclosamida sobre la viabilidad de las células SH-SY5Y, los cultivos se someten a exposición a la niclosamida en tres tiempos diferentes; 24h, 48h y 72h con nueve concentraciones de niclosamida (0.039 µM, 0.078 µM, 0.156 µM, 0.312 µM, 0.625 µM, 1.5 µM, 2.5 µM, 5 µM y 10 µM). Además, se evalúan diferentes densidades celulares con el objetivo de determinar la mejor densidad celular para cada uno de los tiempos de exposición al fármaco. Inicialmente, al sembrar en placas de 92 pocillos 10.000 cel/pozo, se evidencia una confluencia del 80%, una confluencia alta, considerando que la actividad metabólica y el crecimiento exponencial de las células se puede afectar en confluencias altas, de allí la importancia de seleccionar una densidad en la que se garantice el crecimiento exponencial del cultivo durante todo el experimento.

En relación con lo anterior, cuando las células fueron sembradas a altas densidades celulares, se observó una mayor formación de cúmulos para los últimos dos tiempos de

exposición. Por esto, con el propósito de no obtener resultados falsos positivos de porcentajes mínimos de viabilidad como consecuencia de la muerte celular por sobrecrecimiento de los cultivos y además considerando el tiempo de replicación de 27 horas reportado en literatura (27), se plantea una densidad celular de 8.000 y 5.000 cel/pozo para 48 y 72 horas respectivamente.

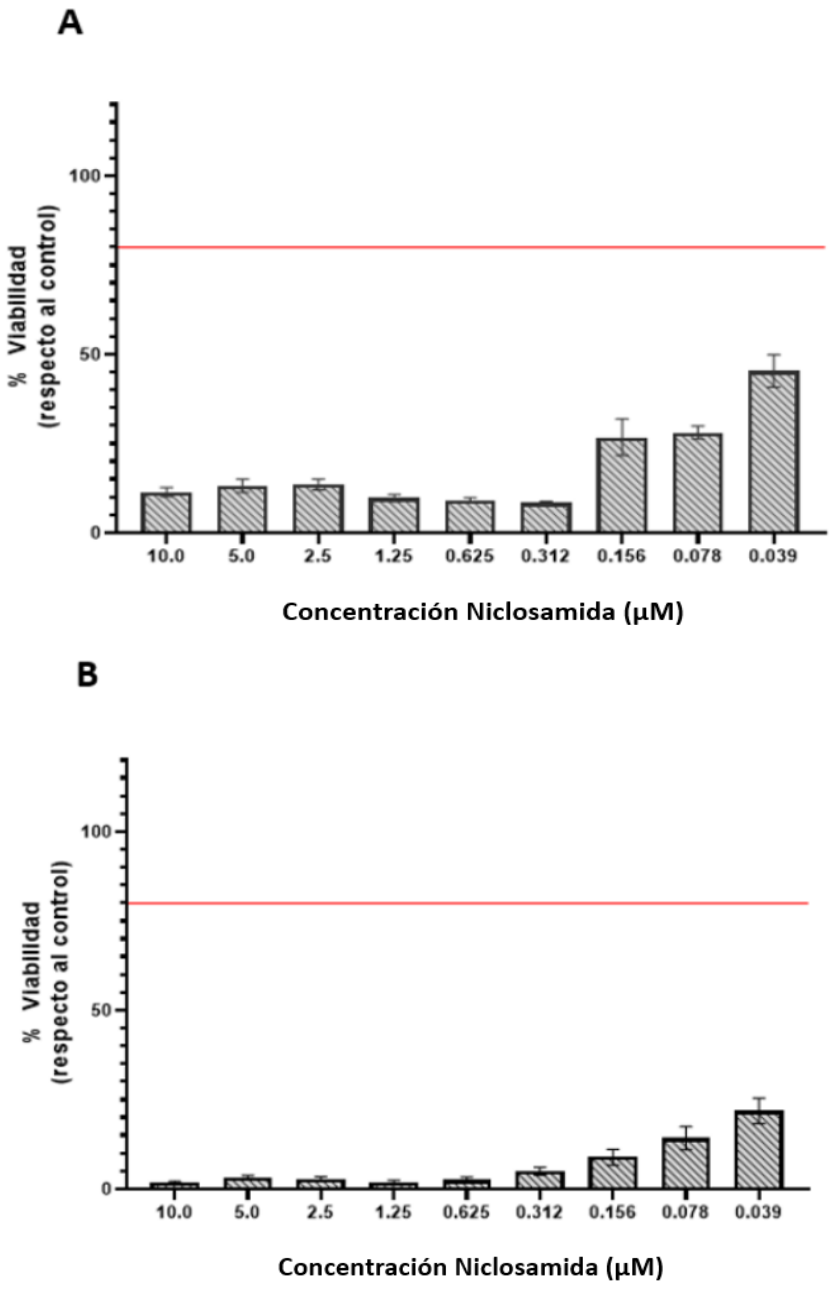
Ahora bien, teniendo en cuenta los resultados evidenciados a las 24 horas, 6 de las concentraciones (0.039 µM, 0.078 µM, 0.156 µM, 0.312 µM, 0.625 µM, 1.5 µM y 2.5 µM) presentan porcentajes de viabilidad superiores al 80% y las únicas concentraciones que presentan viabilidades inferiores (<80%) son 5 µM y 10 µM *(***Gráfica 1**).




**Gráfica 1.** *Evaluación de la citotoxicidad de la niclosamida en células SH-SY5Y a 24 horas. Las células fueron tratadas por 24 horas con 9 concentraciones de niclosamida (0.039 µM, 0.078 µM, 0.156 µM, 0.312 µM, 0.625 µM, 1.5 µM, 2.5 µM, 5 µM y 10 µM)*

Por otro lado, se denota que la viabilidad celular respecto al control disminuye a medida que el tiempo de exposición aumenta. En este sentido, a las 48 y 72 horas de exposición en ninguna de las concentraciones de niclosamida se evidencian porcentajes de viabilidad mayores al 80% por lo que estos dos tiempos de tratamiento se descartan definitivamente (Gráfica 2A y 2B). No obstante, se considera pertinente evaluar en futuros estudios rangos

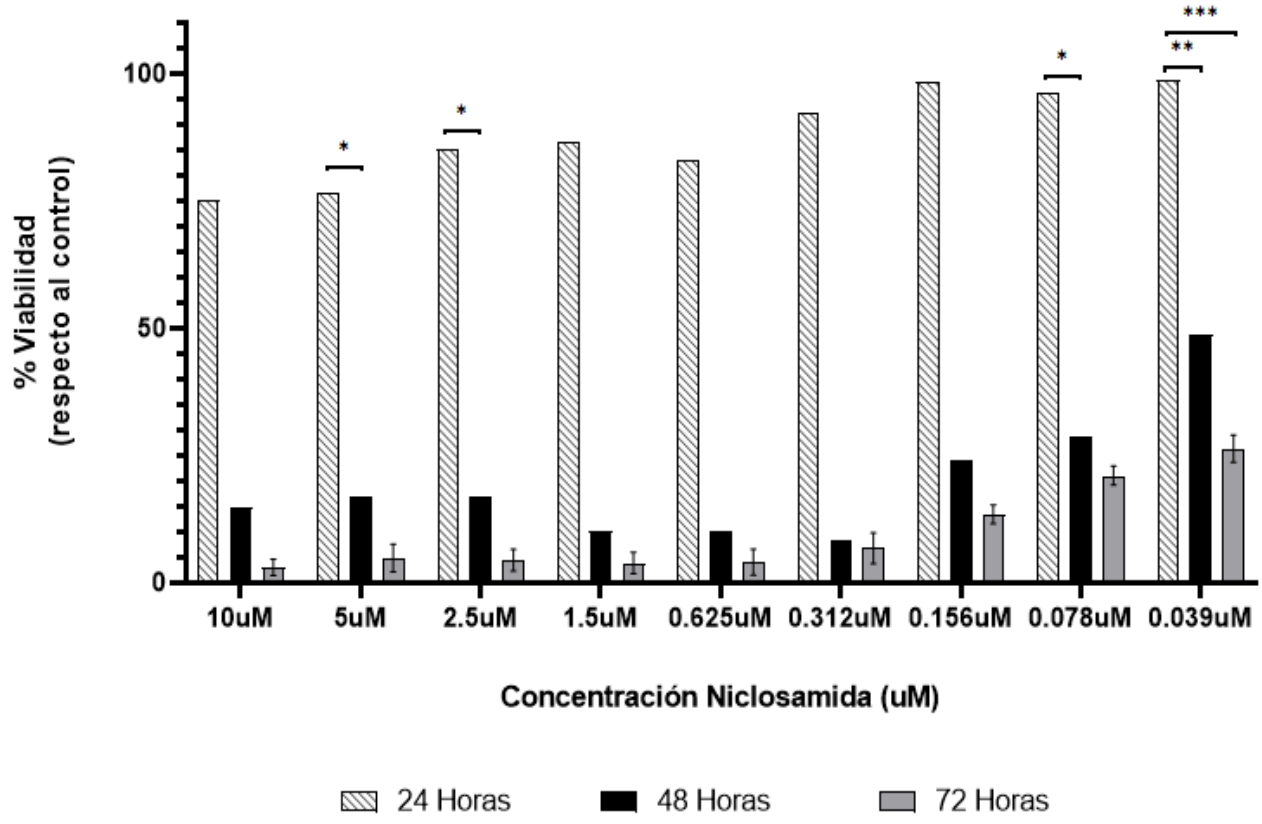
de concentraciones de niclosamida inferiores a los empleados en este trabajo con el objetivo de explorar tiempos de tratamiento mayores a 24 horas.




**Gráfica 2.** *Evaluación de la citotoxicidad de la niclosamida en células SH-SY5Y.* ***A****. Las células fueron tratadas por 48 horas con 9 concentraciones de niclosamida (0.039 µM, 0.078 µM, 0.156 µM, 0.312 µM, 0.625 µM, 1.5 µM, 2.5 µM, 5 µM y 10 µM)* ***B.*** *Las células*

*fueron tratadas por 72 horas con 9 concentraciones de niclosamida (0.039 µM, 0.078 µM, 0.156 µM, 0.312 µM, 0.625 µM, 1.5 µM, 2.5 µM, 5 µM y 10 µM)*

En los tres tiempos evaluados es posible observar que a medida que la concentración de niclosamida aumenta la viabilidad celular disminuye, demostrando una relación inversamente proporcional entre los dos parámetros. A partir de aquí, los resultados del estudio indican que el efecto de la niclosamida es dependiente de la dosis. Del mismo modo, luego de hacer la comparación de resultados de exposición a niclosamida a 24, 48 y 72 horas, se considera que el tiempo adecuado para hacer el tratamiento sin afectar la viabilidad de las células por la exposición al fármaco es 24 horas (Gráfica 3). En el estudio de Miao-Xu (2016), la viabilidad celular se mide por medio de la actividad de caspasa 3, aun así, es posible equiparar los estudios, pues en la cuantificación del porcentaje de viabilidad de astrocitos se demostró una toxicidad mínima a la niclosamida con niveles inferiores a 3µM al igual que en el presente estudio (26-28).



***Gráfica 3.*** *Comparación de la viabilidad celular en línea SH-SY5Y a 24, 48 y 72 horas de exposición a niclosamida (0.039 µM, 0.078 µM, 0.156 µM, 0.312 µM, 0.625 µM, 1.5 µM, 2.5 µM, 5 µM y 10 µM). Pruebas estadísticas de Tukey muestran diferencias estadísticamente significativas (* P≤0.05; ** P≤0.01).*

Durante la exposición de las células al tratamiento, se observaron cambios morfológicos significativos. La morfología de las células SH-SY5Y es característica por su similitud a un fenotipo epitelial con cuerpos en forma piramidal y con pocas proyecciones hacia el exterior del cuerpo (27). Al realizar el analisis al microscopio luego de 24 de exposición al fármaco y teniendo en cuenta que los pozos tenían una confluencia del 85-90%, es posible evidenciar que para la menor concentración (0.039 µM) las células se asemejan al control positivo sin ningún cambio en su morfología (Figura 4A y 4B). En cambio, en la concentración más alta de niclosamida (10 µM) se ve afectada la morfología y replicación de las células. En este sentido, luego de 24 horas para las concentraciones más altas de niclosamida es posible evidenciar la pérdida de su morfología poligonal característica, el aumento en el número de cúmulos y pérdida de gran cantidad de células (Figura 4C).

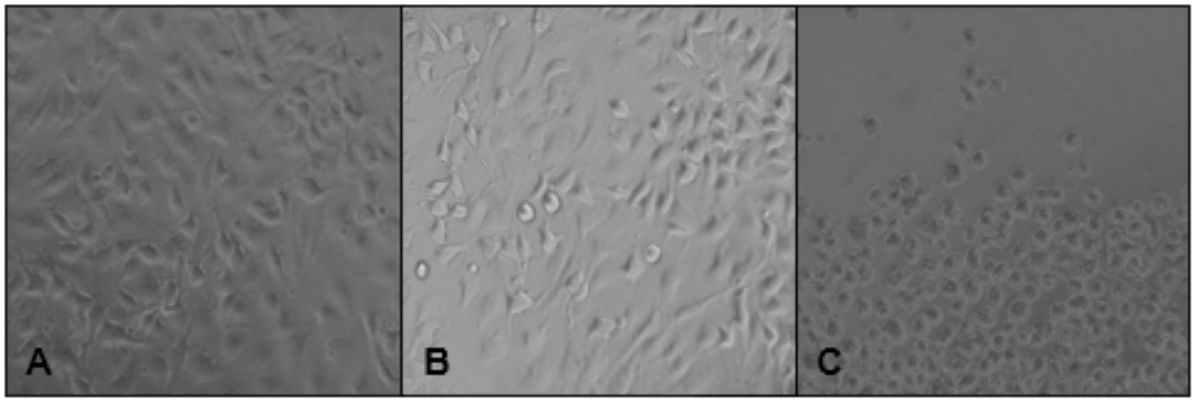



**Figura 4.** *Citotoxicidad en células SH-SY5Y.* ***A.*** *células sin tratamiento.* ***B.*** *Células en tratamiento con niclosamida 0,039* µM. **C.** *Células en tratamiento con niclosamida 10* µM.

### *7.3. Infección y tratamiento con niclosamida - Evaluación del porcentaje de infección celular por citometría de flujo.*

Para llevar a cabo la infección con ZIKV se hizo análisis por medio de citometría de flujo, uno de los métodos que ofrece como ventaja el analisis unicelular, midiendo el nivel de

fluorescencia de las moléculas individualmente a diferencia de otros métodos en los que la fluorescencia se mide promediando los resultados de todas las células (29). Inicialmente, se estableció una densidad celular de 50.000 cel/pozo con el fin de propiciar una confluencia adecuada en placa de 24 pozos para mantener la viabilidad celular durante el tratamiento y evidenciar completamente el efecto de la infección y tratamiento sobre las células. Durante la replicación viral de un proceso de infección normal se presentan efectos citopáticos como cambios bioquímicos y morfológicos (30). Teniendo en cuenta lo anterior, es importante mencionar que luego de retirar el inóculo se observó cambios en la morfología de las células en las que se denota la desaparición de uniones ocluyentes, dejando como evidencia pequeños espacios vacíos a confluencias del 90% (No se tiene evidencia fotográfica).

El virus se evaluó en siete diluciones seriadas 2:1 con medio de infección. A partir de esto, se observa que a medida que aumentan las diluciones disminuye el porcentaje de infección, evidenciando el mayor porcentaje de infección para la dilución 1/2 correspondiente al 16.3% de células infectadas (Figura 5). Ahora bien, en la segunda réplica se evidencian porcentajes de infección menores a la primera repetición, dando como resultado 1.4% como máximo porcentaje de infección. A partir de aquí, y teniendo en cuenta que las condiciones de infección en los subcultivos se mantienen y lo único que cambia es la cepa del virus, se plantea la hipótesis de que la cosecha viral tenga influencia sobre las diferencias en los porcentajes de infección en las réplicas del ensayo debido a la virulencia en las cepas del virus. Lo anterior, se explica en diversos estudios que sugieren la existencia de determinantes genéticos de virulencia, asociados además a cambios fenotípicos in vitro en cepas de DENV-2 (31).

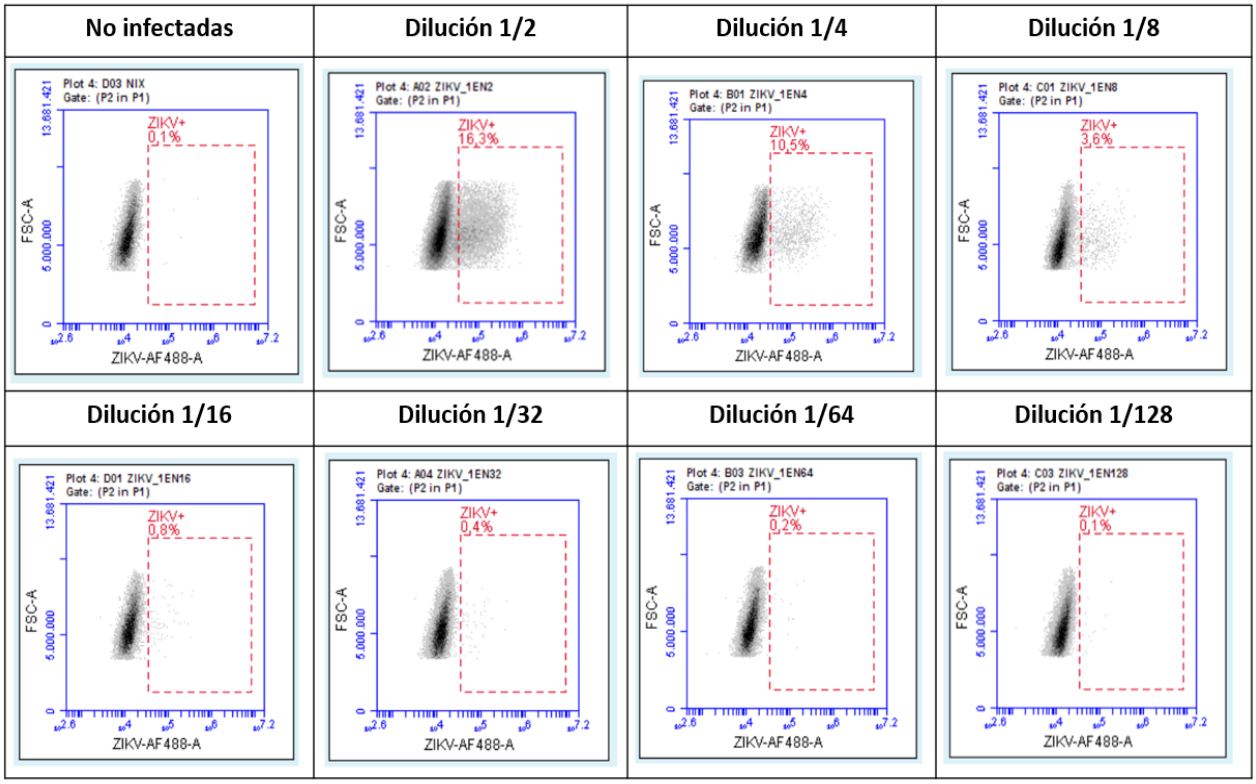



**Figura 5.** *Resultados representativos de Infección celular de SH-SY5Y con ZIKV (Primera réplica). Comparación de porcentajes de infección por citometría de flujo en 7 diluciones seriadas 1:2 (1/2, 1/4, 1/8,1/16, 1/32, 1/64, 1/128).*

Teniendo en cuenta la sensibilidad de las células por la exposición al fármaco y los porcentajes de viabilidad celular obtenidos en el ensayo de citotoxicidad, se determinó un tiempo total de exposición al fármaco de 24 horas. En literatura se ha descrito el tratamiento en diferentes tiempos, para ello se planteó el esquema de tratamiento en tres momentos; tratamiento pre-infección con niclosamida 4 horas antes de la inserción del inóculo, durante el periodo de inoculación y cuatro horas después de retirarlo. Ahora bien, considerando el ensayo de citotoxicidad en el que las concentraciones más altas 5 µM y 10 µM resultaban citotóxicas para las células, analizaron seis concentraciones (0.039 µM, 0.078 µM, 0.156 µM, 0.312 µM, 0.625 µM y 1.5 µM).

