



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD ZACANTENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGENÉISIS MOLECULAR

**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.**

Tesis

Que presenta

Méd. Juan Fidel Osuna Ramos

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Directora de tesis: Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO 8 DE VIROLOGÍA BAJO LA TUTORÍA DE LA DRA. ROSA MARÍA DEL ÁNGEL, PROFESORA E INVESTIGADORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATÓGENESIS MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.

Directora de tesis

Dra. Rosa María del Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres

Asesores

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

Dr. Juan Ernesto Ludert León

AGRADEZCO AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
(CONACyT) POR LA BECA **No. 585292** BRINDADA PARA LA
REALIZACIÓN DE ESTE GRADO Y PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Índice	Página
Índice de figuras	5
Lista de abreviaturas	6
Resumen	7
Abstract	8
Antecedentes	9
Justificación	26
Hipótesis	27
Objetivos	27
Metodología	28
Resultados	33
Discusión	45
Conclusión	48
Perspectivas	48

Índice de figuras

Figura 1. Regiones de endémicas para el virus dengue en el mundo.

Figura 2. Incidencia del promedio anual por cada 100,000 habitantes de FD y FHD para las décadas de 1990-1999 y 2000-2011 en la República Mexicana.

Figura 3. El virión de DENV

Figura 4. Organización del genoma viral.

Figura 5. Topología de la proteína NPC1L1.

Figura 6. Efecto de la localización en membrana celular del receptor NPC1L1 en la infección por DENV.

Figura 7. Viabilidad células con método ioduro de propidio (A) y MTT (B).

Figura 8. Ezetimiba induce un efecto antiviral en células infectadas por DENV.

Figura 9. Ezetimiba induce un efecto antiviral en células infectadas con DENV.

Figura 10. Ezetimiba inhibe la infección por DENV después de la unión y entrada a células Huh 7.

Figura 11. La integridad de complejos replicativos (CR) del virus DENV 2 se altera en células tratadas con ezetimiba.

Figura 12. La infección por virus dengue estimula la acumulación de colesterol celular.

Tabla 1. Características clínicas del dengue (OMS, 2009).

Tabla 2. Las 7 proteínas no estructurales (NS) del virus dengue y su función

Lista de abreviaturas

DENV	Virus dengue
FD	Fiebre por dengue
FHD	Fiebre hemorrágica por dengue
E	Envoltura
C	Cápside
prM	Precursora de membrana
NS	No estructural
ssRNA	RNA de cadena sencilla y polaridad positiva
ORF	Marco de lectura abierto
UTRs	Regiones no traducibles
mRNA	RNA mensajero
RE	Retículo endoplásmico
CR	Complejos replicativo
RER	Retículo endoplásmico rugoso
HDA	Host-directed anti-virals
LDL	Lipoproteína de baja densidad
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
HDL	Lipoproteína de alta densidad
LPV	Lipoviropartículas
HCV	Virus del hepatitis C
LDLr	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
APO A-1	Apolipoproteína 1
HDA	Host-directed anti virals
NPC1L1	Niemman-Pick C1 Like 1
SFB	Suero fetal bovino
BSA	Albúmina de suero bovino
MOI	Multiplicidad de infección
YP	Yoduro de propidio
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio
hpi	Horas post infección
TA	Temperatura ambiente
MOCK	Extracto de cerebro sin virus DENV
UFF/mL	Unidades formadoras de focos/mililitro

Resumen

El dengue es una infección viral sistémica producida por el virus dengue (DENV) miembro de la familia *Flaviviridae* del género *flavivirus*. El serocomplejo del virus dengue (DENV 1 a DENV 4) es transmitido a humanos por mosquitos del género *Aedes*, ocasionando alrededor de 96 millones de infecciones anuales en más de 100 países del mundo. Actualmente no existe una vacuna totalmente eficaz ni un tratamiento antiviral efectivo. Por lo tanto, una vía para superar esta limitación es encontrar blancos terapéuticos que interfieran o inhiban la replicación del DENV en seres humanos. Recientemente se ha demostrado que lípidos como el colesterol y lipoproteínas son importantes para la infección por DENV. Ezetimiba es un fármaco aprobado por la FDA que reduce el nivel de colesterol en seres humanos, inhibiendo la endocitosis de la proteína Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1), un receptor que se expresa en la superficie de la membrana de enterocitos y hepatocitos, responsable de la absorción celular del colesterol. Nuestros resultados sugieren que durante infección con DENV hay un incremento en la cantidad de receptor NPC1L1 en la superficie celular, lo cual correlaciona con un incremento en la cantidad de colesterol. Concentraciones de hasta 50 μM de ezetimiba no afectan la viabilidad celular y son capaces de reducir la cantidad de colesterol celular, el porcentaje de células infectadas, la replicación y la progenie viral, sin tener un efecto en la unión y entrada de DENV.

Abstract

Dengue is a systemic viral infection caused by dengue virus (DENV), a member of the *Flaviviridae* family of the genus *Flavivirus*. The serocomplex of dengue virus (DENV 1 to DENV 4) is transmitted to humans by *Aedes* mosquitoes, causing more than 96 million infections per year in 100 countries around the world. Currently, there is not fully effective vaccine or effective antiviral treatment against DENV infection. Thus, one way to overcome this limitation is to find therapeutic targets that interfere with or inhibit the replication of DENV in humans. Lipids such as cholesterol and lipoproteins have been shown to be important during DENV infection. Ezetimibe is an FDA-approved drug that reduces cholesterol levels in humans by inhibiting the endocytosis of the Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) protein, a receptor that is expressed on the membrane surface of enterocytes and hepatocytes, responsible for the cellular uptake of cholesterol. Our results suggest that during DENV infection an increase in the amount of NPC1L1 receptor on the cell surface was observed, which correlates with an increase in the amount of cholesterol. Concentrations up to 50 μ M of ezetimibe did not affect cell viability and were able to reduce total cellular cholesterol, the percentage of infected cells, viral replication and viral yield, without effecting DENV binding and entry to the Huh-7 cells.