A pesar de que la disminución del porcentaje de infección no sigue una tendencia para las concentraciones más bajas de niclosamida, los ensayos demuestran que es posible reducir el porcentaje de infección en diferentes proporciones con todo el rango de concentraciones evaluadas en este estudio (Figura 6, 7 y 8). Cuando se hace una comparación con el pozo

control de células infectadas sin tratamiento se evidencia para los tres escenarios una disminución en el porcentaje de infección. No obstante, la disminución que alcanza un valor cercano al 80% corresponde al pretratamiento con la concentración más alta de niclosamida (*1.5 µM).*

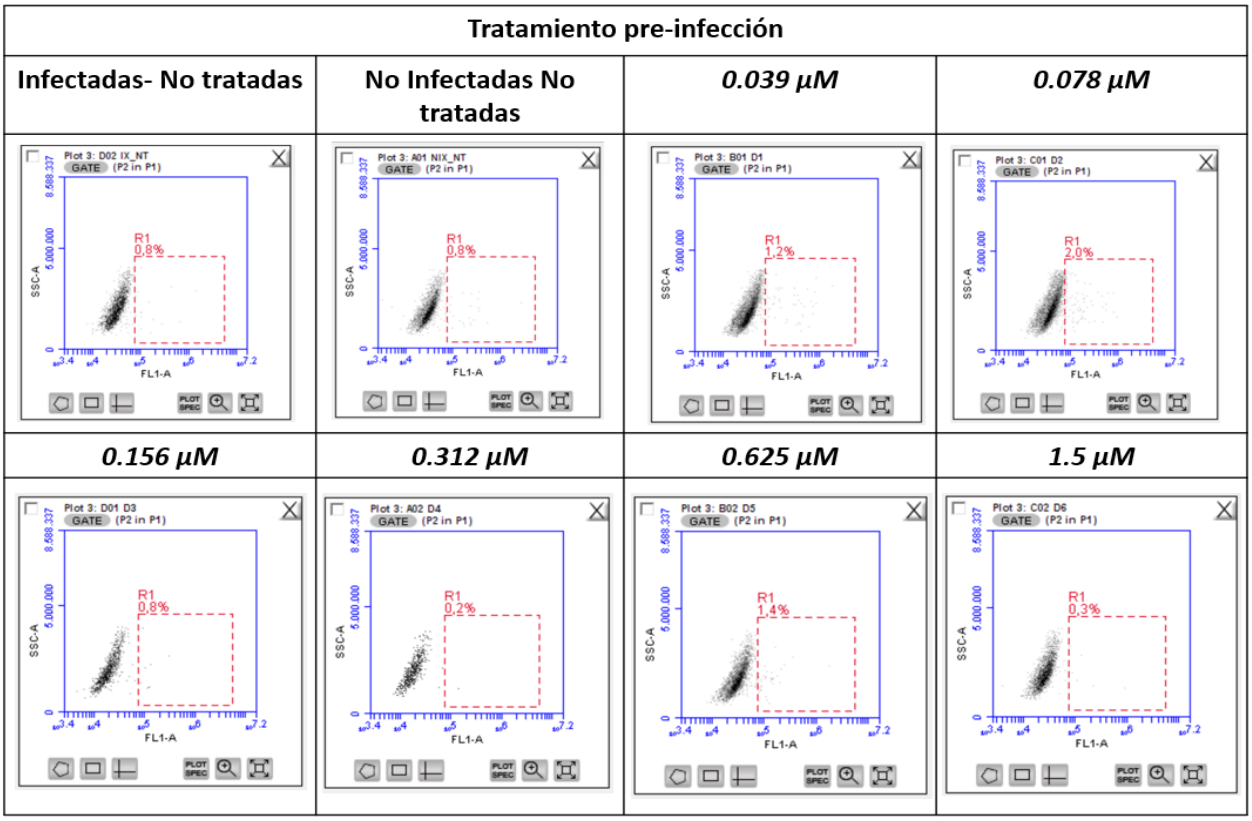



**Figura 6.** *Resultados representativos de tratamiento pre-infección con niclosamida a diferentes concentraciones (0.039 µM, 0.078 µM, 0.156 µM, 0.312 µM, 0.625 µM y 1.5 µM) Infección celular de SH-SY5Y con ZIKV dilución 1/2.*

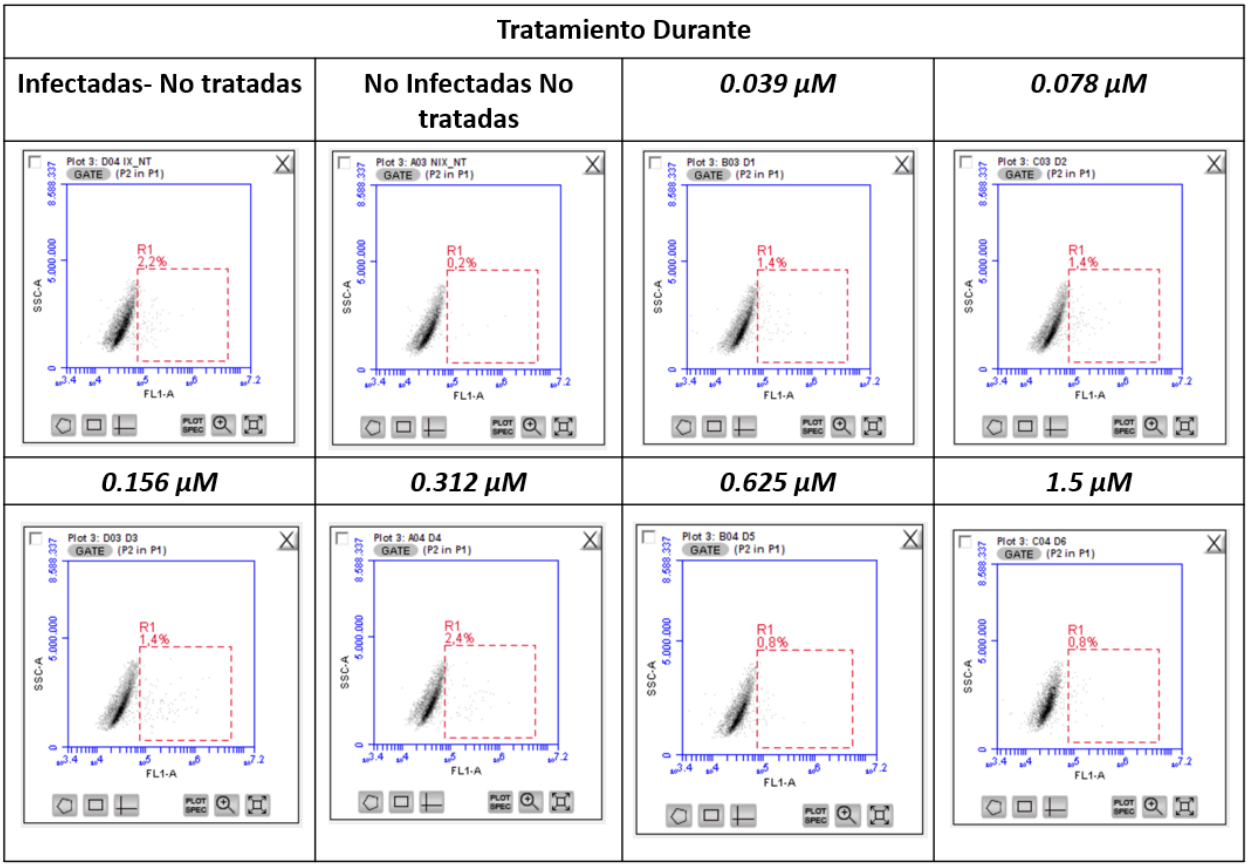



**Figura 7.** *Resultados representativos de tratamiento con niclosamida durante la infección, se emplea tratamiento con niclosamida a diferentes concentraciones (0.039 µM, 0.078 µM, 0.156 µM, 0.312 µM, 0.625 µM y 1.5 µM). Infección celular de SH-SY5Y con ZIKV dilución 1/2.*

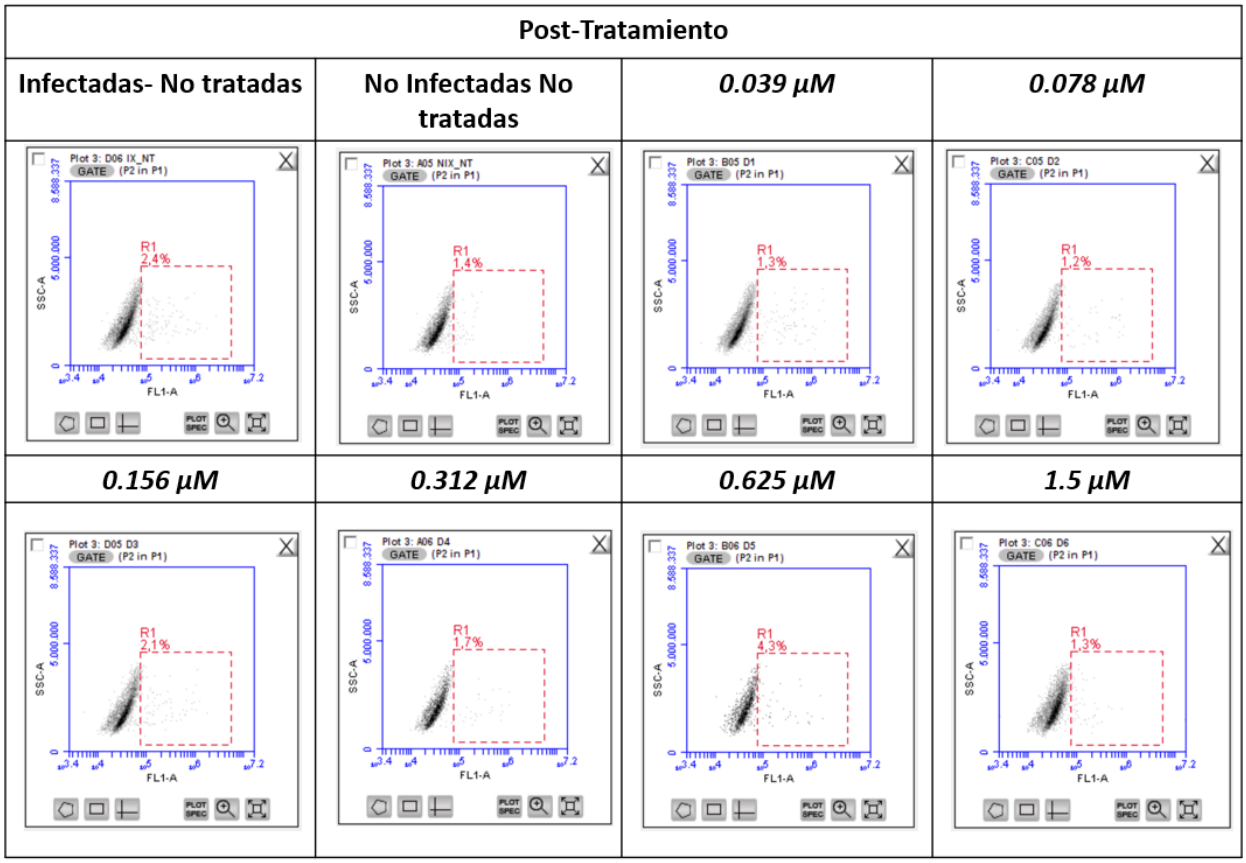
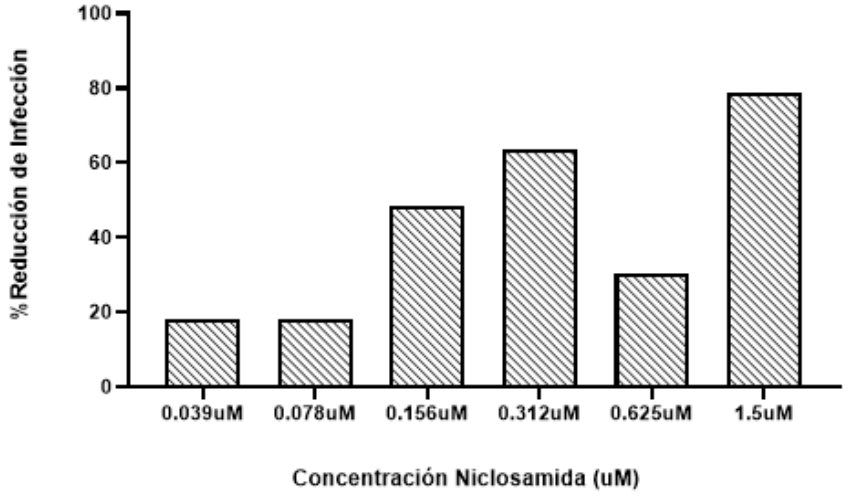



**Figura 8.** *Resultados representativos de tratamiento post-infección con niclosamida a diferentes concentraciones (0.039 µM, 0.078 µM, 0.156 µM, 0.312 µM, 0.625 µM y 1.5 µM). Infección celular de SH-SY5Y con ZIKV dilución 1/2.*

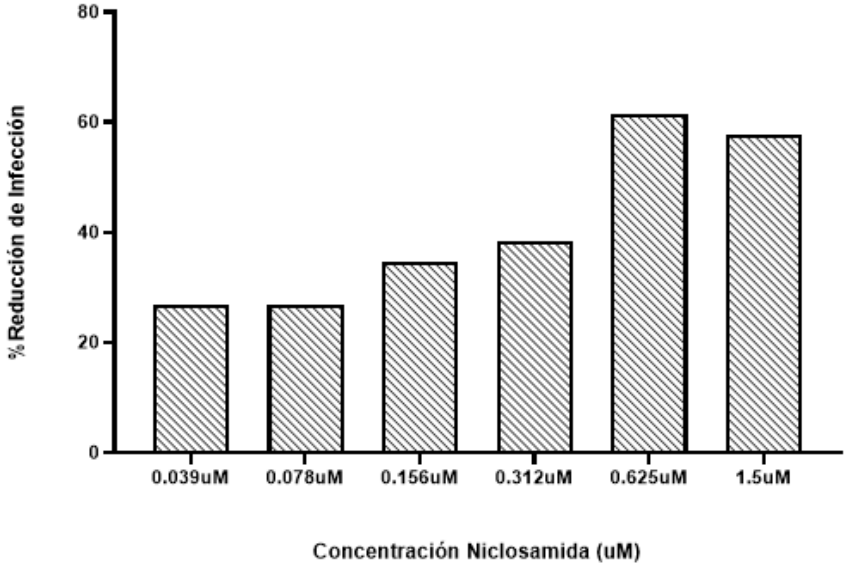
En este caso específico, la niclosamida cuenta con evidencia preclínica acerca de su actividad antiviral para diferentes arbovirus. Ha sido asociada al manejo clínico del grupo de virus de ARN conocido como coronavirus y actualmente, se ha estudiado su actividad antiviral contra ZIKV, CHIKV y Hepatitis. Por otro lado, se han hecho diferentes aproximaciones al mecanismo de acción a través de la modulación de procesos moleculares de la célula huésped, pues al ser un ácido débil portador de protones es posible que suprima la entrada del virus mediante la acidificación de los compartimentos Endo-lisosomales (32).

Ahora bien, en la figura 5 y 6 se denota un porcentaje de reducción de infección menor al 50% en el tratamiento que se hace durante la inserción del inoculo y el post tratamiento para las concentraciones de 0.039 µM, 0.078 µM, 0.156 µM, 0.312 µM. Todo lo contrario ocurre en el tratamiento pre-infección donde las concentraciones de 0.312 µM y 0.625 µM demuestran porcentajes de reducción superiores al 50%, sin dejar de lado las variaciones

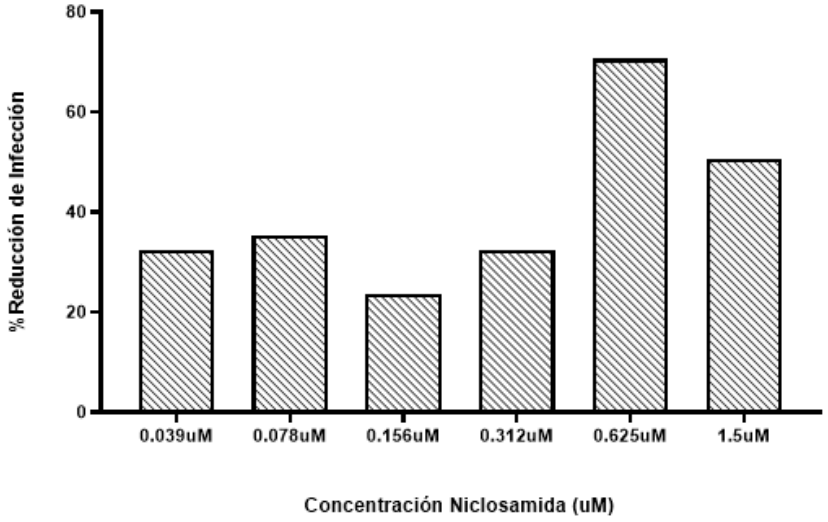
en los resultados de la concentración de 0.625 µM, pues al ser una concentración debería demostrarse un mayor porcentaje de reducción infección y por el contrario, este se ve disminuido.




**Gráfica 4.** *Reducción del porcentaje de infección con ZIKAV por tratamiento con niclosamida. Porcentaje de reducción en la infección con dilución ½ de ZIKV en células SH-SY5Y luego de tratamiento pre-infección con niclosamida (0.039 µM, 0.078 µM, 0.156 µM, 0.312 µM, 0.625 µM y 1.5 µM). El cálculo del porcentaje de reducción de la infección se realizó como se describe en la sección de métodos.*

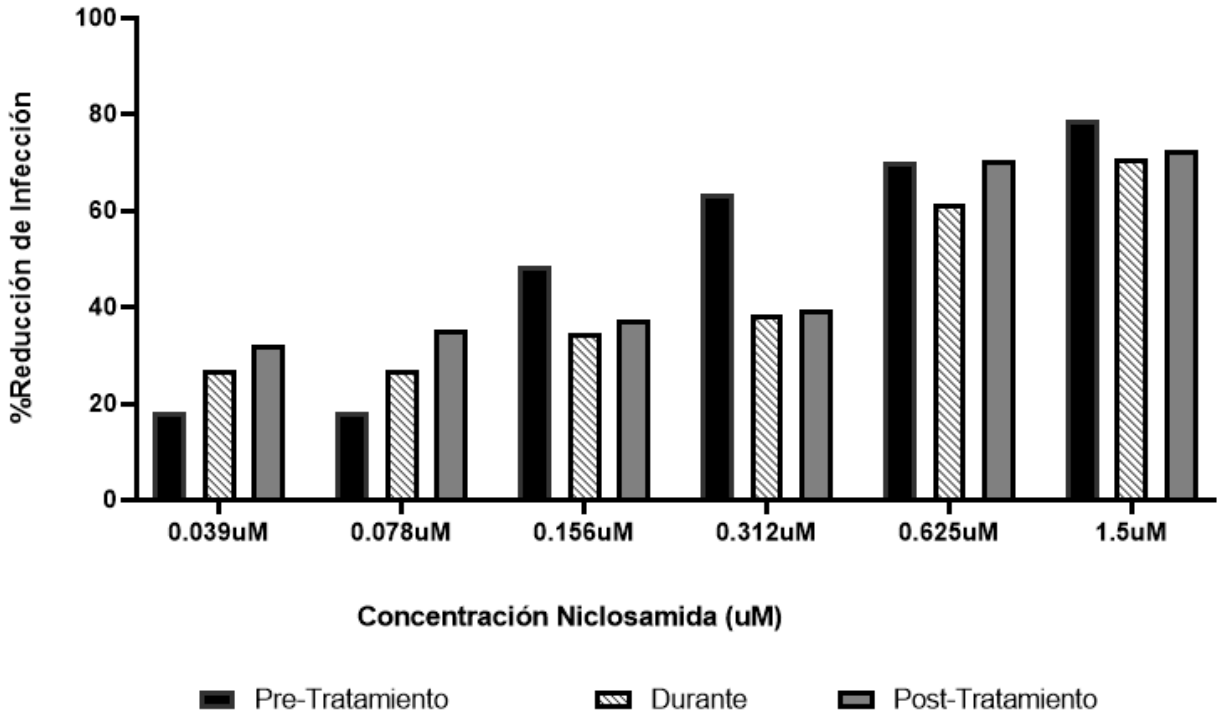


**Gráfica 5.** *Reducción del porcentaje de infección con ZIKAV por tratamiento con niclosamida. Porcentaje de reducción en la infección con dilución ½ de ZIKV en células SH-SY5Y luego de tratamiento con niclosamida a diferentes concentraciones durante la inoculación del virus (0.039 µM, 0.078 µM, 0.156 µM, 0.312 µM, 0.625 µM y 1.5 µM). El cálculo del porcentaje de reducción de la infección se realizó como se describe en la sección de métodos.*




**Gráfica 6.** *Reducción del porcentaje de infección con ZIKAV por tratamiento con niclosamida. Porcentaje de reducción en la infección con dilución ½ de ZIKV en células SH-SY5Y luego de tratamiento post infección con niclosamida a diferentes concentraciones (0.039 µM, 0.078 µM, 0.156 µM, 0.312 µM, 0.625 µM y 1.5 µM). El cálculo del porcentaje de reducción de la infección se realizó como se describe en la sección de métodos.*

En el estudio de Miao-Xu (2016), se observa una reducción porcentaje de infección luego del tratamiento con niclosamida, relacionando el tratamiento posterior a la inoculación del virus como la fase de entrada y 4 horas posteriores como la fase de replicación del ciclo de infección (33). En este sentido, podría decirse que los resultados obtenidos en este estudio apuntan a una disminución efectiva del porcentaje de infección por encima del 50% cuando se hace pretratamiento de las células a altas concentraciones (*0.312 µM, 0.625 µM y 1.5 µM*) (Gráfica 7).




**Gráfica 7.** *Comparación de porcentaje de reducción en la infección con dilución ½ de ZIKV en células SH-SY5Y luego de tratamiento pre-infección, durante y post infección. Tratamiento con niclosamida a diferentes concentraciones (0.039 µM, 0.078 µM, 0.156 µM, 0.312 µM, 0.625 µM y 1.5 µM). El cálculo del porcentaje de reducción de la infección se realizó como se describe en la sección de métodos.*

Analizando el efecto biológico real del proceso de infección, la citometría de flujo brinda resultados indirectos de la replicación viral equiparando la cuantificación del porcentaje de células infectadas con la cantidad de virus producido. Aunque, en in primer momento se planteó la cuantificación del genoma viral como medida directa del efecto de la niclosamida sobre la replicación del virus, se esperaría que exista una reducción en el porcentaje de células que se infectan debido a una reducción en la cantidad de virus que se produce bajo el efecto de la niclosamida.

Finalmente, es importante mencionar que en literatura hasta el momento no se han reportado estudios del efecto antiviral de la niclosamida en líneas celulares SH-SY5Y infectadas con ZIKV. Por esto, considerando los resultados obtenidos es posible definir las condiciones experimentales óptimas para llevar a cabo el estudio manteniendo los mayores porcentajes de viabilidad celular. Desde una perspectiva más general, la niclosamida tiene gran potencial

para ser reposicionada en el tratamiento de múltiples infecciones virales, tratándose de un inhibidor de amplio espectro contra flavivirus incluyendo el virus del Zika. En este sentido, gracias a la recopilación de evidencia previa y a los ensayos realizados en este estudio es posible aportar nueva evidencia de la seguridad y el beneficio de usar este fármaco para futuras aplicaciones terapéuticas.

# 8. Conclusiones.

La niclosamida por su evidencia científica y su comportamiento en este estudio, ha demostrado tener efecto en la reducción de los porcentajes de infección por ZIKV. Sin duda alguna, es necesario ampliar los parámetros de evaluación con la implementación de nuevas líneas celulares, explorar nuevas condiciones de infección asegurando porcentajes de infección equiparables durante todo el estudio y finalmente, la evaluación de nuevas concentraciones que permitan moverse en un rango amplio de tiempos de tratamiento.

El tratamiento con niclosamida fue efectivo en la reducción del porcentaje de infección en la línea celular SH-SY5Y infectada con ZIKV en tres escenarios de tratamiento diferentes. De esta manera, se demostró una mayor reducción cuando se hace tratamiento pre-infección con concentraciones de niclosamida superiores a *0.625 µM.* Como complemento al estudio, sería pertinente profundizar en la evaluación del mecanismo de acción de la niclosamida teniendo en cuenta las características propias de la línea celular trabajada.

Por último, se plantea la hipótesis de que la cosecha del virus y la cepa utilizada puede tener influencia en los porcentajes de infección obtenidos al momento de evaluar el ensayo de infección celular.

# 9. Recomendaciones.

1. Se considera pertinente evaluar en otros estudios el mecanismo de acción por el cual la niclosamida es capaz de reducir e inhibir las copias virales de ZIKV.

2. En cuanto al diseño experimental se recomienda evaluar rangos de concentraciones de niclosamida inferiores a los trabajados en este estudio con el fin de considerar tiempos de tratamiento mayores a 24 horas.

3. Se recomienda evaluar y hacer una confirmación de la influencia de la cosecha de virus sobre el porcentaje de infección y al mismo tiempo evaluar inóculos virales con títulos más altos. De esta manera, es posible confirmar las variaciones en los porcentajes de infección previo al tratamiento con niclosamida.

4. En cuanto al análisis de datos, se considera pertinente aumentar el número de réplicas para dar mayor fuerza estadística entre los grupos de datos y de esta forma, considerar otras alternativas de análisis más robustas en las que el tamaño de muestra es una limitante.

5. Se considera necesario hacer la cuantificación del numero de copias virales de ZIKV luego del tratamiento con niclosamida, con el fin de hacer una medición directa sobre la replicación del virus.

# 10. Referencias bibliográficas.


1. Pan American Health Organization. Zika [Internet]. 2018 [Consultado ]. Disponible en: https://www.paho.org/es/temas/zika

2. Pan American Health Organization, World Health Organization. Zika - Epidemiological Report Brazil. Washington, D.C.: PAHO/WHO; 2017 [Consultado ]. Disponible en: https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2017-phe-zika-situation-report-bra.pdf

3. Quanquin N, Adachi K, Nielsen-Saines K. Virus Zika. Academic Press. 2020; Cap 13: 289-319.

4. Gomez L A, Montoya G, Rivera H M, Hernandez J C. Características de la estructura molecular de las proteínas E del virus del Zika y E1 del virus de la rubéola y posibles implicaciones en el neurotropismo y en las alteraciones del sistema nervioso. Biomédica. 2017; 121-132(1).

5. Organización Mundial de la Salud. Enfermedad por el virus de Zika [Internet]. 2018 [Consultado ]. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus

6. Pan American Health Organization, World Health Organization. Zika - Epidemiological Report Colombia. Washington, D.C. : PAHO/WHO; 2017 [Consultado ]. Disponible en: https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2017-phe-zika-situation-report-col.pdf

7. Kostyuchenko V, Zhang E, Fibriansah G, Thiam-Seng Ng , Shi J, Mei Lok S. Estructura del virus Zika térmicamente estable. Nature. 2016; (533) 425–428.

8. Li W, Hofer MJ, Songkhunawej P, Jung SR, Hancock D, Denyer G, Campbell IL. Type I interferon-regulated gene expression and signaling in murine mixed glial cells lacking signal transducers and activators of transcription 1 or 2 or interferon regulatory factor 9. Biol Chem. 2017; 292(14): 5845-5859.

**9.** Quek JP, Ser Z, Chew BLA, Li X, Wang L, Sobota RM, Luo D, Phoo WW. Dynamic Interactions of Post Cleaved NS2B Cofactor and NS3 Protease Identified by Integrative Structural Approaches. Viruses. 2022; 14(7): 1440.

**10.** Grant A, Ponia SS, Tripathi S, Balasubramaniam V, Miorin L, Sourisseau M, Schwarz MC, Sanchez-Seco MP, Evans MJ, Best SM. El virus del Zika se dirige a la STAT2 humana para inhibir la señalización del interferón tipo I. Microbio huésped celular. JBC. 2016; (19) 882–890.

**11.** Lozada Lay K. Estudio de la interacción del virus del Zika con proteínas de membrana celular. [Tesis], Puebla, Puebla; Universidad Autónoma de Puebla. 2019.

**12.** Orantes L, Cerda Méndez C I, Jiménez R, Garma A N, López Y, Flores L S, Aguilar A, Rosas L, Gutiérrez J. Síndrome de Guillain-Barré asociado a los brotes de Zika, de Brasil a México. Neurología Argentina. 2020; 3(12): 147-152.

**13.** Uncini A, González Bravo DC, Acosta Y. Características clínicas y de conducción nerviosa en el síndrome de Guillain-Barré asociado a la infección por el virus del Zika en Cúcuta, Colombia. EUR. J. Neurol. 2018; 644 - 650.

**14.** Miner J, Cao B, Govero J. La infección por el virus del Zika durante el embarazo en ratones causa daño placentario y muerte fetal. Métricas PlumX. 2016; (165): 1081-1091.

**15.** Li C, Xu D, Shi L, et al. El virus del Zika interrumpe el desarrollo de los progenitores neuronales y provoca microcefalia en ratones. Métricas PlumX. 2016; (19): 120-126, 2016.

**16.** Pinzón CE, Serrano ML, Sanabria MC. Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos. Rev. Cienc. Salud. 2009 [Internet]. agosto de 2009; 7(2): 47-66.

**17.** Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS. Síntesis de múltiples neurotransmisores por clones y líneas celulares de neuroblastoma humano. Cáncer Res. 1978; (38): 3751–3757.

**18.** Murphy NP, Ball SG, Vaughan PF. Potassium- and carbachol-evoked release of

[3H] noradrenaline from human neuroblastoma cells, SH-SY5Y. J Neurochem. 1991; 56(5): 1810–1815.

**19.** Ortega O, Mendez A, Garzón R. Activación de STAT3 por hipoxia en modelos in vitro de cáncer de cuello uterino y en células endoteliales. Biomédica. 2017; (37): 119-130.

**20.** Fan Z, Cui H, Xu X, Lin Z, Zhang X, Kang L, et al. MiR-125a suppresses tumor growth, invasion and metastasis in cervical cancer by targeting STAT3. Oncotarget. 2015; (6): 25266-80.

**21.** S. Gonzalez, F. Medina. Nuevos usos a medicamentos existentes: el reposicionamiento de fármacos y su importancia en crisis sanitarias. Entorno UDLAP. 2020; (14).

**22.** Bhagat R, Kaur G, Seth P. Molecular mechanisms of zika virus pathogenesis: An update. Indian J Med Res. 2021;154(3): 433-445

**23.** C. Wu, J. Jan, T. Chen, et al, "Inhibition of severe acute respiratory syndrome coronavirus replication by niclosamide", Antimicrob, Agents Chemother. 2004; Vol. 48, pp. 2693−2696.

**24.** A. Stachulski, V. Pidathala, C. Row, et al, "Thiazolides as novel antiviral agents Inhibition of hepatitis C virus replication", Med. Chem. 2011; Vol. 54, pp. 8670−8680.

**25.** Y. Wang, M. Lu, W. Lin, C. Chin, et al, "Antiviral activities of niclosamide and nitazoxanide against chikungunya virus entry and transmission", Antiviral Res. 2016; Vol. 135, pp. 81− 90.

**26.** L. Huang, M. Yang, Y. Yuan, et al, "Niclosamide inhibits lytic replication of Epstein-Barr virus by disrupting mTOR activation", Antiviral Res, Vol. 138, pp. 68− 78, 2017.

**27.** Kovalevich J, Langford D. Consideraions for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. Methods Mol Biol. 2013; (1078): 9-21.

**28.** Xu M, Lee E et al. Identification of small-molecule inhibitors of Zika virus infection

and induced neural cell death via a drug repurposing screen. Nat Med. 2016; 22(10): 1101-1107

**29.** Babetta L. Marrone. Flow Cytometry: A Multipurpose Technology for a Wide Spectrum of Global Biosecurity Applications. SLAS Technology. 2009; (14): 148-156.

**30.** Galán F, Fernández C, Rodríguez M. Infecciones víricas. Medicine Madr. 2014; 11(49); 2885-289.

**31.** Laiton Donato, K. Análisis de determinantes genéticos de virulencia en cepas del virus dengue tipo 2. [Internet]. 2015 [Tesis de posgrado] Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C. Facultad de Ciencias Posgrado Interfacultades en Microbiología.

**32.** Xu J, Shi PY, Li H, Zhou J. Broad Spectrum Antiviral Agent Niclosamide and Its Therapeutic Potential. ACS Infect Dis. 2020; 6(5): 909-915.

**33.** Li Z, Brecher M, Deng YQ, Zhang J, Sakamuru S, Liu B, Huang R, Koetzner CA, Allen CA, et al. Existing drugs as broad-spectrum and potent inhibitors for Zika virus by targeting NS2B-NS3 interaction. Cell Res. 2017; 27(8): 1046-1064.

**FORMATO PARA EVALUACIÓN DE PROYECTO**

UNIVERSIDAD EL BOSQUE

**Comité Trabajos de Grado**
**Programa Química Farmacéutica**

## I. Identificación del proyecto

| | | | |
|---|---|---|---|
| **TÍTULO** | EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ÁCIDO VALPROICO EN LOS NIVELES DE COLESTEROL CELULAR DURANTE LA INFECCIÓN CON VIRUS DENGUE | | |
| **ESTUDIANTE(S)** | María Gabriela Gutiérrez Urrego<br>Juliana Romero Méndez<br>María Alejandra Soler Chipatecua | | |
| **Nombre Director o Tutor** | Félix Giovanni Delgado Tiria | | |
| **Nombre de Codirector o Cotutor ( si aplica)** | Félix Giovanni Delgado Tiria | | |
| **Modalidad** | Investigación | **Fecha de Evaluación** | 2 de mayo de 2023 |

## II. Criterios de Evaluación

| **1. Coherencia** | | | |
|---|---|---|---|
| **Descripción** | **Puntos Posibles** | **Ponderación** | **Comentarios** |
| En el proyecto se evidencia el desarrollo y coherencia en torno al título, los objetivos, la pregunta de investigación, la metodología y resultados esperados | **5** | **5** | Es un trabajo muy bien desarrollado, que muestra una coherencia del 100 % a lo largo de su desarrollo. |

| 2. Alcances | | | |
|---|---|---|---|
| **Descripción** | **Puntos Posibles** | **Ponderación** | **Comentarios** |
| Los objetivos (general y específicos) fueron alcanzados en la consecución del proyecto.<br><br>Fue posible la resolución de la pregunta de investigación. | **10** | **10** | Se responde la pregunta de investigación, en la que todo el tiempo se explica como las metodologías ayudaron al estudio y prometedora resolución de los objetivos. |

| 3. Estrategia metodológica | | | |
|---|---|---|---|
| **Descripción** | **Puntos Posibles** | **Ponderación** | **Comentarios** |
| Las estrategias, métodos, herramientas y actividades propuestas fueron los adecuados para alcanzar cada uno de los objetivos planteados, o los cambios realizados fueron pertinentes para el desarrollo del trabajo.<br>Para el caso de monografías, además de lo anterior, la | **5** | **5** | En la descripción de la metodología se evidencia claridad en el uso de los métodos, que datos se esperaban encontrar para ser analizados, las razones de uso de líneas celulares y algo muy interesante, se muestra claridad en las interferencias que se podrían dar en el análisis de la disminución de colesterol. |

| | | | |
|---|---|---|---|
| bibliografía es reciente y conocida. | | | |

| 4. Resultados y análisis | | | |
|---|---|---|---|
| **Descripción** | **Puntos Posibles** | **Ponderación** | **Comentarios** |
| Los resultados obtenidos cumplen con lo propuesto en el anteproyecto, y la explicación de los mismos es clara, pertinente y aporta a la comunidad científica.<br><br>Para el caso de monografías, además de cumplir con lo propuesto, el documento tiene una originalidad pertinente. | **20** | **17** | Con el desarrollo de la metodología y la explicación de los resultados encontrados, hay cumplimiento en lo propuesto de los objetivos, en lo cual se responde a la pregunta de investigación, dejando ver la rigurosidad y aporte científico.<br><br>En los resultados, la única duda que se deja es el uso de las curvas de calibración. |

| 5. Conclusiones | | | |
|---|---|---|---|
| **Descripción** | **Puntos Posibles** | **Ponderación** | **Comentarios** |
| Las conclusiones son coherentes y resaltan los resultados más importantes del proyecto.<br><br>Las conclusiones dejan entrever posibles recomendaciones o estás están descritas, con el objetivo de aumentar el avance científico. | **10** | **10** | Las conclusiones son coherentes con los resultados encontrados y con el análisis de los mismos.<br>Se dejan claros los alcances del estudio en las recomendaciones propuestas. |

| Correcciones y Observaciones Adicionales |
|---|
| Felicito el trabajo, es un documento con muy buena consecución, claridad, explicación y coherencia.<br>Como preguntas: ¿Qué coeficientes de correlación indican que se puede hacer uso de las estandarizaciones propuestas?<br>¿Cómo es la relación directa de los efectos citotóxicos?<br>Dejar claridad en la presentación de posibles muestras a la comunidad científica, lo tocaron el algún momento en el escrito, pero no fue claro.<br>Correcciones muy pequeñas en el documento:<br>En el objetivo general, indican que es el objetivo general del anteproyecto (Considero que en este caso sobra) |

| |
|---|
| En la página 13 al inicio, luego de la tripsina, el número está unido a la unidad de concentración (dar un espacio). |

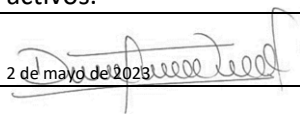
**Concepto Final[1]**

| **Concepto Final** *Marque con una x* | | **Puntaje Final** |
|---|---|---|
| Revisado sin correcciones | X | 4,7 |
| Revisado con correcciones | | |

**NOTA: Si el trabajo cumple con las características y requerimientos para ser postulados a meritorio por favor completar el formato correspondiente.**

El concepto final debe estar en línea con la calificación asignada. Propuestas con un puntaje por debajo de 30 puntos no pueden ser aprobadas.