Antecedentes

Introducción

El dengue es uno de los principales problemas de salud pública de países en vías de desarrollo con 2.5 billones de personas en riesgo, principalmente en regiones tropicales y subtropicales del mundo (1). El impacto del dengue es difícil de determinar debido a factores como la inadecuada vigilancia de la enfermedad, dificultad en su diagnóstico y los bajos casos notificados (2).

El virus del dengue (DENV) se transmite por la picadura de mosquitos del género *Aedes aegypti*, sin embargo se ha demostrado que el mosquito de la especie *A. albopictus* se considera un vector secundario (3). La enfermedad por DENV que se caracteriza por tener un amplio espectro clínico incluyendo cuadros asintomáticos así como manifestaciones no graves y graves que suelen ser fatales. El DENV pertenecen a la familia *Flaviviridae* del género *flavivirus* con 4 serotipos (DENV 1-4) (1-5). Ya que el dengue es un síndrome, su evolución clínica depende de la interacción de factores virales, inmunológicos y genéticos del huésped(5).

Actualmente no existe una vacuna totalmente eficaz ni un tratamiento antiviral efectivo. Por lo tanto, una vía para superar esta limitación es localizar blancos terapéuticos que interfieran o inhiban la replicación del DENV en el ser humano(4, 6).

Epidemiología del Dengue

Estudios epidemiológicos indican que el 50% de la población mundial vive en áreas endémicas de dengue. En la figura 2 se observan las regiones del mundo propicias para la transmisión del dengue. Las estimaciones de la incidencia anual global de infecciones por dengue oscila entre 50 millones y 200 millones; sin embargo, estimaciones recientes sugieren que este número se acerca a casi 400 millones y se espera que la expansión del dengue aumente debido a factores como el cambio climático, la globalización, nuevos asentamientos humanos, incremento en viajes, comercio, cambios socioeconómicos y mutaciones en el genoma viral (7).

En la Figura 1 se muestra la distribución geográfica de los casos de dengue reportados hasta el 2011(3).

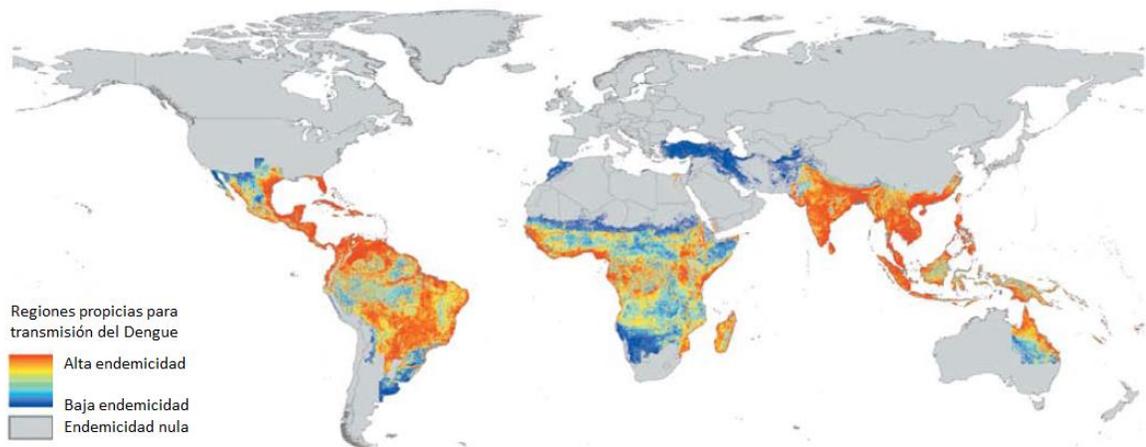


Figura 1. Regiones de endémicas para el virus dengue, modificado de Simons CP.

Dengue en América

El continente americano presenta alta endemicidad de dengue, tal y como se muestra en la figura 1. En 2010 se registraron más de 1.6 millones de casos, de los cuales 49,000 presentaron formas graves de la enfermedad (7).

Dengue en México

En México los primeros reportes de dengue se registraron en 1941 notificándose 6,955 casos. Posteriormente, en 1963 se consideró erradicado gracias a la campaña contra el mosquito *Aedes*. Sin embargo, en 1978 se reintrodujo la enfermedad y aumentó en número de casos a partir de 1980, lo que convirtió al dengue en uno de los problemas actuales más importantes de salud pública a nivel nacional (8).

A partir de su reintroducción, el dengue ha causado cuatro brotes epidémicos: el primero en 1980, en el cual se reportaron 51,406 casos causados por el serotipo DENV 1; el segundo en 1997, con 53,541 casos, de los cuales 980 correspondieron a FHD, con circulación predominante de DENV-3; el tercero en 2007, con 52,369 casos, 9,433 de los cuales correspondieron a FHD, y el cuarto en 2009, con 55,961 casos, de los cuales 11,396 correspondieron a FHD. En los brotes de 2007 y 2009 se observó la circulación predominante de DENV 1 y 2 (8).

Durante la década 1990-1999, el total de casos de dengue reportados fue de 206,797, con una tasa promedio anual de 23.09, y con un número total de casos de FHD de 3,601, con una tasa promedio anual de 0.38. En la década 2000-2011 se reportaron 276,453 casos, con una tasa promedio anual de 21.5. Durante esta década se registró un incremento importante en el número de casos de FHD, con 54,942 casos, lo cual representa una tasa promedio anual de 4.18*. Si bien las tasas de incidencia de dengue se han mantenido constantes durante las últimas dos décadas, los casos de FHD han aumentado de manera importante durante la última década, donde el 20% del total de casos confirmados de dengue corresponde a FHD (8).

Como se muestra en las figuras 2-A y B, la distribución del dengue en las últimas dos décadas se ha mantenido constante, y se ha observado una mayor incidencia en las regiones del Pacífico y Golfo de México, lo cual contrasta con la región central, donde la tasa es muy baja o nula (8).