## III. Información Evaluador

| | |
|---|---|
| **Nombre del evaluador** | Diana Marcela Vargas Oviedo |
| **Correo Electrónico** | dmvargaso@unbosque.edu.co |
| **Teléfono de Contacto** | 3008994324 |
| **Formación Académica** | Dra. en ciencias Química |
| **Áreas de conocimiento** | Bioquímica – Química orgánica – síntesis- estudio de compuestos activos. |
| **Firma del Evaluador** |  2 de mayo de 2023 |

# EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ÁCIDO VALPROICO EN LOS NIVELES DE COLESTEROL CELULAR DURANTE LA INFECCIÓN CON VIRUS DENGUE

**María Gabriela Gutiérrez Urrego**

**Juliana Romero Méndez**

**María Alejandra Soler Chipatecua**

**Universidad El Bosque**

**Facultad de Ciencias - Programa de Química Farmacéutica**

**Bogotá DC. – Abril 2023**

# EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ÁCIDO VALPROICO EN LOS NIVELES DE COLESTEROL CELULAR DURANTE LA INFECCIÓN CON VIRUS DENGUE

**María Gabriela Gutiérrez Urrego**

**Juliana Romero Méndez**

**María Alejandra Soler Chipatecua**

**Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de:**

**Químico Farmacéutico**

**Modalidad de investigación**

**Director: Félix Giovanni Delgado Tiria**

**Codirectora: Sandra Johanna Morantes Medina**

**Línea de investigación patogénesis viral**

**Universidad El Bosque**

**Facultad de Ciencias - Programa de Química Farmacéutica**

**Bogotá DC. – Abril 2023**

# Hoja de identificación

| | |
|---|---|
| **Título:** | Evaluación del efecto del ácido valproico en los niveles de colesterol celular durante la infección con virus dengue |
| **Grupo de investigación:** | Grupo de virología<br>Grupo de Investigación en Química Aplicada |
| **Línea de Investigación:** | Patogénesis Viral<br>Bioprospección y Biotecnología Farmacéutica |
| **Institución (es) Participante (s):** | Universidad El Bosque |
| **Tipo de Investigación:** | Estudio Cuantitativo Experimental |
| **Estudiantes:** | María Gabriela Gutierrez Urrego<br>Juliana Romero Mendez<br>María Alejandra Soler Chipatecua |
| **Director:** | Felix Giovanni Delgado Tiria |
| **Codirector:** | Sandra Johanna Morantes Medina |

# Dedicatoria o lema

Queremos dedicar este trabajo a nuestros padres, nuestros hermanos y nuestros amigos que nos brindaron su apoyo incondicional y por estar presentes en los momentos más difíciles y por animarnos para sacar adelante este gran proyecto. También queremos dar un reconocimiento especial a nuestros tutores Felix Giovanni Delgado Tiria y Sandra Johanna Morantes Medina por su apoyo y paciencia.

# Agradecimientos

A nuestros padres y hermanos por su apoyo, su amor y la constante motivación para cumplir todas nuestras metas.

A nuestro director Felix Giovanni Delgado Tiria y codirectora Sandra Johanna Morantes Medina por dedicarnos su tiempo y apoyarnos en todo momento del proceso, por su dedicación para explicarnos, por su paciencia y su buena actitud y disposición a lo largo de la realización del proyecto.

A Dora Emilia Fierro y Alejandro Cáceres por su apoyo durante la realización de los experimentos y por guiarnos durante el proceso.

A nuestros amigos por hacer parte del proceso y por brindarnos su apoyo y buenas energías en los momentos más complicados.

A los docentes que nos brindaron sus conocimientos y que nos han formado no solo para convertirnos en profesionales capaces de resolver problemas y afrontar distintas situaciones si no también como seres humanos íntegros.

Por último, a la Universidad El Bosque y al grupo de virología por brindarnos los espacios, equipos y materiales necesarios para llevar a cabo nuestro proyecto de grado.

# Tabla de contenido

**1. Introducción....1**

**2. Marco teórico....2**

2.1 Virus Dengue....2

2.2. Importancia del colesterol durante la replicación del virus dengue....5

2.3. Papel del receptor NPC1L1 y el fármaco ezetimibe....6

2.4. Células Huh7 y receptor NPC1L1....6

2.5. Cuantificación del colesterol celular....6

2.6 Ácido valproico....7

**3. Planteamiento del problema....8**

**4. Pregunta de investigación....9**

**5. Objetivos....10**

5.1 Objetivo general del Anteproyecto....10

5.2 Objetivos específicos....10

**6. Metodología....11**

6.1. Cultivo celular....11

6.2. Citotoxicidad de Ácido valpróico y Ezetimibe....11

6.3. Estandarización del protocolo para la cuantificación de colesterol....11

6.4. Infección viral y tratamiento con ácido valproico....13

6.5. Cuantificación de colesterol total celular....13

6.6. Extracción del ARN....14

6.7. Ensayo de RT-qPCR en tiempo real de un solo paso....14

6.8. Evaluación de la expresión del receptor NPC1L1 :....15

**7. Resultados y análisis de resultados....16**

**8. Conclusiones....29**

**9. Recomendaciones....30**

**10. Referencias bibliográficas....31**

# Listado de tablas


| Tabla | Nombre | Pág. |
|---|---|---|
| Tabla 1 | *Secuencia de cebadores empleados en ensayos de expresión génica* | 15 |
| Tabla 2 | *Resultados del experimento de estandarización de colesterol en la variación del factor de dilución, respecto a la concentración de colesterol (μM) y las Unidades Relativas de Fluorescencia (URF) correspondientes a las células no tratadas y tratadas con ezetimibe 25 μ*M. | 21 |
| Tabla 3 | *Resultados de los experimentos de cuantificación de colesterol, infección viral y expresión del receptor NPC1L1 en células Huh7 infectadas con el virus DENV-2.* | 28 |

# Listado de figuras


| Figura | Nombre | Pág. |
|---|---|---|
| Figura 1 | *Estructura del virus dengue y composición del genoma viral (Laredo, T. et al. 2012).* | 4 |
| Figura 2 | *Ciclo de replicación del dengue (Takahashi, H. et al. 2016)* | 5 |
| Figura 3 | *Reacción de formación de resorufina (Ivanec-Goranina, R. et al. 2008)* | 7 |
| Figura 4 | *Gráficas de viabilidad celular de las células Huh7 después del tratamiento con ezetimibe por **(A)** 24 horas, **(B)** 48 horas y **(C)** 72 horas en concentraciones de 0.39, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 μM, usando el ensayo de resazurina para la evaluación de la viabilidad. Los resultados son mostrados como los promedios ± desviación estándar de 3 experimentos independientes.* | 18 |
| Figura 5 | *Gráficas de viabilidad celular de las células Huh7 después del tratamiento con ácido valproico por **(A)** 24 horas, **(B)** 48 horas y **(C)** 72 horas en concentraciones de 0.030, 0.060, 0.125, 0.25, 0.50, 1, 2, 4, 8 y 16 mM, usando el ensayo de resazurina para la evaluación de la viabilidad. Los resultados son mostrados como los promedios ± desviación estándar de 3 experimentos independientes.* | 19 |
| Figura 6 | *Curva de calibración estándar de la fluorescencia emitida respecto a la variación de concentraciones de colesterol entre 0.625 a 20 μM para el primer ensayo de estandarización del proceso de cuantificación de colesterol.* | 21 |
| Figura 7 | *Gráfica de la variación de la concentración de colesterol evaluada con el kit Amplex Red Cholesterol* | 23 |

| | | |
|---|---|---|
| | *Assay, en células Huh7 no infectadas e infectadas con el virus Dengue, con un tiempo de tratamiento de 48 horas con ezetimibe 25 μM y ácido valproico a 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 mM. Los resultados son mostrados como los promedios ± desviación estándar de 3 experimentos independientes.* | |
| Figura 8 | *Curva estándar por qRT-PCR para la cuantificación de carga viral* | 24 |
| Figura 9 | *Evaluación del número de copias virales de DENV-2 en células Huh7 infectadas y tratadas con VPA a concentraciones de 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 mM y ezetimibe a 25 μM como control positivo. Los resultados son mostrados como los promedios ± desviación estándar de 3 experimentos independientes.* | 25 |
| Figura 10 | *Evaluación de los cambios de la expresión del receptor NPC1L1 en células Huh7 realizada con el modelo matemático planteado por Pfaffl, M.W en el año 2001, comparando células infectadas con DENV-2 y no infectadas, ambos grupos celulares tratados con ácido valproico (8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 mM) y ezetimibe 25 μM a 48 horas y con un grupo de control de células sin tratamiento.* | 26 |

# Lista de Símbolos y abreviaturas

BCA: Ácido bicinconínico

EZ: Ezetimibe

Huh7: Linea celular de hepatocitos humanos

NPC1L1: Niemann-Pick C1-Like 1

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

TSA: Tricostatina-A

URF: Unidades Relativas de Fluorescencia

VPA: Ácido Valproico

# Resumen

La enfermedad causada por el virus dengue es considerada como una problemática de salud pública sobre la cual, hasta el momento no se tiene un tratamiento antiviral farmacológico efectivo y por ende el manejo de los pacientes solo está enfocado al tratamiento de los síntomas, mediante analgésicos y antifebriles. El ácido valproico (VPA) es un fármaco antiepiléptico, sin embargo, se ha demostrado que presenta un efecto antiviral durante la infección con virus dengue, cuyo mecanismo exacto no ha sido descrito hasta el momento. No obstante, se ha sugerido una posible alteración en los niveles de colesterol celular tras el tratamiento con VPA, teniendo en cuenta que el colesterol es el lípido de membrana más importante y que puede facilitar la replicación viral del virus dengue al interior celular, lo cual ha sido reportado en estudios con fármacos reductores de colesterol como el ezetimibe, que presenta un efecto antiviral debido a la inhibición del receptor NPC1L1 encargado de la captación de colesterol extracelular. Con base en lo anterior, este proyecto tuvo como objetivo determinar el efecto de ácido valproico sobre los niveles de colesterol celular en un modelo *in vitro* de infección con el virus dengue.

Para ello, se llevaron a cabo experimentos con células Huh7 enfocados en el uso del Amplex Red Cholesterol Assay kit con el que se estandarizó la cuantificación de colesterol intracelular estableciendo como condiciones estándar un tiempo de tratamiento con ezetimibe 25 µL de 48 horas y una preparación de la muestra con un factor de dilución de 1:2. Luego de ello, se cuantificó el colesterol en células infectadas con DENV-2 y tratadas con rangos de concentración de VPA entre 0.25 y 8 mM, teniendo un control positivo (ezetimibe 25 µM ) y un control negativo (células sin tratamiento). Adicionalmente, se cuantificó tanto la replicación viral como la expresión del gen NPC1L1 por medio de qRT-PCR, obteniendo como resultado una disminución del número de copias virales, una reducción de la concentración de colesterol intracelular y un aumento en la expresión del gen NPC1L1 después de los tratamientos con VPA. En conclusión, el estudio realizado evidencia el potencial antiviral del VPA para el tratamiento de la infección causada por el virus dengue, teniendo en cuenta que se observó una reducción en la concentración de colesterol durante el tratamiento con el fármaco a concentraciones de 4 y 8 mM en un tiempo de 48 horas, luego de la infección.



# Palabras Clave:

Dengue, VPA, Colesterol, Ezetimibe, NPC1L1, Huh7.

# Abstract

The disease caused by the dengue virus is considered a public health problem for which, until now, there is no effective antiviral pharmacological treatment and therefore the management of patients is only focused on the treatment of symptoms, through analgesics and fever reducers Valproic acid (VPA) is an antiepileptic drug, however, it has been shown to have an antiviral effect during dengue virus infection, the exact mechanism of which has not been described so far. However, a possible alteration in cellular cholesterol levels has been suggested after treatment with VPA, taking into account that cholesterol is the most important membrane lipid and that it can facilitate viral replication of the dengue virus inside the cell, which It has been reported in studies with cholesterol-lowering drugs such as ezetimibe, which has an antiviral effect due to the inhibition of the NPC1L1 receptor responsible for uptake of extracellular cholesterol. Based on the above, this project aimed to determine the effect of valproic acid on cellular cholesterol levels in an *in vitro* model of dengue virus infection.

For this, experiments were carried out with Huh7 cells focused on the use of the Amplex Red Cholesterol Assay kit, with which the quantification of intracellular cholesterol was standardized, establishing as standard conditions a treatment time of 48 hours with ezetimibe 25 µL and a preparation of the sample with a dilution factor of 1:2. After that, cholesterol was quantified in cells infected with DENV-2 and treated with VPA concentration ranges between 0.25 and 8 mM, having a positive control (ezetimibe 25 µM) and a negative control (cells without treatment). Additionally, both viral replication and the expression of the NPC1L1 gene were quantified by means of qRT-PCR, obtaining as a result a decrease in the number of viral copies, a reduction in the concentration of intracellular cholesterol and an increase in the expression of the NPC1L1 gene after of VPA treatments. In conclusion, the study carried out shows the antiviral potential of VPA for the treatment of infection caused by dengue virus, taking into account that a reduction in cholesterol concentration was observed during treatment with the drug at concentrations of 4 and 8 mM within 48 hours after infection.



## Keywords:

Dengue, VPA, Cholesterol, Ezetimibe, NPC1L1, Huh7.

# 1. Introducción

En Colombia, la enfermedad causada por el virus dengue es una problemática de salud pública debido a su alta endemicidad. Actualmente, no existe un tratamiento farmacológico específico para el manejo de la enfermedad y a pesar de la existencia de una vacuna aprobada por la OMS, no se ha logrado mitigar el número de casos y las complicaciones asociadas a esta patología en zonas endémicas (Zambrano, P. 2017). Es por ello, que es necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas enfocadas al control de dicha enfermedad.

El VPA es un fármaco indicado para el tratamiento de epilepsias parciales o generalizadas (Martinez-Lazcano, M.T. et al. 2015), no obstante, por medio de estrategias de reposicionamiento de fármacos, se ha demostrado un efecto antiviral de este principio activo, observando una importante reducción de la replicación de virus con envoltura después de ser tratados con VPA (Vázquez-Calvo, A. et al. 2011). Este efecto se ha descrito principalmente en varios flavivirus, sin embargo, en el caso específico del dengue, Silva-Aguilera, M.Y. et al (2020) demostraron que el VPA induce una reducción significativa del porcentaje de infección por este virus en células VERO y adicionalmente, observaron una inhibición de la replicación. Los autores sugieren que el posible mecanismo de acción seguido por el fármaco no se debió al efecto sobre las histonas desacetilasas, sino que probablemente se deba a alteraciones en la composición de la membrana lipídica celular, lo cual, también ha sido propuesto por otros autores como Vázquez-Calvo, A. et al (2011).

Por otro lado, diferentes grupos de investigación han demostrado la importancia del colesterol como uno de los lípidos de membrana más importantes en la replicación del dengue, ya que tiene un rol importante en cada una de las etapas del ciclo viral, así como una estrecha relación con el receptor NPC1L1, involucrado en la absorción de colesterol (Osuna-Ramos, J. F. et al. 2018; Osuna-Ramos, J. F. et al. 2017). Partiendo de esto, en el presente trabajo se espera reunir evidencia experimental que soporte la hipótesis de la alteración de los niveles de colesterol celular, así como cambios en la expresión génica del receptor de colesterol NPC1L1 como un posible mecanismo de acción del VPA para inhibir la replicación del virus dengue, usando como modelo experimental los hepatocitos humanos Huh7 que expresan el receptor NPC1L1 y que han sido empleados en otros estudios similares. Así pues se evidenció la reducción del número de copias virales a causa de la disminución de los niveles de colesterol y el aumento en la expresión del gen NPC1L1 tras la infección viral y el tratamiento con VPA a concentraciones de 4 y 8 mM tras un tiempo de 48 horas.

# 2. Marco teórico

## *2.1 Virus Dengue*

El virus dengue es un flavivirus de ARN de polaridad positiva perteneciente a la familia Flaviviridae, el cual puede ser transmitido por mosquitos del género *Aedes* (*Aedes albopictus* y *Aedes aegypti*). *Ae. albopictus* es un vector poco común que predomina en lugares donde no está presente el *Ae. aegypti* y que tiene menor afinidad en la infección a los humanos, por lo que dicho vector es característico en la transmisión del mosquito a los primates no humanos, mientras que por otro lado, *Ae. aegypti* es el vector más común que se encuentra presente en todas las zonas endémicas y usa a los humanos como huéspedes principales del virus (Laredo, T. et al. 2012). El virus dengue consiste en partículas esféricas de 40 a 50 nm de diámetro cuyo genoma viral tiene un tamaño de 11 Kb y existen cuatro serotipos de este (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4), los cuales presentan analogías patogénicas y estructurales y diferencias respecto a su origen evolutivo, por lo que los cuatro serotipos pueden producir formas graves de la enfermedad; no obstante, las cepas de DENV-2 y DENV-3 provenientes de Asia pueden conllevar en mayor medida a producir casos graves y fallecidos ya que se asocian al desarrollo de epidemias de fiebre hemorrágica del dengue (DHF del inglés dengue hemorrhagic fever) y síndrome de choque dengue (DSS del inglés dengue shock syndrome) (Bacallao-Martínez, G.C et al. 2013). En el caso específico de Colombia, los serotipos más comunes y de mayor circulación son el DENV-1 y DENV-2 afectando en mayor medida las poblaciones menores a 15 años (Velandia, M et al. 2011).

La enfermedad producida por el virus dengue es considerada como una infección sistémica y dinámica, esta se puede presentar de manera asintomática o con manifestaciones graves y no graves, posee un periodo de incubación de 4 a 10 días y una vez transcurrido este tiempo se llevan a cabo tres fases (febril, crítica y recuperación). Inicialmente, en la fase febril los pacientes presentan fiebre alta que puede tener una duración entre 2 y 7 días y se presentan otros síntomas comunes como dolor corporal, trastornos gastrointestinales, cefaleas, así como también hemorragias menores, por lo que en esta etapa es difícil distinguir la enfermedad del dengue con otras enfermedades que también presenten etapas febriles agudas; en la fase crítica se genera un aumento de la permeabilidad capilar en donde ocurre una extravasación del plasma que se traduce a una hemorragia en la mucosa nasal y en encías, así como también sangrados transvaginales en mujeres que se encuentren en edad fértil, por esta razón, es

posible que los pacientes que tengan una alta permeabilidad capilar empeoren debido a la pérdida del volumen plasmático, lo que puede conllevar a presentar signos de alarma como un estado de choque (DSS) y hemorragia grave (DHF); finalmente, cuando el paciente sobrevive la fase crítica llega a una fase de recuperación, en la cual ocurre una reabsorción del líquido que fue extravasado en la fase anterior, en donde hay un retorno desde el compartimento extravascular al intravascular, esta fase dura entre 48 y 72 horas donde se observa una mejoría general del estado del paciente recuperando su apetito y estabilizando su estado hemodinámico (OPS. 2015).

Cuando un paciente se infecta con el virus por primera vez se presenta una respuesta inmunitaria, en donde las células blanco como los monocitos, los macrófagos, las células dendríticas y los linfocitos T CD4 y CD8, expresan como defensa al interferón de tipo I ($\alpha\ y\ \beta$) para inhibir la replicación viral. Así mismo, se da un proceso para generar antígenos que se asocian con el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), haciendo visibles las células infectadas a las células natural killer y a los linfocitos T, quienes atacan las células infectadas induciendo la muerte celular en ellas. De igual forma, los linfocitos T controlan la respuesta inmune ya que los linfocitos CD4 y CD8 se estimulan mediante citocinas como el interferón y el factor de necrosis tumoral, liberando a su vez más citocinas proinflamatorias. Por otro lado, cuando los pacientes se infectan por segunda vez con un serotipo diferente al inicial, se potencia la respuesta inmunitaria que desarrolla el paciente aumentando los casos de dengue grave que pueden estar acompañados por manifestaciones hemorrágicas (Velandia, M. et al. 2011).

La estructura general del virus consiste en una nucleocápside esférica, que es la parte más externa y recubre la membrana lipídica que se obtiene de la célula hospedera y está a su vez rodea la cápside viral que protege el ARN con el material genético. El genoma viral que conforma al virus dengue codifica una poliproteína que genera tres proteínas estructurales (proteína C, proteína M y proteína E) y cinco proteínas no estructurales (NS1, NS2, NS3, NS4 y NS5) (figura 1). La proteína C emite señales por la membrana lo que permite que pueda interactuar el ARN viral y formar la nucleocápside, la proteína M es la encargada de la regulación de la fusión viral y el plegamiento de la proteína E y esta última, se encuentra en la superficie de los viriones maduros y es la única que interactúa con los receptores en la membrana plasmática de las células del huésped favoreciendo así la endocitosis del virus. Por otro lado, la NS1 participa en el ensamblaje viral, la NS2 actúa como cofactor con la NS3 siendo importante en la replicación del ARN viral, la NS4 es crítica para la formación de vesículas y por

último la NS5 influye en la actividad de la ARN polimerasa para la replicación del ARN viral (Laredo, T. et al. 2012; Beita-Jiménez, J. et al. 2016)

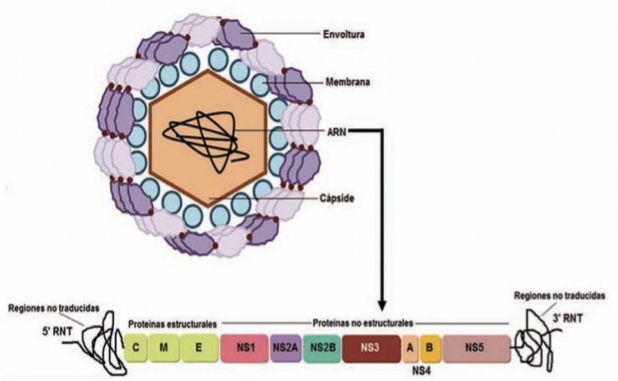



**Figura 1.** *Estructura del virus dengue y composición del genoma viral (Laredo, T. et al. 2012).*

Para la replicación viral, en un principio el mosquito debe picar a una persona que ya se encuentre infectada con el virus y que se encuentre en el periodo de viremia (7 días de incubación). Una vez ocurre esto, el mosquito puede transmitir el virus a una persona sana y lo que ocurre es que al momento de la picadura el mosquito se alimenta de la sangre del hospedero e introduce el virus, el cual se une a la célula por medio de receptores como el DC-SIGN y proteoglucanos, esto se da gracias a la interacción con la envoltura del virus (proteína E). Luego, el virus entra por endocitosis a la célula por medio de una vesícula que se acidifica para que posteriormente la nucleocápside libere el ARN viral dentro del citoplasma, conllevando a la producción de proteínas virales que generan viriones maduros los cuales salen de las células por exocitosis para producir nuevas infecciones (Figura 2) (Laredo, T. et al. 2012; Beita-Jiménez, J. et al. 2016).

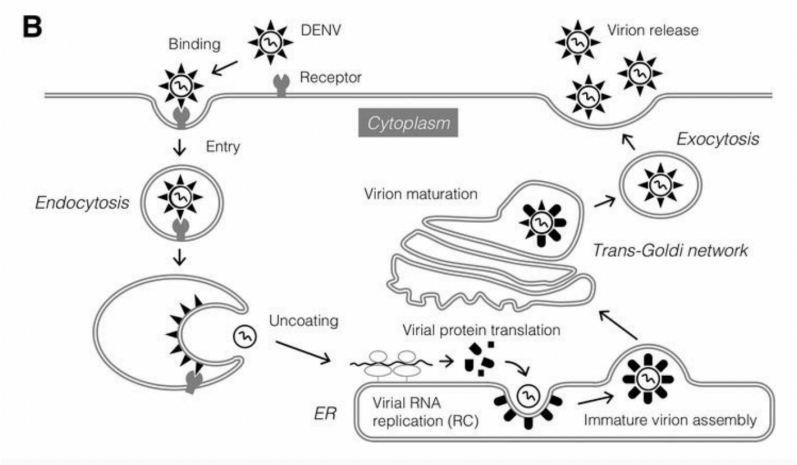



**Figura 2**. *Ciclo de replicación del dengue (Takahashi, H. et al. 2016)*

## *2.2. Importancia del colesterol durante la replicación del virus dengue*

Durante el ciclo de replicación del dengue en la células huésped, el virus es capaz de provocar un remodelamiento físico y metabólico que le permite tener las condiciones óptimas para facilitar el proceso de infección, y por ello la modificación del metabolismo de lípidos y colesterol es uno de los mecanismos más importantes en el ciclo replicativo (Osuna-Ramos, J. F. et al. 2017). Dicha modificación está basada en la endocitosis del virus, en donde éste debe atravesar la membrana celular, la cual contempla una bicapa de lípidos que puede tener parches de dominios lipídicos como es el caso de las balsas lipídicas; estas consisten en microdominios que están enriquecidos con colesterol y pueden verse involucrados en los ciclos de vida de virus envueltos y no envueltos. En el caso del dengue, las balsas lipídicas funcionan como una plataforma para concentrar el virus y facilitar su endocitosis, por lo que se mejora su interacción con la proteína E favoreciendo su entrada y por ende su replicación viral. De igual forma, el colesterol es importante ya que este promueve la fusión entre el endosoma y la membrana del virus para poder liberar el genoma viral en el citoplasma, no obstante los niveles de colesterol no pueden ser muy bajos ya que se impediría la eficiencia en la unión y/o fusión del virus dado que se generaría una alteración de la integridad de las balsas lipídicas, así mismo, los altos niveles de colesterol incrementarían la rigidez de la membrana aumentando la barrera energética necesaria para la fusión viral, impidiendo la liberación del ARN (Lee, C.J. et al. 2008).

### *2.3. Papel del receptor NPC1L1 y el fármaco ezetimibe*

El receptor NPC1L1 (Niemann-Pick C1-Like 1) es una molécula de gran importancia para la absorción y la homeostasis del colesterol, en donde su expresión está dada según los niveles de colesterol celular, ya que cuando estos niveles son bajos dentro de la célula, el receptor se dirige hacia la membrana plasmática para iniciar la captación del colesterol exógeno. El ezetimibe, es un fármaco que inhibe la absorción de colesterol al bloquear de forma reversible el receptor NPC1L1 por lo cual es usado para el tratamiento de las dislipidemias, sin embargo, recientemente se ha demostrado su efecto antiviral ante virus como el causante de la hepatitis C y la hepatitis B en modelos celulares y animales. Así mismo, se comprobó su mecanismo para inhibir la replicación del virus dengue dada la alteración en los niveles del colesterol a causa del bloqueo del receptor NPC1L1 por este fármaco (Osuna-Ramos, J. F. et al. 2017).

### *2.4. Células Huh7 y receptor NPC1L1.*

El receptor NPC1L1 se expresa principalmente en células de hepatocitos y enterocitos, y en estudios *in vitro* se ha demostrado que el virus dengue tiene la capacidad de infectar células hepáticas (Velandia, M et al. 2011), por lo cual es importante evaluar la expresión génica del receptor NPC1L1 en cultivos celulares que cumplan las características mencionadas anteriormente, como es el caso de las células Huh7, que consisten en una línea celular derivada del hepatoma humano y es empleada como un sustituto experimental de hepatocitos primarios (Kawamoto, M. et al. 2020).

### *2.5. Cuantificación del colesterol celular.*

El kit Amplex Red Cholesterol assay permite determinar los niveles de colesterol celular ya que se fundamenta en la hidrólisis de colesterol por medio de la colesterol esterasa seguido de la oxidación, mediante la colesterol oxidasa para la producción de la cetona correspondiente y peróxido de hidrógeno que se detecta con el reactivo amplex red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina), esto debido a que reacciona estequiométricamente produciendo resorufina (figura 3), un compuesto altamente fluorescente que se detecta en longitudes de onda entre 571 y 585 nm (Invitrogen. 2010).

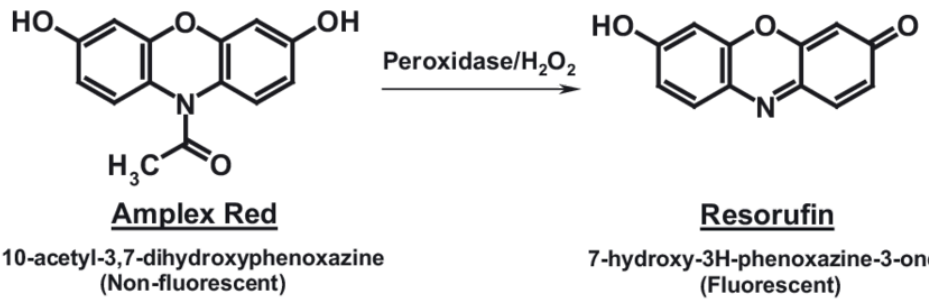



**Figura 3**. *Reacción de formación de resorufina (Ivanec-Goranina, R. et al. 2008).*

### *2.6 Ácido valproico*

El VPA es un compuesto derivado de ácido valérico que presenta una cadena corta con ramificaciones y es usado para el tratamiento de la epilepsia y convulsiones, ya que bloquea los canales de sodio tipo T y potencia la acción inhibitoria del GABA en el sistema nervioso central (Alcaide-García, J. et al. 2006). Adicional a ello, estudios recientes han demostrado mecanismos de acción alternativos como la inhibición de las histonas desacetilasas por lo cual se ha estudiado su uso como adyuvante en el tratamiento de cáncer y en enfermedades neurodegenerativas (Ghodke, Y. et al. 2013). De igual forma otros estudios se han enfocado en el VPA como un agente antiviral partiendo de la hipótesis de la inhibición de las histonas desacetilasas para bloquear la replicación viral, sin embargo los resultados demostraron que este no era el mecanismo por el cual el VPA tiene su acción antiviral, razón por la cual se planteó un mecanismo diferente en donde el VPA genera una alteración en la membrana lipídica de virus envueltos acorde a lo establecido por Silva-Aguilera, M.Y. et al. (2020) y Vazquez-Calvo, A. et al (2011).

# 3. Planteamiento del problema

Actualmente los arbovirus implican un reto en los sistemas de salud a nivel mundial debido a que gracias a su potencial de infección y replicación en vectores artrópodos, tienen la capacidad de generar epidemias en la población con implicaciones en el sistema de salud (Betancurt-Cravioto, M. et al. 2020; Reyes-Tápanes, M. 2021). Según la OPS, en el 2021 se presentaron 1’324,108 casos de arbovirosis en América, de los cuales el 89 % correspondieron a casos de Dengue, siendo esta la enfermedad transmitida por vectores con mayor incidencia que se presentó en gran medida en países como Colombia, Honduras y Brasil (OPS. 2021).

A pesar de las medidas de prevención y control que se toman en las regiones endémicas, es necesario realizar prevención terciaria para el control de los brotes, puesto que no hay un tratamiento farmacológico específico contra el virus dengue, sino que se busca evitar la progresión de la enfermedad mediante tratamiento sintomático. En el año 2015, se aprobó la vacuna Dengvaxia® (CYD-TDV) para la prevención del virus Dengue, sin embargo, ésta sólo está indicada para población con edades entre 9 y 45 años que ya hayan tenido un episodio de infección con el virus Dengue (OMS. 2022), por lo que no se considera la totalidad de la población susceptible a tener esta enfermedad. Por todo lo anterior, la búsqueda de tratamientos específicos contra el virus dengue es una necesidad urgente.

Hoy en día, el reposicionamiento de fármacos es una alternativa oportuna enfocada en el control de diferentes enfermedades, en este caso, distintos fármacos como el ezetimibe, la lovastatina o el ácido valproico (VPA) han demostrado eficacia como fármacos antivirales del virus Dengue. En el caso del VPA se han planteado posibles mecanismos mediante los cuales se ve afectada la replicación del virus, sin embargo, hasta el momento ninguno se ha demostrado; la hipótesis más cercana se basa en posibles alteraciones en la composición de la membrana lipídica de la célula que pueden ser generados por el VPA. Por otra parte, se ha evidenciado que uno de los lípidos de membrana más importantes en la replicación viral del dengue es el colesterol, el cual se absorbe mediante el receptor NPC1L1, por lo cual, este trabajo busca determinar si existe alguna correlación entre el efecto causado por el VPA en la replicación del virus con los niveles de colesterol así como con la expresión del receptor NPC1L1.

# 4. Pregunta de investigación

¿Cuál es el efecto del ácido valproico en los niveles de colesterol celular durante la infección con virus dengue?

# 5. Objetivos

## *5.1 Objetivo general*

Determinar el efecto del ácido valproico sobre los niveles de colesterol celular en un modelo *in vitro* de infección con el virus dengue.

## *5.2 Objetivos específicos*

- Establecer un protocolo para la cuantificación de los niveles de colesterol en las células Huh7.
- Evaluar el efecto del ácido valproico sobre los niveles de colesterol en células infectadas con el virus dengue.
- Analizar los cambios en la expresión del receptor NPC1L1 en respuesta al tratamiento con ácido valproico en células infectadas con el virus dengue.

# 6. Metodología

## *6.1. Cultivo celular*

Se usó la línea celular humana Huh7 (línea celular derivada del hepatoma humano empleada como un sustituto experimental de hepatocitos primarios) con un medio de cultivo DMEM suplementado con Glutamina 2 mM, penicilina ($5 \times 10^4$ U/mL), estreptomicina (50 µg/mL) y suero fetal bovino al 10 %. Las células fueron incubadas a 37 °C en una atmósfera con $CO_2$ al 5 % y una humedad relativa superior al 70 %.

## *6.2. Citotoxicidad de Ácido valpróico y Ezetimibe*

Para establecer el potencial antiviral del VPA y del ezetimibe se seleccionó una concentración en la que el fármaco no afectara la viabilidad celular. Para ello las células Huh7 se sembraron en una placa de 96 pozos y se trataron con VPA y ezetimibe por 24, 48 y 72 horas en concentraciones de 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06, 0.03 mM y 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39 µM respectivamente. Los efectos sobre la viabilidad celular se determinaron empleando el ensayo de reducción de resazurina. Para el ensayo, los tratamientos fueron reemplazados por una solución de resazurina 44 µM haciendo una incubación por 4 horas en condiciones estándar de cultivo celular. Transcurrido ese tiempo se determinó la intensidad de la fluorescencia por medio del espectrofluorómetro TECAN Infinite 200 PRO (longitud de onda de excitación: 535 nm; longitud de onda de emisión: 595 nm). Los ensayos se realizaron en tres experimentos independientes y por triplicado.

## *6.3. Estandarización del protocolo para la cuantificación de colesterol*

Las células Huh7 fueron sembradas en placas de 6 pozos y se organizaron en dos grupos experimentales, uno tratado con ezetimibe 25 µM y otro no tratado, para cada grupo experimental se incluyeron 3 réplicas. Pasadas 24 horas se usó el kit Amplex Red Cholesterol assay para la cuantificación del colesterol siguiendo las instrucciones del fabricante y que se describen a continuación.

- Preparación de la muestra:

  Las células de los dos grupos experimentales se lavaron con 1 mL de PBS (pH = 7.4), luego se adicionaron 500 μL de buffer RIPA, con el fin de desprender y lisar las células, posteriormente la placa se agitó durante 20 minutos, y el sobrenadante resultante de cada pozo se mantuvo a 4 °C por 15 minutos, después se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos manteniendo la temperatura de 4 °C. Transcurrido el tiempo de incubación las muestras se trabajaron con tres factores de dilución 1:2, 1:4, 1:8.

- Curva de calibración:

  Se preparó la curva de calibración con la solución estándar de colesterol en concentraciones de 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 μmol/L.