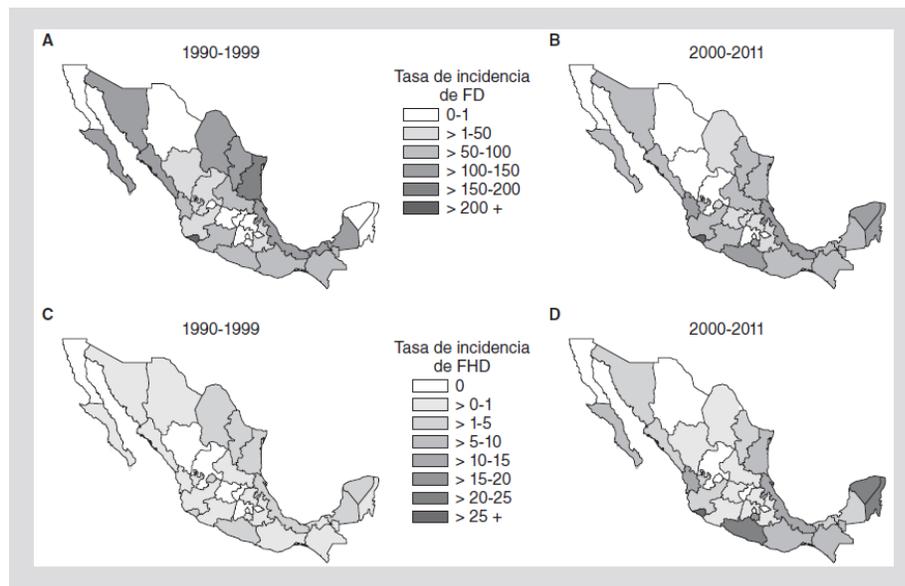


Figura 2. Incidencia del promedio anual por cada 100,000 habitantes de FD y FHD para las décadas de 1990-1999 y 2000-2011 en la República Mexicana. A: FD de 1990 a 1999. **B:** FHD de 2000 a 2011. **C:** FHD de 1990 a 1999. **D:** FHD de 2000 a 2011. *Tasa de incidencia promedio anual por cada 100,000 habitantes. Tomada y modificada de Torres I y cols., 2014.

Presentación clínica del dengue

La infección por DENV es de presentación clínica variable, puede ser auto-limitada y ocasionalmente incapacitante. La variabilidad clínica se relaciona a la respuesta inmunológica del hospedero ante la infección y otros factores como edad, nutrición, enfermedad previa y la virulencia de la cepa viral (1, 3, 4).

Evolutivamente se identifican tres fases de la enfermedad:

Fase febril

Esta fase se caracteriza por el desarrollo de fiebre alta (mayor de 38 °C) y de aparición abrupta con duración de dos a siete días, acompañándose de rubor facial, eritema de la piel, dolor generalizado, mialgias, artralgias y cefalea. Algunos pacientes pueden presentar dolor, eritema faríngeo o conjuntival. También es común la presencia de anorexia, náusea y vómito. Durante esta fase el diagnóstico diferencial con otras enfermedades febriles es difícil, sin embargo es posible con una prueba de torniquete positiva (1).

Los pacientes que mejoran en ésta fase se consideran casos de dengue no grave. Considerándose como casos graves, aquellos que presentan un aumento en la permeabilidad capilar con incremento del hematocrito y avanzan a la fase crítica (3).

Fase crítica

Generalmente dura 24 a 48 horas. En los casos graves, al inicio de la fase crítica generalmente ocurre leucopenia y luego descenso rápido del recuento plaquetario, antes de la fuga plasmática, que varía; dependiendo del grado de extravasación y del volumen de líquidos administrados, puede entonces, detectarse derrame pleural y ascitis, clínicamente o mediante estudios radiológicos o ultrasonográficos (1).

La elevación del hematocrito generalmente refleja la gravedad de la fuga plasmática. El choque sobreviene cuando se pierde un volumen crítico de plasma, a través de la fuga; generalmente, esta situación va precedida de signos de alarma(1, 3).

Si el periodo de choque se prolonga, la hipoperfusión consecuente de órganos vitales resulta en falla orgánica progresiva, acidosis metabólica y

coagulación intravascular diseminada. Esto a su vez, lleva a hemorragia grave que puede disminuir el hematocrito y puede observarse entonces un aumento en la cuenta de leucocitos. La falla orgánica grave, como la hepatitis, la encefalitis o la miocarditis y/o la hemorragia grave, pueden desarrollarse también sin manifestaciones evidentes de fuga plasmática o de choque (1).

Fase de recuperación

Si el paciente sobrevive las siguientes 24 a 48 horas después de la fase crítica, durante la fase de recuperación o convalecencia se da lugar una reabsorción gradual de líquido del compartimiento extravascular, que se traduce en: mejoría y bienestar general, retorno del apetito, desaparición de los síntomas gastrointestinales, estabilización hemodinámica, recuperación de la diuresis, bradicardia, cambios electrocardiográficos, estabilización o disminución del hematocrito, elevación del recuento de leucocitos, recuperación del recuento plaquetario, mejoría de la dificultad respiratoria por derrame pleural masivo, o ascitis masiva (1).

Clasificación del dengue

La gravedad de la infección por dengue se clasifica en dengue grave y dengue no grave, atribuyéndoles un valor pronóstico y por tanto una utilidad en la toma de decisiones de manejo (1).

Dengue no grave.

- a. Sin signos de alarma (Grupo A).
- b. Con signos de alarma (Grupo B).

Dengue grave (Grupo C).

Se caracteriza por uno o más de los siguientes:

- a. Manifestaciones de fuga plasmática.
 - Síndrome de choque por dengue (presión diferencial \leq 20 mm Hg o bien taquicardia y manifestaciones cutáneas de vasoconstricción periférica).
 - Acumulación de líquidos con síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (SIRA), derrame pleural o ascitis.
 - Hemoconcentración: hematocrito elevado o en aumento progresivo.
- b. Hemorragia grave.
- c. Afección cardíaca (cardiomiopatía), renal (insuficiencia renal aguda) o de otros órganos¹.