- Cuantificación en el equipo:

  En una placa negra de 96 pozos se agregaron 10 μL de catalasa (10 U/mL) a esto se le adicionaron 40 μL de las muestras (dilución 1:2, 1:4 y 1:8) para un volumen final de 50 μL en cada pozo. Esto se incubó durante 15 minutos a 37 °C; con el fin de activar la enzima para así evitar las interferencias del peróxido basal de la célula, por otro lado, se adicionaron 50 μL de cada solución correspondiente al estándar de colesterol para la construcción de la curva de calibración. Sobre lo anterior se adicionaron 50 μL del reactivo Amplex Red y la placa se incubó a 37 °C durante 30 minutos protegida de la luz, finalmente se midió la fluorescencia con el espectrofluorómetro TECAN Infinite 200 PRO (longitud de onda de excitación: 530-560 nm; longitud de onda de emisión: 590 nm).

Además de lo anterior, se hizo una corrección mediante el método de cuantificación de proteínas de BCA con el fin de normalizar los resultados de cuantificación de colesterol, para ello se realizó una curva estándar de albúmina sérica bovina en la que se interpolaron los resultados de la absorbancia correspondiente de cada una de las muestras tras la adición del reactivo BCA (sulfato de cobre y ácido bicinconínico). La lectura se realizó a 570 nm en el espectrofluorómetro TECAN Infinite 200 PRO.

### *6.4. Infección viral y tratamiento con VPA*

Las células Huh7 fueron sembradas en placas de 24 pozos, distribuidas en dos grupos experimentales, uno con células infectadas y otro con células no infectadas, cada grupo se expuso a diferentes concentraciones de VPA (8, 4, 2, 1, 0.5 y 0.25 mM) usando como control positivo el ezetimibe a 25 µM y como control negativo, células sin tratar. Para el grupo de las células infectadas, se usó DENV-2 (DV2 - 12099) a un MOI de 1, pasados 90 minutos de infección, se retiró el inóculo y cada pozo se lavó con 200 µL de PBS, luego de ello, las células fueron tratadas con los fármacos, incubando a 37 °C durante 48 horas. Cuando se cumplió el tiempo de incubación, los sobrenadantes fueron recolectados y almacenados a -80 °C para el análisis de la replicación viral y la monocapa celular fue usada para cuantificación de colesterol total celular (realizada inmediatamente) y para la extracción de RNA por trizol y posterior análisis de expresión del receptor NPC1L1.

### *6.5. Cuantificación de colesterol total celular*

Para determinar el efecto del VPA en los niveles de colesterol celular, se adicionaron 200 µL de tripsina (10 mM) a cada uno de los pozos con las células Huh7 infectadas, no tratadas y tratadas con VPA y ezetimibe. Después de desprender la monocapa celular, la tripsina se inactivó con 200 µL de medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino al 2 %. La suspensión obtenida se centrifugó a 400 g por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 100 µL de buffer RIPA, el extracto celular obtenido se mantuvo a una temperatura de 4 °C por 30 minutos, y nuevamente se centrifugó a una velocidad de 10000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, 40 µL del sobrenadante obtenido se adicionaron a un placa de 96 pozos, la cual ya contenía 10 µL de catalasa (10 U/mL), este mezcla se incubó durante 15 minutos a 37 °C para activar la enzima y evitar la interferencia del peróxido basal de la célula. Pasado este tiempo, se adicionaron 50 µL la solución de estándar de colesterol correspondiente a cada punto de la curva de calibración, manteniendo las mismas concentraciones del protocolo de estandarización (20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 µmol/L). Sobre lo anterior se adicionaron 50 µL del reactivo Amplex Red a cada uno de los pozos (correspondientes a las muestras y los puntos de la curva de calibración) y la placa se incubó a 37 °C durante 30 minutos protegida de la luz, finalmente se midió la fluorescencia con el espectrofluorómetro TECAN Infinite 200 PRO (longitud de onda de excitación: 530-560 nm; longitud de onda de emisión: 590 nm).

### *6.6. Extracción del ARN*

Se realizaron dos tipos de extracción de ARN, por un lado, el ARN viral se extrajo del sobrenadante de las células Huh7 infectadas tratadas y no tratadas con VPA y ezetimibe usando el Kit IBI Scientific Viral Nucleic Acid Extraction Kit (IBI Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN se diluyó en 50 µL de agua libre de RNAsa y se almacenó a -80 °C hasta su análisis por RT-PCR en tiempo real (reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa). Por otro lado, se extrajo el RNA total desde la monocapa celular, este se usó para analizar los cambios en la expresión del receptor NPC1L1, para ello, se retiró el medio y se reemplazó por 250 µL de trizol, esto para romper las células y solubilizar sus componentes. El extracto obtenido se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 mL, luego se adicionaron 70 µL de cloroformo, después de incubar por 5 minutos a temperatura ambiente, la solución se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos a 4 °C para separar las fase acuosa de la orgánica. Cumplido el tiempo de centrifugación se transfirió la fase acuosa (donde está el ARN disuelto) a un nuevo tubo, se adicionaron 170 µL de isopropanol para asegurar la precipitación de los ácidos nucleicos y después de una incubación de 10 minutos en hielo, se centrifugó nuevamente a 14000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Luego de la centrifugación se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 500 µL de etanol al 75 % para volver a centrifugar manteniendo las condiciones descritas anteriormente; el pellet se solubilizó en 20 µL de agua libre de RNAasa y el ARN obtenido se cuantificó usando el nanofotometro Implen®, por último los tubos se congelaron a -80 °C hasta su análisis por RT-qPCR.

### *6.7. Ensayo de RT-qPCR en tiempo real de un solo paso*

El efecto de los tratamientos sobre la replicación viral se determinó a través de la cuantificación absoluta del número de copias virales para DENV-2. Las condiciones de la PCR, secuencia de primers, sonda, y diluciones de plásmido para generar la curva estándar fueron amablemente suministrados por la Dra Eliana Calvo del grupo de Virología (información en proceso de publicación). Una descripción breve del protocolo empleado se muestra a continuación. Los ensayos de qRT-PCR para la cuantificación de DENV-2 se llevaron a cabo en mezclas de reacción de 15 µL que contenían: 5 µL de ARN molde, 7.5 µL de mezcla Luna® Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit, 1.5 µL de una mezcla cebador y sonda a 0.2 µM y 1 µL de agua. Las sondas se marcaron con Quasar 705 y un extintor no fluorescente. Para la amplificación y

detección del ARN viral se utilizó un termociclador BioRad CFX96, bajo las siguientes condiciones: transcripción inversa a 50°C durante 15 minutos, inactivación a 95°C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación con un paso de denaturación a 95°C por durante 15 segundos, una hibridación a 55°C durante 30 segundos y una extensión a 72°C por 15 segundos. En todos los casos se incluyó un control positivo para DENV-2, el control negativo consistió en agua libre de nucleasas en lugar de la muestra de ARN.

### *6.8. Evaluación de la expresión del receptor NPC1L1 :*

La expresión del receptor se evaluó para establecer si el tratamiento con VPA induce cambios en la expresión del receptor NPC1L1 en respuesta a la alteración de los niveles de colesterol celular. La RT-PCR, fue realizada en un solo paso usando los reactivos del RT-qPCR Luna Universal One-Step kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). La mezcla de reacción se preparó según las instrucciones del fabricante, partiendo de una concentración de RNA de 10 ng/µL y un volumen de reacción de 10 µL preparados como sigue: 4.7 µL de muestra de ARN, 5 µL de Luna Universal One-Step mix y 0.3 µL del mix de primers forward y reverse. Para la amplificación de los fragmentos se empleó un equipo Bio- Rad CFX-96 programando como sigue: 55 °C por 10 min, 1 ciclo a 95 °C por 1 min, seguido por 40 ciclos de amplificación a 95 °C por 10 s y 60 °C por 30s. La secuencia de cebadores empleados para este análisis se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1**. *Secuencia de cebadores empleados en ensayos de expresión génica (Davies, J. P. et al. 2005)*

| Gen | Primer F | Primer R |
|---|---|---|
| **NPC1L1** | 5'-TATCTTCCCTGGTTCCTGAACGAC-3' | 5'-CCGCAGAGCTTCTGTGTAATCC-3' |

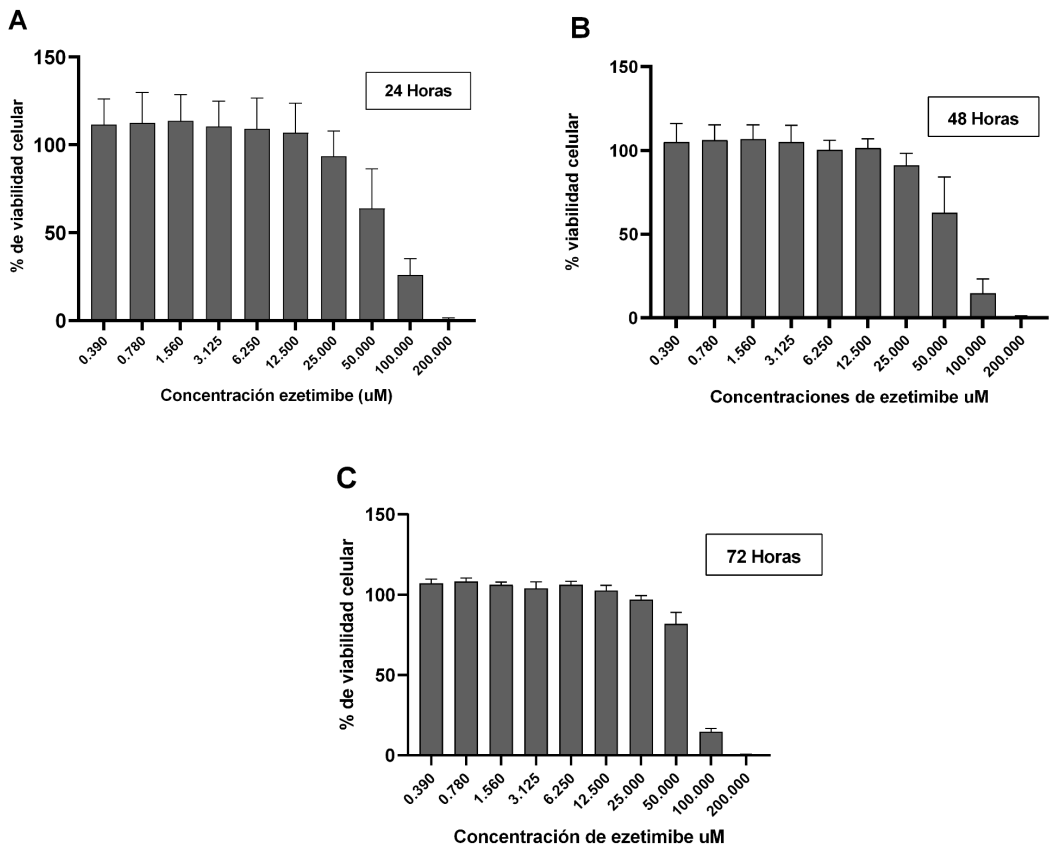
Los resultados obtenidos se analizaron usando el método reportado por Pfaffl (Pfaffl et al., 2001). Como gen de referencia se empleó la β-actina y como control de amplificación del gen NPC1L1 se empleó RNA extraído de células caco-2.

# 7. Resultados y análisis de resultados

Actualmente, en países como Colombia y demás zonas tropicales la enfermedad causada por el virus dengue es considerada una problemática de salud pública sobre la cual se han realizado múltiples investigaciones para encontrar un tratamiento antiviral que sea selectivo a detener la replicación del virus dengue durante la infección, con el fin de que la enfermedad no escale a escenarios graves o incluso la muerte de los pacientes. A pesar de las investigaciones y del desarrollo de una vacuna, hasta el momento no existe un tratamiento farmacológico específico para la infección, es por ello, que el manejo de los pacientes solo se enfoca en tratar la sintomatología que se presenta durante la enfermedad con el uso de analgésicos y antifebriles (OMS. 2022).

Basado en lo anterior, se han realizado investigaciones enfocadas en el reposicionamiento de fármacos como el VPA y el ezetimibe con posibles efectos antivirales. Para el caso del VPA, en el año 2018, Delgado, F.G, et al. estudiaron y demostraron un efecto inmunomodulador de este fármaco durante la infección con virus dengue, y a partir de esto se sugirió que el VPA podría tener un efecto antiviral, lo cual fue corroborado por Silva-Aguilera, MY. et al en el año 2021, en dicho estudio la hipótesis planteada atribuyó la actividad antiviral a una inhibición de las histonas desacetilasas generada por el VPA, sin embargo al comparar esto con un control positivo de Tricostatina-A (TSA) se demostró que este no era el mecanismo que seguía el VPA para generar su actividad antiviral. Por otro lado, las investigaciones de Vázquez-Calvo, A. et al en el año 2011 plantean que el VPA puede llegar a generar alteraciones en la membrana lipídica de la célula, lo cual se considera un importante factor de la replicación del virus durante la infección, esto es comparable con el estudio realizado por Osuna-Ramos, J.F. et al. 2017 en donde se demuestra que el ezetimibe, un fármaco indicado para el tratamiento de dislipidemias, también presenta efectos antivirales mediante su mecanismo de acción al bloquear el receptor NPC1L1 inhibiendo de esta forma la captación del colesterol. Así pues, con base en la evidencia que se tiene hasta el momento, este trabajo busca determinar si el mecanismo antiviral del VPA está ligado a la alteración de los niveles de colesterol y su relación con la expresión del gen NPC1L1; es por ello que se usó la línea celular Huh7 de hepatocitos humanos, la cual se ha utilizado en previos estudios de infección con el virus dengue debido a que tiene la capacidad de expresar el gen NPC1L1, un gen que codifica para un receptor que capta e internaliza colesterol extracelular y cuyos cambios en la expresión podrían alterar los niveles de colesterol intracelular.

La estandarización de las condiciones para cuantificar los cambios en la concentración de colesterol intracelular y su posible relación con el potencial efecto antiviral del VPA involucró definir la densidad celular de trabajo, las concentraciones y tiempos de exposición a los fármacos, las diluciones óptimas de extracto celular para cuantificar colesterol y su respectiva normalización con concentración de proteínas. Inicialmente se establecieron las concentraciones a las cuales ambos fármacos (VPA y Ezetimibe) no tuvieran efectos citotóxicos y/o afectaran la viabilidad celular. Para ello, se siguió la metodología descrita en el numeral 6.2, teniendo en cuenta que para llevar a cabo los experimentos inicialmente se planteó una densidad celular de 5000 células/pozo, no obstante, con dicho valor se evidenció que la confluencia celular no era suficiente, especialmente a las 24 horas y por ende no se obtuvieron resultados adecuados respecto a lectura de fluorescencia correspondiente a este tiempo; esto puede ser explicado por el tiempo de duplicación celular el cual es de aproximadamente 24 horas (Jang, J.W. et al. 2016), por esto, se decidió trabajar con una densidad celular de 7500 células/pozo, en la que se observaron los resultados presentados en las figuras 4 y 5, en donde es posible evidenciar que el tiempo de tratamiento con los fármacos no es un factor que influya en la viabilidad celular, debido a que al comparar los resultados entre 24, 48 y 72 horas, tanto para el ezetimibe (figura 4) como para el VPA (figura 5), los valores y la tendencia de viabilidad se mantienen constantes, demostrando así que la viabilidad celular solo se ve afectada por la concentración de los fármacos independientemente al tiempo de tratamiento.




.

**Figura 4.** *Gráficas de viabilidad celular de las células Huh7 después del tratamiento con ezetimibe por **(A)** 24 horas, **(B)** 48 horas y **(C)** 72 horas en concentraciones de 0.39, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 μM, usando el ensayo de resazurina para la evaluación de la viabilidad. Los resultados son mostrados como los promedios ± desviación estándar de 3 experimentos independientes.*

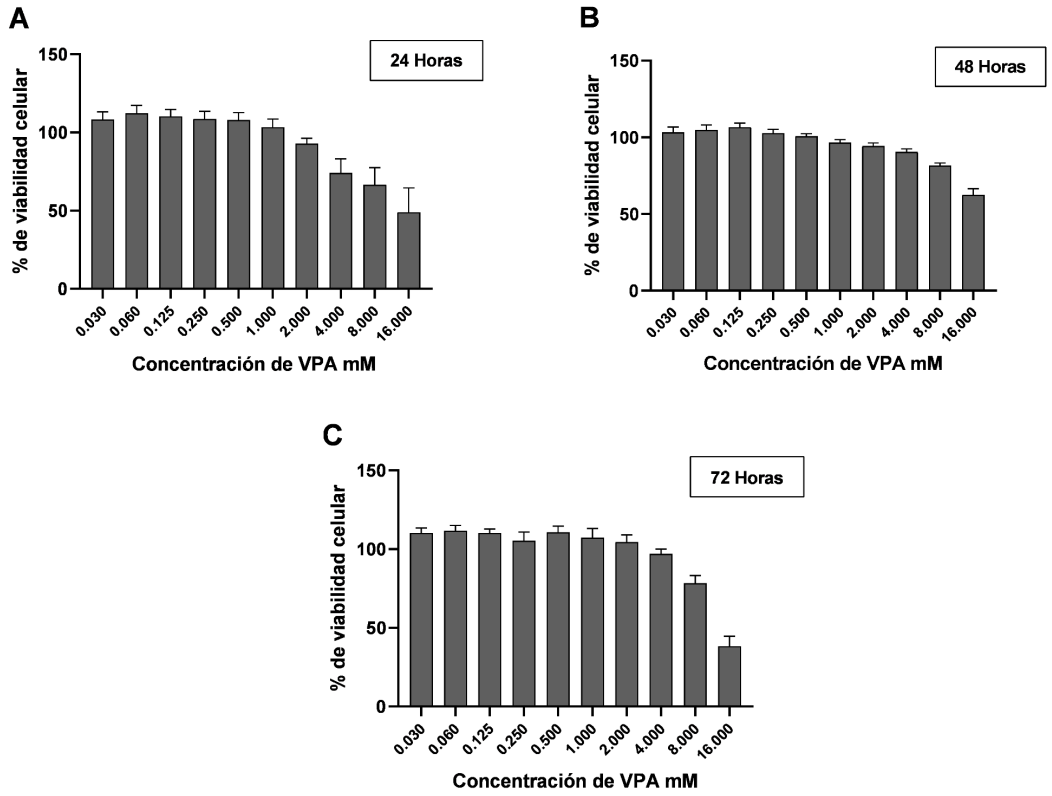



**Figura 5.** *Gráficas de viabilidad celular de las células Huh7 después del tratamiento con VPA por **(A)** 24 horas, **(B)** 48 horas y **(C)** 72 horas en concentraciones de 0.030, 0.060, 0.125, 0.25, 0.50, 1, 2, 4, 8 y 16 mM, usando el ensayo de resazurina para la evaluación de la viabilidad. Los resultados son mostrados como los promedios ± desviación estándar de 3 experimentos independientes.*

Estos resultados sugieren que la viabilidad celular no se altera significativamente cuando se usa ezetimibe hasta una concentración máxima de 25 µM hasta por 72 horas. Por otro lado, cuando se usa VPA, la viabilidad celular se observa disminuida a partir de una concentración de 4 mM a las 24 horas, sin embargo, las células parecen seguir un proceso de recuperación ya que a esta concentración y a 8 mM luego de 48 y 72 horas de tratamiento, la viabilidad celular se incrementa hasta ubicarse por encima del 70%. Es por esto que para el VPA se seleccionaron concentraciones de trabajo de 8, 4, 2, 1, 0.5 y 0.25 mM; mientras que para el ezetimibe, se seleccionó la concentración de 25 µM siendo esta la única concentración utilizada al tratarse de un control positivo.