Signos de alarma:

- Dolor abdominal intenso.
- Vómito persistente o incoercible (mayor de cinco).
- Evidencia clínica de acumulación de líquidos.
- Hemorragia activa en mucosas (ejemplo: tubo digestivo, hematuria).
- Alteraciones neurológicas o del estado de conciencia (letargia, inquietud).
- Hepatomegalia > 2cm (insuficiencia hepática).
- Aumento del hematocrito concurrente con una disminución rápida del recuento plaquetario.

Diagnóstico

Realizar el diagnóstico de dengue es importante para el manejo clínico, la vigilancia epidemiológica y la investigación. Las opciones diagnósticas para dengue incluyen exámenes de laboratorio para confirmar la infección por el virus del dengue que pueden abarcar desde la detección del virus, el ácido nucleico viral, antígenos o anticuerpos o una combinación de estas técnicas. Después de la aparición de la enfermedad, el virus se puede detectar durante cuatro a cinco días en el suero, el plasma, las células sanguíneas circulantes y otros tejidos. Durante las primeras etapas de la enfermedad, se puede usar el aislamiento del virus, la detección del ácido nucleico o el antígeno NS1 para diagnosticar la infección. Al final de la fase aguda de la infección, la serología constituye el método de elección para el diagnóstico. La elección del ensayo depende del momento de la recolección de la muestra y del propósito de la prueba (1, 4).

Tratamiento

Varios factores del huésped y virales se han observado que tienen influencia sobre el fenotipo eventual en la presentación clínica de una infección por DENV. La guía clínica publicada por la OMS en el 2009 indica que dependiendo de las manifestaciones clínicas y de otras circunstancias, los pacientes pueden: ser enviados a casa (grupo A), ser remitidos para manejo hospitalario (grupo B) o requerir tratamiento y remisión urgentes (grupo C) (Tabla 1). El tratamiento actual contra dengue se limita al cuidado y apoyo de medidas generales y en el caso de cuadros graves se limita a la reanimación con fluidos (1).

Tabla 1. Características clínicas del dengue (OMS, 2009).

Fiebre indiferenciada	GRUPO A Dengue no grave, sin signos de alarma	GRUPO B Dengue no grave con signos de alarma	GRUPO C Dengue grave	Criterios de hospitalización
<p>Fiebre Odinofagia Cefalea Rinorrea</p>	<p>Caso probable: Enfermedad febril aguda con dos o más de las siguientes manifestaciones: Cefalea, dolor retro-ocular, mialgias, artralgias, exantema, manifestaciones hemorrágicas, leucopenia; serología de apoyo positiva o bien ocurrencia en localidad y tiempo donde se tengan otros casos confirmados de fiebre por dengue.</p>	<p>Definición de caso de dengue más signos de alarma: Dolor abdominal intenso, vómito persistente o incoercible (mayor de 5), evidencia clínica de acumulación de líquidos, hemorragia activa en mucosas (ejemplo: tubo digestivo, hematuria), alteraciones neurológicas o de alerta (letargia, inquietud), hepatomegalia > 2cm (insuficiencia hepática) y elevación del hematocrito coexistente con disminución en la cuenta de plaquetas.</p>	<p>Definición de caso de dengue más hemorragia grave</p>	<p>Hemorragia espontánea, independientemente de la cuenta de plaquetas. Hemorragia evidente; anemia, cambios en el hematocrito, choque.</p>
	<p>Caso confirmado por laboratorio: - Demostración de evidencia de infección viral aguda mediante: Aislamiento del virus en suero o muestra de autopsia. - Elevación cuatro veces o más de los títulos de IgG o IgM contra algún antígeno del virus determinada mediante ELISA o de antígeno en hígado por inmunoquímica (inmunoperoxidasa) o inmunofluorescencia. - Detección de secuencias genómicas de virus mediante PCR.</p>		<p>Definición de caso de dengue más fuga plasmática grave - Choque - Acumulación de líquidos con insuficiencia respiratoria</p>	<p>Signos y síntomas relacionados con la hipotensión o choque (posible fuga plasmática): Deshidratación, tolerancia inadecuada a los líquidos orales, mareo o hipotensión postural, diaforesis, síncope, postración durante la defervescencia, hipotensión arterial, frialdad de extremidades, derrame pleural, ascitis o engrosamiento vesicular asintomático</p>
	<p>Caso confirmado epidemiológicamente : Un caso probable que ocurre en la misma ubicación y tiempo que un caso confirmado de laboratorio</p>		<p>Definición de caso de dengue más daño a órgano grave</p>	<p>Signos y síntomas de laboratorio relacionados con daño orgánico: Hepatomegalia, dolor en área hepática (aún sin choque), dolor torácico o insuficiencia respiratoria, cianosis, manifestaciones renales (oliguria, hematuria), cardíacas (miocarditis), neurológicas (letargia, delirio, agresividad; encefalitis)</p>
	<p>Definición de caso de dengue más condiciones coexistentes o riesgo social</p>		<p>Condiciones coexistentes Embarazo, infancia o edad avanzada Comorbilidades: Sobrepeso u obesidad (dificultad para un acceso venenoso oportuno en urgencias, diabetes mellitus, hipertensión arterial, úlcera péptica, anemias hemolíticas o de otro tipo, etc. Presencia de riesgo social: vivir solo, hospital inaccesible desde el lugar de residencia, etc.</p>	

El virus dengue

DENV es un virus que pertenece al género *Flavivirus*, de la familia *Flaviviridae* con cuatro serotipos antigénicamente distintos (DENV 1-4). El sero-complejo DENV se transmite entre seres humanos por medio de la picadura de mosquitos del género *Aedes* (*A. albopictus*, *A. aegyptis* etc.) (4). El virus maduro e infeccioso se caracteriza por tener forma esférica o, envuelto, con ~50 nm de diámetro. Está conformado por 10 proteínas, 3 de las cuales son estructurales: la proteína E de 53 kDa, conforma la envoltura viral en forma de dímero y posee 3 dominios estructuralmente distintos, la proteína M de ~8 kDa, que conforma la proteína de membrana, es resultado del procesamiento proteolítico de su forma precursora prM de ~21 kDa. Ambas proteínas se encuentran ancladas a una bicapa de lípidos derivada del retículo endoplásmico (RE) de la célula huésped. Esta bicapa de lípidos rodea a la nucleocápside, la cual está conformada por la proteína C de 11 kDa, que con múltiples copias encapsida el genoma viral (Figura 3) (9, 10).