Con base a lo anterior, se hizo la estandarización del proceso de cuantificación de colesterol celular usando el kit Red Amplex Cholesterol Assay, partiendo del ezetimibe a una concentración de 25 µM, en donde las células Huh7 se sembraron en placas de 6 pozos a una

densidad celular de 1’500,000 células/pozo, en dicho experimento se lisaron las células directamente con buffer RIPA y se recuperó el sobrenadante del cual, por un lado, se realizó una cuantificación de proteínas, este es un proceso de gran importancia debido a que al trabajar con líneas celulares que están en constante replicación, es posible que existan variaciones en las concentraciones de sus metabolitos y en este caso, al tener como objetivo la cuantificación de la concentración de colesterol es importante asegurar que las variaciones no sean dadas por la replicación celular, sino por los efectos de los tratamientos o de la infección realizada con el virus dengue (O’Ruke, M. et al); adicionalmente, al tratarse de células adherentes, estas se someten a diferentes procesos para lograr su desprendimiento y asegurar la correcta preparación de las muestras, sin embargo, es posible que durante dichos procesos, puedan verse alterados las concentraciones de los metabolitos a causa de errores en el pipeteo o deficiencias en el desprendimiento celular (Silva, L.P. et al. 2013); por estas razones, es necesario hacer una medición de la cantidad de proteínas en cada una de las muestras con el fin de normalizar los datos, asegurando que los resultados en las variaciones en las concentraciones de colesterol son atribuidas únicamente a las variables que se analizaron.

Por otro lado, el sobrenadante recuperado de la lisis celular también fue usado para la preparación de las muestras, con las cuales se realizó la cuantificación de colesterol con el kit, teniendo en cuenta que para ello se realizaron tres diluciones distintas, 1:2, 1:4 y 1:8, haciendo la lectura a un tiempo constante de 24 horas de tratamiento con ezetimibe, dichos factores de dilución fueron tomados como el primer parámetro para llevar a cabo el proceso de estandarización. Con base a los resultados de la tabla 2, es posible evidenciar que a partir de 1’500,000 células, las Unidades Relativas de Fluorescencia (URF) de la mayoría de las muestras estuvieron por encima de las URF correspondientes a la concentración máxima del estándar de colesterol empleado para construir la curva de calibración (Figura 6), el cual presentaba una fluorescencia de 2817.

**Tabla 2.** *Resultados del experimento de estandarización de colesterol en la variación del factor de dilución, respecto a la concentración de colesterol (µM) y las Unidades Relativas de Fluorescencia (URF) correspondientes a las células no tratadas y tratadas con ezetimibe 25 µM.*

| Factor de dilución | Células no tratadas con ezetimibe | | Células tratadas con ezetimibe | |
|---|---|---|---|---|
| | Concentración de colesterol (µM)* | URF | Concentración de colesterol (µM)* | URF |
| 1:2 | 110,25 | 3875 | 161,99 | 8715 |
| 1:4 | 92,3 | 3229 | 20,75 | 1033 |
| 1:8 | 28,09 | 916 | 2,79 | 56 |

*La concentración de colesterol corresponde al resultado obtenido previo a la corrección por el factor de dilución

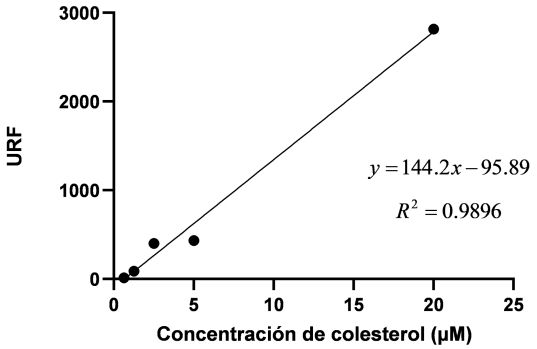



**Figura 6.** *Curva de calibración estándar de la fluorescencia emitida respecto a la variación de concentraciones de colesterol entre 0.625 a 20 µM para el primer ensayo de estandarización del proceso de cuantificación de colesterol.*

Con el fin de obtener resultados cuyas unidades relativas de fluorescencia se pudieran interpolar en la curva de calibración se contemplaron dos opciones distintas, una de ellas manteniendo la misma cantidad de células aumentando el factor de dilución o por el contrario disminuir la cantidad de células manteniendo los mismos factores de dilución. En este caso, se optó por disminuir la cantidad de células debido a que con esto se garantizó el uso de una menor cantidad de inóculo viral, así como células y reactivos poco disponibles en el laboratorio, así pues, se partió de una densidad celular de 50000 células por pozo con un factor de dilución 1:2 con el que se aseguró una mayor concentración de colesterol que pudo ser cuantificada, esto se realizó en placas de 24 pozos contemplando tiempos de tratamiento de 24, 48 y 72 h, siendo de esta forma, el tiempo el segundo parámetro evaluado en la estandarización del

proceso. Lo anterior fue suficiente para asegurar que las URF de las muestras fueron menores que la concentración máxima del estándar de colesterol empleado para construir la curva de calibración en todos los tiempos.

Se determinó que el tiempo era un factor determinante durante el experimento y es por ello que se decidió trabajar únicamente a un tiempo de 48 horas, en el que las células se encuentran en la confluencia adecuada debido a que su tiempo de duplicación celular es de aproximadamente 24 horas (Jang, J.W. et al. 2016), así como también, es el tiempo suficiente para que el virus infecte a las células y a su vez se evite la muerte celular inducida por dicha infección, adicionalmente este tiempo fue el mismo evaluado en el estudio realizado por Osuna-Ramos, J.F. et al. en el año 2017. No obstante, los resultados respecto a las muestras no fueron del todo congruentes entre los tres tiempos, esto puede ser explicado debido a que no hubo un desprendimiento idóneo de las células, puesto a que en los diferentes pozos quedaron adheridas gran cantidad de células de manera variable, lo que ocasionó que las concentraciones de colesterol no tuvieran coherencia impidiendo evidenciar un aumento o disminución de dicha concentración tras el tratamiento con el ezetimibe.

Después de la estandarización, se llevó a cabo un experimento con las células infectadas y no infectadas para la cuantificación del colesterol, la cuantificación de la replicación viral y la determinación de la expresión del gen del receptor NPC1L1. Para dicho experimento, teniendo en cuenta los resultados que se obtuvieron en la estandarización, se decidió tripsinizar las células previo a la adición del buffer RIPA con el fin de asegurar un desprendimiento total de las células en cada uno de los pozos, atribuyendo las concentraciones de colesterol únicamente a los tratamientos y la infección de las células, adicionalmente después de la lisis celular con el buffer RIPA, se aumentó la fuerza de centrifugación la cual en los experimentos de estandarización fue de 10000 rpm por 10 minutos, optando por aumentar la velocidad a 14000 rpm por un tiempo de 15 minutos para asegurar una adecuada separación de componentes celulares del sobrenadante y facilitar su separación del pellet garantizando unos resultados aún más acertados.

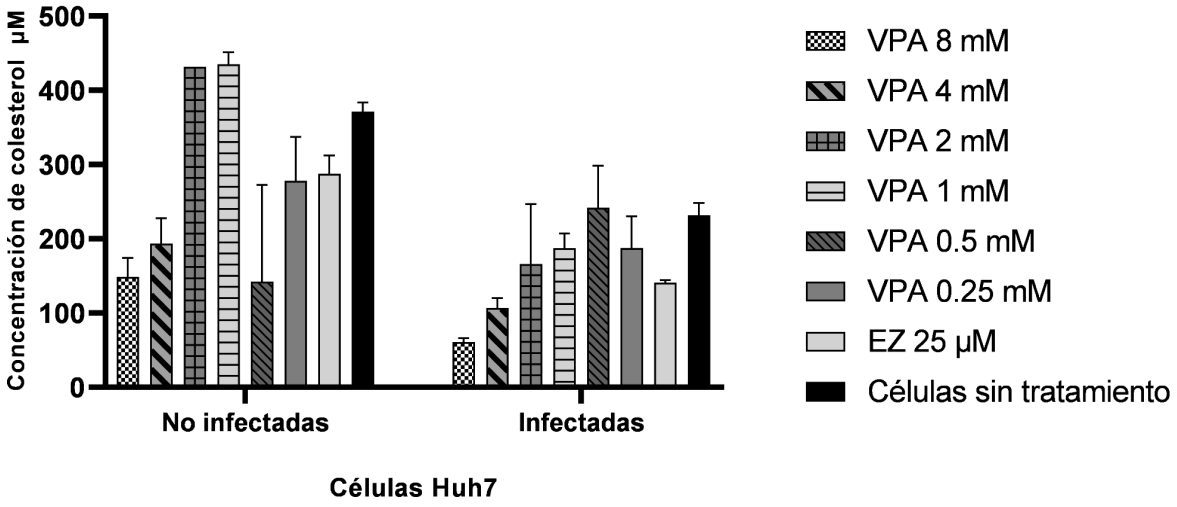



**Figura 7**. *Gráfica de la variación de la concentración de colesterol evaluada con el kit Amplex Red Cholesterol Assay, en células Huh7 no infectadas e infectadas con el virus Dengue, con un tiempo de tratamiento de 48 horas con ezetimibe 25 µM y VPA a 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 mM. Los resultados son mostrados como los promedios ± desviación estándar de 3 experimentos independientes.*

Teniendo en cuenta las modificaciones realizadas, se tiene como primera medida la cuantificación de colesterol con el Red Amplex Cholesterol Assay Kit cuyos resultados se evidencian en la figura 7, en principio se corrobora lo que fue planteado por Osuna-Ramos, J.F. et al en el 2017 puesto que las concentraciones de colesterol tras la infección con virus dengue y el tratamiento con ezetimibe 25 µM, se redujeron desde 231.8 µM (células no tratadas) hasta 141.2 µM (células tratadas con ezetimibe) en células infectadas y desde 371.6 µM (células no tratadas) hasta 287.8 µM (células tratadas con ezetimibe) en células no infectadas. Por otra parte, al analizar el estado basal de las células antes y después de la infección, se observa una disminución de los niveles de colesterol celular desde 371.6 µM hasta 231.8 µM, lo cual puede ser explicado debido al gasto del colesterol que ocurre mientras se da la infección viral y que le permite al virus su replicación. Para el caso del VPA, como se evidencia en la Figura 7, la reducción de los niveles de colesterol es aún más representativa en las mayores concentraciones de VPA (8 mM y 4 mM), puesto que se ve una disminución proporcional de dichos niveles antes y después de la infección, mientras que al trabajar con concentraciones menores o iguales a 2 mM, la reducción que se evidencia no es proporcional e incluso en algunos casos en lugar de disminuir se tiene un aumento en la concentración de colesterol, por

lo que lo más posible, es que estas concentraciones no sean suficientes para generar un efecto sobre los niveles de colesterol.

Adicional a la cuantificación de colesterol celular, la replicación viral y la expresión del gen NPC1L1 se realizó mediante pruebas de PCR en tiempo real, esta puede hacerse de dos maneras, por un lado la cuantificación relativa la cual se basa en los cambios fisiológicos de la expresión relativa de un gen de interés, en comparación con un gen de referencia que no se ve afectado por las condiciones. Por otro lado la cuantificación absoluta que se basa en el uso de una curva de calibración sobre la cual se puede hacer una interpolación para determinar una incógnita en función de alguna cantidad conocida (Pfaffl, M.W. 2001).

Respecto a la replicación viral, esta se evaluó mediante la producción de genoma viral expresada a través del número de copias virales usando la qRT-PCR con una cuantificación absoluta, en donde se realizó una curva de calibración estándar evidenciada en la figura 8, y con base en la ecuación de la recta de dicha curva fue posible calcular el número de copias virales de tal manera que como se observa en la figura 9, se tuvo una tendencia de disminución del número de copias tras el tratamiento con VPA y ezetimibe, sin embargo, dicha tendencia no fue estadísticamente significativa puesto que no se inhibió en más de un logaritmo del número de copias para ninguno de los casos.

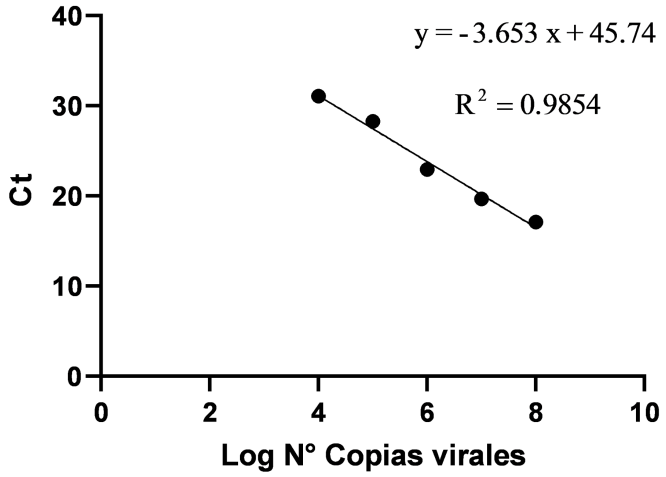



**Figura 8.** *Curva estándar por qRT-PCR para la cuantificación de carga viral*

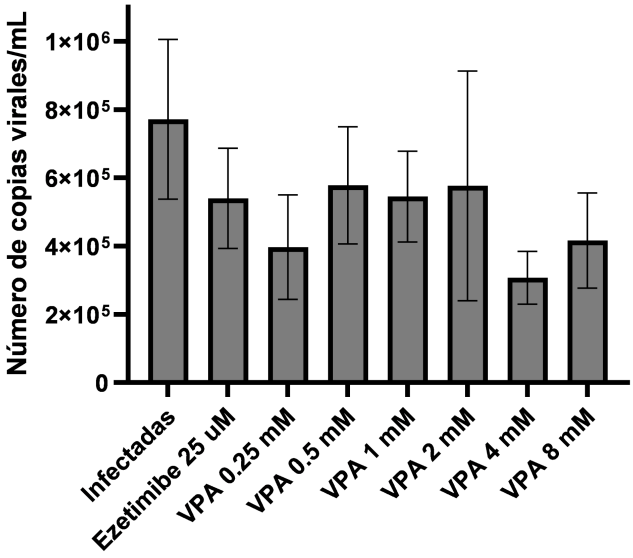



**Figura 9.** *Evaluación del número de copias virales de DENV-2 en células Huh7 infectadas y tratadas con VPA a concentraciones de 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 mM y ezetimibe a 25 μM como control positivo. Los resultados son mostrados como los promedios ± desviación estándar de 3 experimentos independientes.*

Al comparar esto con los resultados obtenidos por Osuna-Ramos, J.F. et al. 2017, respecto al ezetimibe se evidencia que hay una disminución estadísticamente significativa, en la que dicho fármaco a una concentración de 25 μM disminuye el número de copias virales en más de dos logaritmos y de igual manera en el estudio realizado por Silva-Aguilera, M.Y. et al en el 2020, el VPA a una concentración de 8 mM reduce el número de copias virales en mayor medida que los resultados obtenidos en este experimento. La explicación en la variabilidad de los resultados está dada por una posible disminución de la capacidad infecciosa del virus utilizado en el laboratorio, que también se ha evidenciado en diferentes investigaciones realizadas en el grupo de virología de la Universidad el Bosque, en donde lo más probable es que gran parte del virus no lograba realizar de manera adecuada la endocitosis sino que por el contrario permanecía en la membrana celular por lo cual no se replica y por ende los tratamientos no disminuyen significativamente las copias virales. Dicho de otra forma, lo que le ocurre al virus puede compararse con el funcionamiento de una vacuna viva atenuada, debido a que se cuenta con un inóculo viral que se encuentra debilitado, esto ocurre puesto a que se ha utilizado el mismo virus para realizar infecciones virales en diferentes cultivos celulares, cambiando de esa forma su secuencia genómica y por ende no tiene la capacidad suficiente para generar una infección (Wodi, A.P et al. 2021).

Para el análisis de la expresión del receptor NPC1L1 se utilizó una qRT-PCR con una cuantificación relativa, en donde se usó como gen de referencia la β-actina, así pues, para esta cuantificación fue necesario calcular las eficiencias de cada reacción mediante el programa LinRegPCR y con base en ello se determinó la variación en la expresión del receptor respecto a las células sin tratamiento, para ambos grupos celulares (células infectadas y no infectadas), como se observa en la figura 10. Previo a lo anterior, se corroboró la selectividad de la secuencia de los primers utilizados para la amplificación del gen NPC1L1, por medio de células Caco-2 las cuales se usaron como un control puesto que dicho gen se expresa en mayor medida en células del intestino delgado de especies mamíferas, por lo que esta línea celular, al ser del intestino es una selección idónea para evaluar la expresión adecuada del gen (Betters, J. et al. 2010).

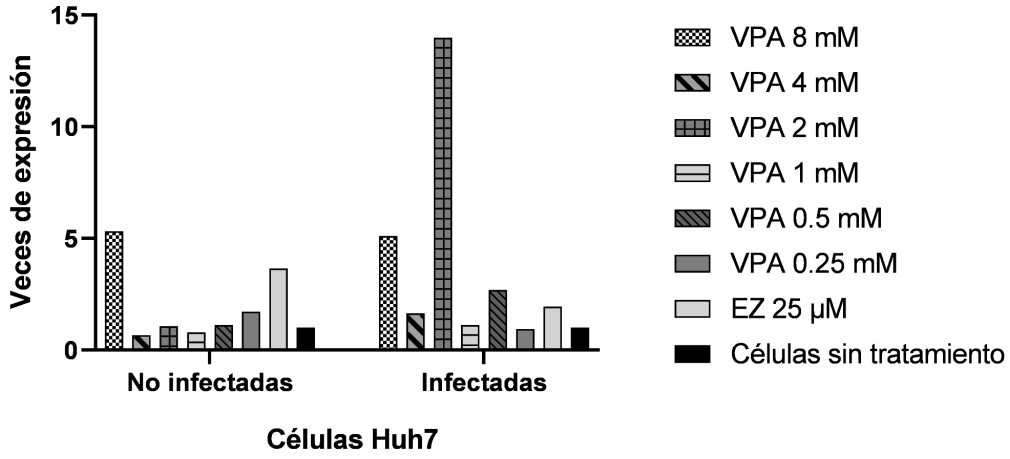



**Figura 10.** *Evaluación de los cambios de la expresión del receptor NPC1L1 en células Huh7 realizada con el modelo matemático planteado por Pfaffl, M.W en el año 2001, comparando células infectadas con DENV-2 y no infectadas, ambos grupos celulares tratados con VPA (8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 mM) y ezetimibe 25 µM a 48 horas y con un grupo de control de células sin tratamiento.*

De acuerdo a lo que se observa en la figura 10, después de haber tratado las células infectadas y compararlas con las no infectadas, es posible evidenciar que hay una alteración en la expresión del receptor NPC1L1 durante la infección con virus dengue, sin embargo, dichas alteraciones no muestran un comportamiento dependiente de la concentración, debido a que no se evidencia un aumento o una disminución constante en la expresión. En el caso del ezetimibe, al ser usado como control positivo y al comparar las células sin tratamiento con las células tratadas con dicho control a una concentración de 25 µM, se corrobora su efecto sobre el receptor NPC1L1, mediante un aumento en la expresión de este gen.