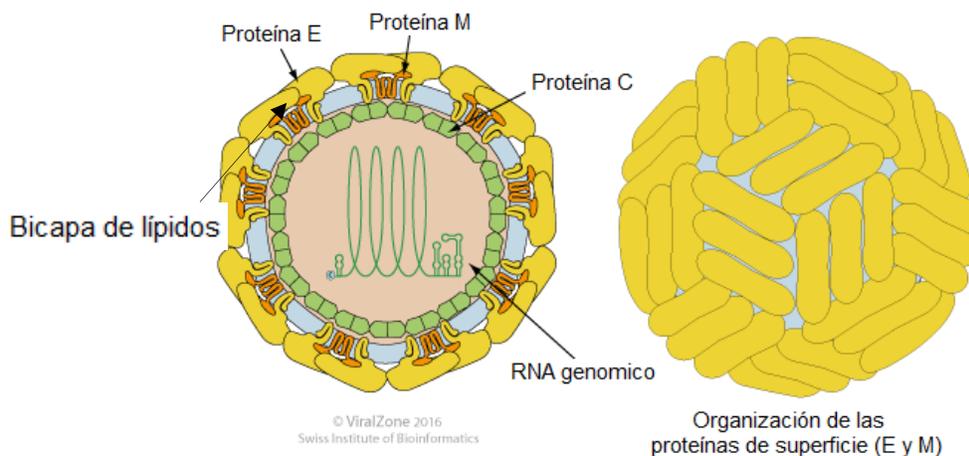


Figura 3. El virión de DENV es envuelto, esférico de aproximadamente 50 nm de diámetro. Las proteínas de superficie están dispuestas en una simetría de tipo icosaédrica. Los viriones maduros contienen dos proteínas de superficie (E y M) codificadas por el virus, mientras que los viriones inmaduros contienen una proteína precursora (prM) (Imagen modificada de Viral Zone ExPASy).

El genoma del DENV es de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva (ssRNA) que contiene aproximadamente 10,700 nucleótidos (~11 Kb). Este RNA monocistrónico codifica para un solo marco de lectura abierto (*ORF*), flanqueado por las regiones 5' y 3' no traducibles (UTRs) (Figura 4) (11).

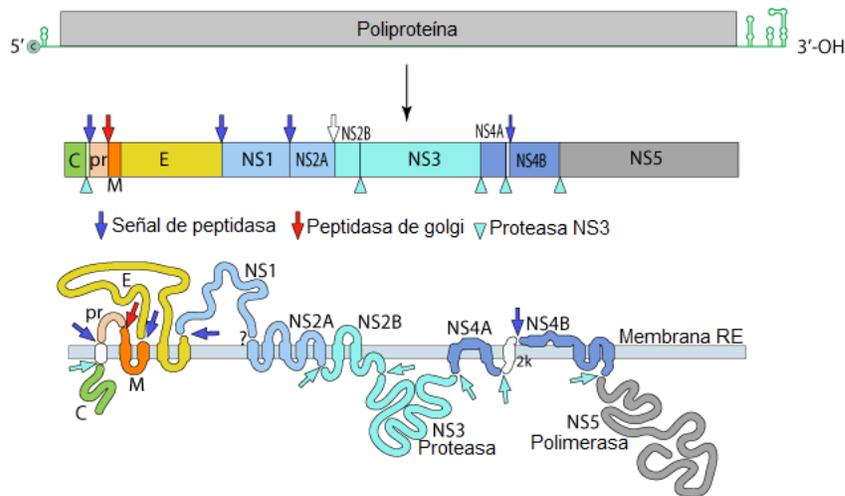


Figura 4. Organización del genoma viral. El RNA del virión de DENV es infeccioso y funciona como el genoma y el RNA mensajero viral. El genoma completo se traduce en una poliproteína, que se procesa co- y post-traduccionalmente por proteasas virales y del huésped.

Cuando el genoma viral es liberado al citoplasma este funciona como RNA mensajero (mRNA) y se traduce en el RE rugoso produciendo una poliproteína de 3,411 aminoácidos que es procesada proteolíticamente. En el extremo N-terminal de la poliproteína se encuentran codificadas las tres proteínas estructurales: C, prM y E; enseguida se encuentran codificadas las siete proteínas no estructurales (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Tabla 2). El genoma requiere circularizarse para poder llevar a cabo la replicación viral, para ello es necesario la presencia de al menos dos pares de las dos regiones conocidas como 3'CS (secuencias de ciclización 5'-3') y 5'-3' UAR (regiones de AUG río arriba 5'-3') (12, 13).

Tabla 2. Las 7 proteínas no estructurales (NS) del virus dengue y su función.

Proteína	Función	Referencias
NS1	Glicolipoproteína monomérica e hidrosoluble, secretada en forma de hexámero soluble y lábil al detergente. Su papel en el ciclo replicativo no ha sido bien esclarecido, pero se ha observado que interacciona en forma de dímero con proteínas ribosomales y otras proteínas virales. Participación en complejos replicativos. Es detectada en el suero de pacientes y en sobrenadantes de cultivos infectados donde sus niveles se correlacionan con la gravedad de la infección.	(14-17)
NS2A	Proteína requerida para el corte proteolítico entre C y NS1, también se sabe que forma parte del complejo de replicación aunque su función exacta se desconoce. Promueve cambios importantes en la membrana, necesarios para la replicación (formación de complejos replicativos).	(15)
NS2B	Cofactor para la función de proteasa.	(15)
NS3	Tiene función de RNA helicasa y serina proteasa pero requiere la presencia de la proteína NS2B.	(15)
NS4A	Promueve cambios importantes en la membrana, necesarios para la replicación (formación de complejos replicativos).	(15)
NS4B	Participa como un asistente en la replicación genoma viral a través de una interacción directa con NS3.	(15)
NS5	Es la proteína más grande y más conservada de las proteínas de DENV cuenta también con dos funciones enzimáticas, por un lado, funciona como metil-transferasa y por otro, como RNA polimerasa.	(15)