Con base en todos los experimentos que se llevaron a cabo, es posible dar respuesta a la hipótesis propuesta en un inicio en donde se planteó que el efecto antiviral del VPA durante la infección con el virus dengue se da por una alteración en los niveles de colesterol celular a través de modificaciones en la expresión génica del receptor NPC1L1, para comprobarlo, es necesario hacer una correlación de los experimentos de cuantificación de colesterol, infección viral y expresión del gen con el fin de evidenciar los cambios que se puedan generar a nivel celular. Así pues, como se evidencia en la tabla 3, en primer lugar, el tratamiento con VPA tiende a disminuir el número de copias virales indicando un efecto durante la infección viral, esto lo hace mediante la reducción de los niveles de colesterol, puesto que en condiciones normales (células infectadas sin tratamiento) el virus dengue requiere de altos niveles de colesterol que le permitan su endocitosis y la formación de la vesícula que lo transporta intracelularmente al retículo endoplasmático, en donde se generan las copias virales y se replica el virus, así pues, al reducir los niveles de colesterol por el tratamiento con VPA el virus ya no tiene la facilidad de replicarse y por ende disminuye el número de copias virales. Así mismo, para el caso del receptor NPC1L1 se ve un aumento en su expresión después de tratar las células con VPA, esto se evidencia mayoritariamente en las concentraciones más altas del fármaco (8 y 4 mM), lo que podría indicar que a concentraciones menores o iguales a 2 mM no se tiene un efecto significativo y esto se corrobora con las mediciones de colesterol ya que como se observa en la figura 7, desde la concentración de VPA 2 mM no se mantiene la misma tendencia en la disminución de los niveles de colesterol y de igual manera el número de copias virales en dichos valores de concentración, no se redujo en la misma medida que las concentraciones de 4 y 8 mM. Cabe resaltar que respecto al receptor NPC1L1, en este caso sólo se evaluó la expresión génica, por lo que solo se contempla la transcripción del gen y teniendo en cuenta esto, no se está considerando la traducción del mismo a proteína, por lo que en este caso todas las mediciones son indirectas y no se tiene certeza del comportamiento del receptor en sí durante la infección viral y el tratamiento con VPA.

**Tabla 3**. *Resultados de los experimentos de cuantificación de colesterol, infección viral y expresión del receptor NPC1L1 en células Huh7 infectadas con el virus DENV-2.*

| | Número de copias virales | Concentración de colesterol (µM) | Veces de expresión del gen NPC1L1 |
|---|---|---|---|
| VPA 8 mM | 4.16E+05 | 61.186 | 5.105 |
| VPA 4 mM | 3.07E+05 | 106.937 | 1.638 |
| VPA 2 mM | 5.76E+05 | 165.961 | 13.984 |
| VPA 1 mM | 5.45E+05 | 187.237 | 1.120 |
| VPA 0.5 mM | 5.78E+05 | 241.881 | 2.693 |
| VPA 0.25 mM | 3.97E+05 | 187.905 | 0.945 |
| Ezetimibe 25 µM | 5.40E+05 | 141.230 | 1.947 |
| Células infectadas sin tratamiento | 7.71E+05 | 231.769 | 1 |

Para finalizar, tras corroborar los efectos antivirales del VPA mediante la disminución en los niveles de colesterol, es importante revisar los antecedentes respecto a los estudios de fase I realizados del VPA, ya que al tratarse de una estrategia de reposicionamiento de fármacos, se está planteando una nueva indicación de tratamiento, por lo que es importante considerar efectos secundarios relacionados al mecanismo de acción principal del VPA, es decir, los efectos que puede generar en un paciente sin afecciones neurológicas la administración de un fármaco anticonvulsivante. Así pues, con base en la evidencia registrada en el estudio de fase I realizado por Georgoff, P. et al en el año 2018 se demostró que los efectos adversos en pacientes sanos fueron leves, tales como dolor de cabeza, náuseas y escalofríos, además, no se observaron anomalías respecto a la seguridad de los pacientes.

# 8. Conclusiones

En este trabajo se verificó la actividad antiviral del VPA durante la infección con el virus dengue mediante la alteración de los niveles de colesterol intracelular y de la expresión del receptor NPC1L1. En primer lugar, se determinaron las condiciones óptimas para cuantificar el colesterol con el Amplex Red Cholesterol Assay kit evidenciando los mejores resultados a un tiempo de 48 horas con un factor de dilución de las muestras de 1:2 asegurando que en los procesos de preparación se garantice un desprendimiento total de las células de cada pozo con tripsina previo a la lisis celular.

Así mismo se determinó una reducción del número de copias virales en células infectadas con DENV-2 y tratadas con VPA debido a la reducción de la concentración del colesterol intracelular y el aumento de la expresión del gen NPC1L1, dicho efecto fue mayoritariamente evidenciado al usar concentraciones de VPA de 8 y 4 mM.

Basados en estos resultados, se concluye este trabajo con resultados prometedores para futuras investigaciones acerca del tratamiento farmacológico del virus dengue, por medio del reposicionamiento de fármacos, por lo cual, queda abierta la posibilidad de evaluar el efecto del VPA sobre las concentraciones de colesterol en otros virus de envoltura, con el fin de corroborar su efecto antiviral.

# 9. Recomendaciones

- Para complementar los resultados obtenidos se considera importante evaluar profundidad las concentraciones de VPA en las que durante el estudio se evidenció el efecto antiviral, ampliando el rango a concentraciones de 4, 6, 8,10, 12 y 14 mM asegurando que no se afecte la viabilidad celular.
- En cuanto a la infección viral se recomienda hacer uso de un nuevo inóculo viral del cual se tenga la certeza de la capacidad infecciosa, de igual forma sería conveniente evaluar otros virus de envoltura, como el Zika en donde se aseguren mecanismos similares de infección para corroborar que el efecto antiviral del VPA está dado por la disminución de los niveles de colesterol intracelular.
- Se considera importante usar el ezetimibe como control positivo a una concentración mayor para poder evidenciar el efecto antiviral y las variaciones en las contracciones de colesterol de forma más significativa.
- Para el análisis de resultados se recomienda aumentar el número de réplicas de los experimentos para incrementar la estadística y asegurar resultados más robustos.
- Se recomienda usar técnicas de Western Blot para realizar una medición directa de la traducción del gen NPC1L1 a proteína, y de esta manera evaluar con exactitud el aumento o la disminución de dicho receptor durante la infección.

# 10. Referencias bibliográficas

Alcaide-García, J., Gutierrez-Calderón, V., Benavides-Orgaz, M. (2006). Fármacos

anticonvulsivantes. Dispublic (Ed.), Sociedad Española de Oncología Médica (pp. 37–56).

Bacallao-Martínez, G. C., Quintana-Morales, O. (2013). Dengue. Revisión bibliográfica. Acta Médica Del Centro, 7(1).

Beita-Jiménez, J., Salazar-Arias, N., Valverde-Gómez, M. (2016). Patogénesis de la enfermedad por virus del dengue. Revisión de la literatura. Revista Clínica Escuela de Medicina UCR-HSJD, 6(2), 11–17.

Betancourt-Cravioto, M., Falcón-Lezama, J. A. (2020). Arbovirus y salud pública. Ciencia, 71(1), 8.

Betters, J. L., & Yu, L. (2010). NPC1L1 and cholesterol transport. FEBS Letters, 584(13), 2740–2747. Portico.

Davies, J. P., Scott, C., Oishi, K., Liapis, A., & Ioannou, Y. A. (2005). Inactivation of NPC1L1 Causes Multiple Lipid Transport Defects and Protects against Diet-induced Hypercholesterolemia. Journal of Biological Chemistry, 280(13). 12710–12720.

Delgado, F.G., Cárdenas, P., & Castellanos, J.E. (2018). Valproic Acid Downregulates Cytokine Expression in Human Macrophages Infected with Dengue Virus. Diseases, 6(3), 59. MDPI AG.

Georgoff, P., Nikolian, V.C., Bonham, T., Pai, M., Tafatia, C., Halaweish, I., To, H., Watcharotone, K., Parameswaran, A., Luo, R., Sun, D. Alam, H. Safety and Tolerability of Intravenous Valproic Acid in Healthy Subjects: A Phase I Dose-Escalation Trial. Clin Pharmacokinet 57, 209–219 (2018).

Ghodke, Y., Thorn, C. F., Lamba, J. K., Leeder, J. S., Song, W., Birnbaum, A.K., Klein, T. E. (2013). Valproic acid pathway: pharmacokinetics and pharmacodynamics. Pharmacogenetics and genomics, 23(4), 236–241.

Invitrogen. (2010). Amplex® Red Cholesterol Assay Kit. In Thermofisher. Recuperado de: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp12216.pdf

Ivanec-Goranina, R., Kulys, J. (2008). Kinetic study of peroxidase-catalyzed oxidation of 1-hydroxypyrene. Development of a nanomolar hydrogen peroxide detection system. Central European Journal of Biology, 3(3), 224–232.

Jang, J.-W., Song, Y., Kim, K. M., Kim, J.-S., Choi, E. K., Kim, J., & Seo, H. (2016). Hepatocellular carcinoma-targeted drug discovery through image-based phenotypic screening in co-cultures of HCC cells with hepatocytes. BMC Cancer, 16(1).

Kawamoto, M., Yamaji, T., Saito, K., Shirasago, Y., Satomura, K., Endo, T., Fukasawa, M., Hanada, K., & Osada, N. (2020). Identification of Characteristic Genomic Markers in Human Hepatoma HuH-7 and Huh7.5.1-8 Cell Lines. Frontiers in Genetics, 11(October), 1–10.

Laredo, T., Bocanegra, G., Viridiana, S., Guo, X. (2012). Virus del dengue: estructura de serotipos y epidemiología molecular. CienciaUAT, 6(3),27-33.

Lee, C.J., Lin, H.R., Liao, C.L., Lin, Y.L. (2008). Cholesterol Effectively Blocks Entry of Flavivirus. Journal of Virology, 82(13), 6470–6480.

Martínez-Lazcano, M. T., Esplá-González, S., Herraiz-Robles, P., Hernández-Pérez, P., Chillerón-Cuenca, R., Pol-Yanguas, E. (2015). Use of valproic acid in long stay units of psychiatry. Farmacia Hospitalaria : Organo Oficial de Expresion Cientifica de La Sociedad Espanola de Farmacia Hospitalaria, 39(2), 92–101.

OMS. (2022). Dengue y dengue grave. Organización Mundial de La Salud. Recuperado de: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue

OPS. (2015). DENGUE Guías para la atención de enfermos en la región de las Américas (Organización Panamericana de la Salud, Ed.; 2nd ed). Recuperado de: https://www.paho.org/hon/dmdocuments/Guia%20Dengue%20OPS%202016.pdf

OPS. (2021). Actualización Epidemiológica Resumen de la situación Dengue. 1–6. Recuperado de: https://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/2021_DIC_EpiUpdate_Dengue%2C

chikunguna y Zika_COVID_SP.pdf

O'Rourke, M. B., Town, S. E. L., Dalla, P. V., Bicknell, F., Koh Belic, N., Violi, J. P., Steele, J. R., & Padula, M. P. (2019). What is Normalization? The Strategies Employed in Top-Down and Bottom-Up Proteome Analysis Workflows. Proteomes, 7(3), 29.

Osuna-Ramos, J. F. (2017). La inhibición de captación de colesterol por bloqueo del receptor Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) reduce la infección por el virus Dengue en células Huh-7. Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Osuna-Ramos, J. F., Reyes-Ruiz, J. M., & del Ángel, R. M. (2018). The Role of Host Cholesterol During Flavivirus Infection. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 8 (November), 1–12.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic Acids Res. 2001 May 1; 29(9): e45.

Reyes-Tápanes, M., Rodríguez Sánchez, Lorien., Díaz Ojeda, J., Cancino Torres, I. (2021). Arbovirosis emergentes y reemergentes : un enfoque desde la atención primaria de salud. 4(3), 1–18.

Silva-Aguilera, M. Y., Delgado-Tiria, F. G., Morantes-Medina, S. J. (2021). EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ÁCIDO VALPROICO EN LA REPLICACIÓN in vitro DEL DENV-2. Universidad El Bosque.

Silva, L. P., Lorenzi, P. L., Purwaha, P., Yong, V., Hawke, D. H., & Weinstein, J. N. (2013). Measurement of DNA Concentration as a Normalization Strategy for Metabolomic Data from Adherent Cell Lines. Analytical Chemistry, 85(20), 9536–9542.

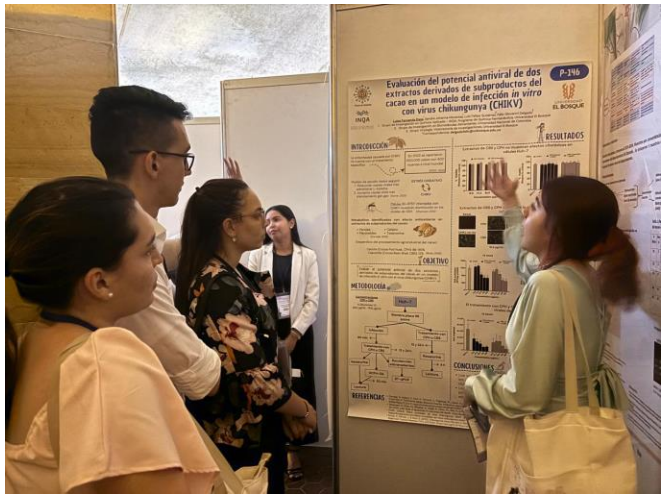
Takahashi, H., Youichi, S. (2017). Cellular Control of Dengue Virus Replication: Role of Interferon-Inducible Genes. In Intech.

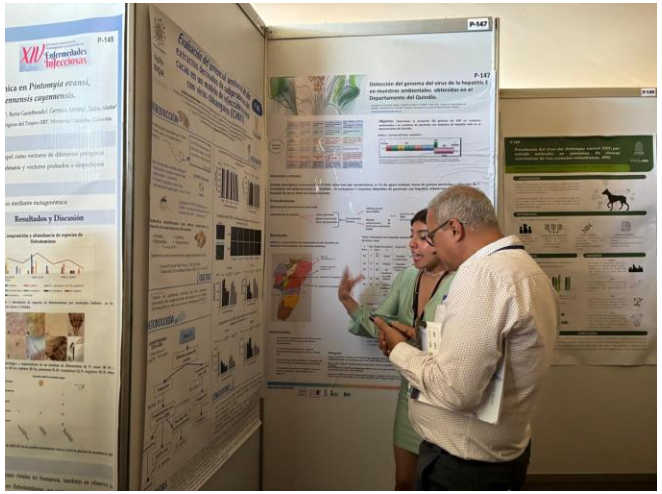
Vázquez-Calvo, A., Saiz, J. C., Sobrino, F., & Martín-Acebes, M. A. (2011). Inhibition of enveloped virus infection of cultured cells by valproic acid. Journal of virology, 85(3), 1267–1274.

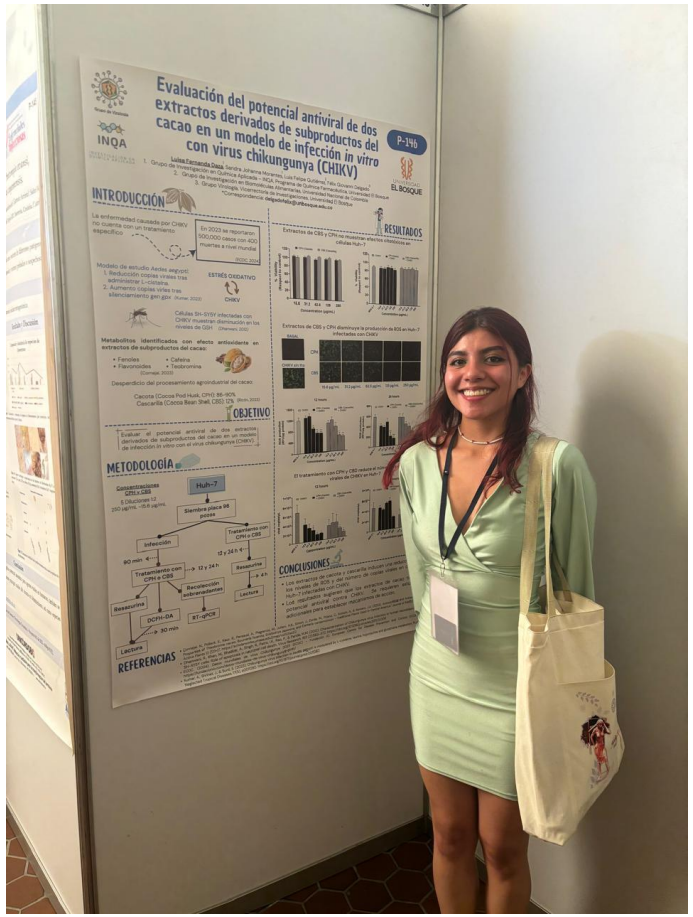
Velandia, M., Castellanos, J. (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo viral. Infectio, 15(1), 33-43.

Wodi, A.P., Moreli V. (2021). Immunology and Vaccine - Preventable Diseases. CDC. Recuperado de: https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/prinvac.pdf

Zambrano, P. (2017). Protocolo de vigilancia en salud pública del Dengue. Instituto Nacional de Salud. (4 ed., Vol. 2). MinSalud.


Evaluación del potencial antiviral de dos extractos derivados de subproductos del cacao en un modelo de infección in vitro con virus chikungunya (CHIKV)
P-146
INTRODUCCIÓN
OBJETIVO
METODOLOGÍA
RESULTADOS
CONCLUSIONES
REFERENCIAS


XIV Enfermedades Infecciosas
P-148
P-147
Resultados y Discusión


Evaluación del potencial antiviral de dos extractos derivados de subproductos del cacao en un modelo de infección in vitro con virus chikungunya (CHIKV)
P-146
INQA
EL BOSQUE
INTRODUCCIÓN
OBJETIVO
METODOLOGÍA
RESULTADOS
CONCLUSIONES
REFERENCIAS