Ciclo replicativo del virus Dengue

El primer paso para que ocurra la infección es la unión y entrada del DENV a las células hospederas. En el caso del DENV, se ha descrito que la entrada tanto en células de mosquitos como en la de humanos es a través de endocitosis mediada por clatrina (18). Hasta la fecha, las bases moleculares de la interacción célula y proteínas estructurales del virus que conducen a la entrada del virus aún no están totalmente claros. Sin embargo, se han identificado una serie de receptores celulares específicos para el proceso de entrada viral, tales como son algunos glicosaminoglicanos implicados en la unión inicial. Así como también, diferentes proteínas localizadas en la superficie de células de mamíferos que interactúan con la proteína E tales como las proteínas de choque térmico 90 y 70, GRP78 (BIP), neolactotetraosilceramida, el receptor de lipopolisacáridos CD14, y el receptor 37/67 kDa, de alta afinidad de laminina, lectinas de tipo C, tales como DC-SIGN, la familia de dominio lectina receptor de manosa y de tipo C 5 miembro A (19). Posterior a la entrada y endocitosis, en el endosoma se inicia el proceso de acidificación, lo que conlleva a cambios conformacionales en la estructura del virión que promueve su fusión con la membrana endosomal y la liberación del genoma viral al citoplasma (20). Una vez en el citoplasma, la cadena de RNA sencilla de polaridad positiva (ssRNA (+)) se traduce en una poliproteína, que es escinde en todas las proteínas estructurales y no estructurales. La replicación del genoma ocurre en las membranas del RE, en fábricas virales o complejos replicativos (CR). Después de la traducción y plegamiento de las proteínas individuales, las proteínas NS junto con proteínas celulares inducen invaginación de las membranas en el lumen del retículo endoplásmico rugoso (RER) que están unidas al citoplasma por estructuras similares a un poro (21). En el interior de estas vesículas de membrana ocurre la replicación viral donde la NS5 genera una cadena de polaridad negativa complementaria al genoma viral, la cual es usada como molde para hacer múltiples copias de RNA viral. En el RE también se lleva a cabo la morfogénesis, la proteína C se asocia con el RNA

recién sintetizado y forman la nucleocápside la cual por gemación en el RER adquiere la bicapa de lípidos en la que se encuentran las proteínas estructurales prM y E ancladas, generando así partículas virales inmaduras, que maduran al ser liberadas de la célula por medio de exocitosis.

Antivirales

Hasta el momento, no se ha aprobado ningún fármaco contra el dengue ni existe una vacuna totalmente eficaz para prevenir la enfermedad, pero se están realizando esfuerzos importantes para desarrollar compuestos que se dirigen a afectar factores virales indispensables en la replicación (22, 23). Por otra parte, se han desarrollado estrategias farmacológicas dirigidas a blancos celulares del huésped que pueden tener la ventaja de evitar la resistencia (6). Además la mayoría de estos fármacos están aprobados por la FDA para su uso en el control de otras enfermedades y son denominados antivirales dirigidos al huésped (Host-directed anti-virals (HDAs), en inglés) (6). Estos fármacos se han diseñado para hacer blanco a factores celulares como proteasas, glucosidasas, cinasas y vías de la biosíntesis del colesterol (6, 22).

Lípidos y Dengue

Recientemente se ha demostrado que los lípidos como el colesterol y lipoproteínas ejercen un rol preponderante en la infección por DENV (24, 25) y clínicamente se ha observado que existen cambios en el perfil de lípidos en suero de pacientes infectados (26-29). Existen diversas evidencias que indican que DENV tiene la capacidad de generar un remodelamiento físico y metabólico en las células del huésped, con la finalidad de establecer condiciones óptimas que facilitan su eficiente infección (30). Uno de los mecanismos que modifica es el metabolismo de lípidos y colesterol indispensables durante su ciclo replicativo (25, 31).

En los estudios realizados con pacientes infectados por DENV (29), se ha observado que el nivel de colesterol disminuye, esto posiblemente se debe a

que el incremento en la permeabilidad vascular asociado con la gravedad de la enfermedad permite la fuga de las moléculas de colesterol, resultando en niveles más bajos de colesterol medidos dentro del sistema circulatorio (29). Otras explicaciones posibles para la disminución del colesterol en suero de pacientes infectados por dengue y en particular, dengue grave, incluye la acumulación de lípidos en el hígado donde se observa esteatosis hepática (32), así como por un incremento en la captación de colesterol por los macrófagos derivados de los monocitos, o la absorción del colesterol por las células infectadas por DENV (24). En estudios *in vitro*, utilizando células hepáticas se ha demostrado que durante la infección por DENV aumentan los niveles de colesterol intracelular debido a un incremento en la captación de partículas LDL y a un incremento en la síntesis de *novo* de colesterol por aumento de la actividad de la enzima β -hidroxi- β -metilglutaril-coenzima A (HMG CoA) reductasa (24). Este aumento en la actividad de la reductasa en las células infectadas es debido a la reducción de la actividad AMPK. Así mismo se ha observado que la HMG CoA reductasa se encuentra presente en los complejos replicativos (33). Por otra parte, recientemente se ha descubierto que la proteína estructural de la cápside (Proteína C) del DENV es capaz de interactuar con lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), específicamente con la Apo E (34). Dicha interacción forma lipovirpartículas (LVP), tal como se ha observado con otros flavivirus, como el virus del hepatitis C (HCV) (35). Es posible que las LVP cargadas con partículas virales sean transportadas hacia el espacio extracelular y logren infectar a células vecinas a través de los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLr). El aumento de LDLr durante la infección por DENV se ha demostrado *in vitro* (24), no así la presencia de LVP cargadas con DENV, por lo que la relación directa entre lipoproteínas VLDL y LDLR no se ha determinado completamente. Por otro lado, existe un reporte donde la apolipoproteína A-1 (APO A-1), componente principal de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), interactúa con partículas de DENV a través del receptor SR-BI (36). La suma de estas evidencias hizo posible que se realizará el primer ensayo

clínico para manejo temprano de dengue con lovastatina (37), un inhibidor específico de la HMGCoA reductasa empleado para reducir los niveles de lipoproteínas y colesterol en el suero de pacientes que padecen dislipidemias. Aunque el estudio no fue diseñado para hacer frente a la eficacia contra la enfermedad, no se encontraron pruebas de un efecto beneficioso en cualquiera de las manifestaciones clínicas o en la viremia del dengue. Lo que hace necesario el desarrollo o búsqueda urgente de otros fármacos aprobados que tengan eficacia y estén dirigidos a blancos estratégicos en el metabolismo de lípidos o ciclo viral.

Participación del receptor receptor Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) en la captación y homeostasis del colesterol

En el organismo, las moléculas del colesterol celular derivan tanto de la síntesis *de novo* como de la absorción del colesterol exógeno. Una molécula clave para la absorción y la homeostasis del colesterol en el organismo es la proteína NPC1L1 (Niemman-Pick C1-Like 1), es una proteína de 13 dominios transmembranales, que se encuentra en la superficie apical de los enterocitos y hepatocitos, siendo un receptor responsable de la absorción celular del colesterol (figura 5) (38). Algunas evidencias sugieren que el mecanismo molecular para la absorción del colesterol por el receptor NPC1L1 es dependiente de endocitosis mediada por clatrina (39), y la expresión de la proteína NPC1L1 y su localización en la célula se encuentra en función a la concentración celular del colesterol (40, 41). Cuando la célula censa nivel bajo de colesterol, el receptor es dirigido desde el compartimento de reciclamiento endocítico hacia la membrana plasmática, cerca de un 85% del receptor se encuentra en la membrana ante este estímulo. La internalización del receptor puede ser bloqueada mediante un fármaco, llamado Ezetimiba (41-44). Ezetimiba es un fármaco aprobado por la FDA para disminuir el nivel de colesterol en suero de pacientes con dislipidemia. El mecanismo de acción mediante el cual actúa bloquea la absorción celular del colesterol es

porque tiene como blanco a la proteína receptor Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) (41).

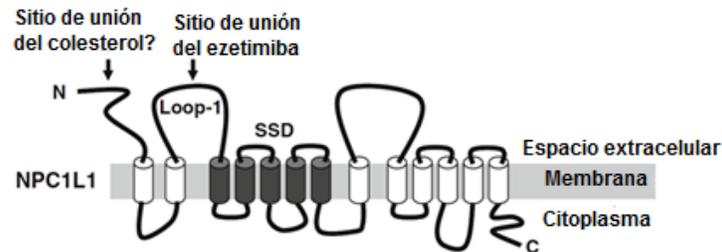


Figura 5. Topología de la proteína NPC1L1. Esta proteína contiene 13 dominios transmembranales y 3 asas extracelulares, donde se encuentra el dominio predicho de unión a esterol (SSD, sterol sensing domine) y el sitio de unión al fármaco ezetimiba.

NPC1L1 y ezetimiba en infecciones virales

Considerando la importancia que tiene el colesterol para que se lleve a cabo adecuadamente la infección por algunos virus, como en el caso de los flavivirus (31) y con el surgimiento de nuevas terapias y fármacos dirigidos a regular el nivel del colesterol en el organismo (43), el tratamiento con ezetimiba logro reducir la infección por virus de hepatitis C en modelo celular e in vivo. También se identificó a la proteína NPC1L1 como un factor para la entrada del virus hepatitis C (45). Posteriormente, se encontró efecto antiviral del ezetimiba sobre infección *in vitro* de hepatitis B en eventos posteriores a la entrada viral (46). Respecto a estudios clínicos realizados con ezetimiba en estas infecciones virales, existe en la literatura el reporte de un paciente que tuvo una reducción en la carga de RNA viral de hepatitis C después del tratamiento con ezetimiba (47). Recientemente se ha reportado el uso de ezetimiba en coadministración con interferón más ribavirina con el fin de mejorar la respuesta antiviral en pacientes obesos con hepatitis C crónica (48).

Justificación

Dengue es la enfermedad viral transmitida por artrópodos más importante a nivel mundial pues presenta una elevada tasa de incidencia. El cuadro clínico del dengue puede evolucionar de una forma leve, fiebre por dengue (FD) hacia la forma grave, fiebre por dengue hemorrágico (FDH) y síndrome de choque por dengue (SCD), que ocasionalmente suele ser fatal. Dado que algunas investigaciones sostienen que el colesterol juega un papel importante en el ciclo replicativo del DENV y que los niveles de lípidos en pacientes infectados por DENV cambian, es pertinente estudiar el efecto de fármacos que regulen la homeostasis del colesterol como ezetimiba sobre la infección por DENV en células hepáticas. El hígado es un órgano blanco de la enfermedad por DENV y además juega un papel importante en la regulación de los niveles de colesterol. Y por otra parte ezetimiba es un fármaco usado desde hace inicios de la década pasada para el tratamiento contra hiperlipidemia en pacientes que no toleran las estatinas que tiene como blanco principal las células hepáticas. Es por ello que el uso de ezetimiba como fármaco antiviral puede ser un blanco prometedor para el tratamiento del Dengue.

Hipótesis

Dado que el colesterol desempeña un papel importante durante la infección viral, la infección por dengue será capaz de modular la localización celular del receptor NPC1L1. Por otra parte, el bloqueo de la captación de colesterol empleando el fármaco ezetimiba, inhibidor del receptor NPC1L1, disminuirá la infección por DENV en células hepáticas humanas Huh-7.

Objetivos

General

Analizar la participación del receptor Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) durante la infección por DENV en células Huh-7

Específicos

1. Determinar la localización del receptor NPC1L1 en células Huh-7 infectadas y no infectadas con DENV
2. Analizar el efecto de ezetimiba en la infección por DENV de células Huh-7

Metodología

Líneas celulares y cepas virales

En este trabajo se utilizó la línea celular derivada de hepatocarcinoma humano Huh-7 (amablemente donada por la Dra. Ana María Rivas, Universidad Autónoma de Nuevo León). Las células se cultivaron a una densidad del 50% con medio DMEM advanced suplementado (medio completo) con glutamina 2 mM, penicilina (5×10^4 U/mL)-estreptomocina (50 µg /ml), suero fetal bovino (SFB) al 8% y 1 mL/L de anfotericina B (Fungizona) en multiplacas para cultivo celular y se crecieron a 37 °C y una atmósfera de CO₂ al 5%.

Los virus empleados para los ensayos de infección fueron DENV serotipo 2 (DENV 2), cepa Nueva Guinea y DENV serotipo 4 (DENV 4), cepa H241. Los virus se propagaron por inoculación intracraneal en cerebros ratones lactantes CD-1 (proporcionados por la Unidad y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL), protocolo número: 0048-02) de 2-3 días de nacidos. A los 4-5 días post-inoculación, los ratones se sacrificaron y el virus se purificó a partir de los cerebros de las crías por medio de maceración, centrifugación y filtración a través de membrana de 0.22 µm. Como control (mock), se utilizaron extractos de cerebros de ratones sin infectar. El título viral se calculó por ensayo de focos.

Tinción y localización celular del receptor NPC1L1

Las células se cultivaron en laminillas en placa de 24 pozos y cuando alcanzaron una confluencia entre 70 y 80% se infectaron con DENV 2. Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído 1% durante 20 minutos a TA a diferentes tiempos post-infección (1, 3, 6 y 12). A continuación, las células se bloquearon con buffer de bloqueo (PBS 1X, SFB 10%, albúmina de suero bovino (BSA) 3%, glicina 10 mM) durante toda la noche seguido de 3 lavados con PBS 1X y se tñieron por 2 horas a TA con el anticuerpo primario anti NPC1L1 (producido en ratón, Santa Cruz) diluido

1:50 en solución diluyente (PBS 1X, SFB 3% BSA 1% y glicina 10 mM). Después de 3 lavados con PBS 1X, las células se pusieron en contacto con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado al fluoróforo Alexa-Fluor 488 diluido en solución diluyente 1:1000 por una hora a 37 °C. A continuación, las células se lavaron 3 veces con PBS 1X NH₄Cl 50 mM durante 5 min y una con PBS 1X y se montaron en cubreobjetos con 4 µL de VECTASHIELD Mounting Medium con DAPI y se analizaron en el microscopio confocal Zeiss LSM700 y las imágenes se analizaron con el ZEN software v. 2010.

Ensayos de infección y tratamiento

Las células Huh-7 se sembraron en placas de 12 pozos y cuando alcanzaron 70-80% de confluencia, se infectaron con DENV 2 y DENV 4 a una multiplicidad de infección (49) de 3 en medio con 1% de suero fetal bovino durante 2 horas a 37 ° C. A continuación, las células se lavaron 3 veces con medio HANKS' (1X), para retirar el inóculo. Posteriormente, se realizó el ensayo de inhibición, usando como vehículo, etanol y como fármaco, ezetimiba (Cayman Chem) en medio completo durante 48 horas a 37 ° C. Las concentraciones empleadas fueron de 0 µM (vehículo), 20 µM y 50 µM de ezetimiba.

Ensayos de viabilidad celular

La viabilidad celular se evaluó con el método de yoduro de propidio y tratamiento con el fármaco ezetimiba: las células se trataron con concentraciones crecientes (0 µM (vehículo) 25 µM y 50 µM de ezetimiba) durante 48 horas a 37°C y 5% CO₂. El yoduro de propidio se usó en una concentración 1:500 durante 15 minutos a TA y después se realizó lectura en por citometría de flujo. Además se realizó ensayo de viabilidad con MTT, para esto, en primer lugar se preparó el stock 0.5mg/ml en un volumen final de 10 ml disuelto con medio DMEN sin SFB, posteriormente, se filtró utilizando un filtro con poro de 0.2 µm y se almacenó a 4°C para ensayos posteriores. Para hacer el ensayo de viabilidad con MTT se trataron las

células con las mismas concentraciones mencionadas en el ensayo con yoduro de propidio y se utilizó la misma estrategia de tratamiento. Posteriormente, se retiró el medio completo con el fármaco y se lavó 1 vez con PBS, se utilizó como control negativo, células fijadas con PFA 1% durante 20 minutos. Después de concluir este tiempo se lavaron las células con PBS 1X una vez y se agregó el MTT, se dejó incubar 2 hr a 37 °C. A continuación, se lavó con DMEM sin suero fetal y se agregó 200 µl de DMSO e incubo 1 hr a 37 °C. Una vez concluido este tiempo se pasó el sobrenadante a multiplacas 96 pozos en dilución 1:10 con DMSO para después leer en espectrofotómetro a una absorbancia de 540 nm.

Ensayo de focos en células Huh-7

En monocapas confluentes de células Huh-7 cultivadas en multiplacas de 96 pozos se inocularon los sobrenadantes problema y sus respectivos controles con diluciones seriadas en base 10 (volumen final de 50 µL) durante 2 hrs a 37 °C permitiéndose la absorción viral. Después, se retiró el inóculo y se lavó una vez con medio de HANKS' (1X) para posteriormente añadirse 200 µL de medio completo. El medio completo se retiró a las 24 horas post infección (hpi) y se lavó una vez con PBS 1X, para posteriormente fijar las células con paraformaldehído al 1% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Enseguida, se permeabilizaron las células con solución permeabilizadora (saponina 0.02%, SFB 1% en PBS 1X) durante 20 minutos y se incubó con el anticuerpo monoclonal primario anti-DENV 2H2, dirigido a las proteínas virales prM-E, durante 2 hrs a TA. A continuación, se colocó el anticuerpo secundario anti-ratón Alexa 488 (Life technologies) durante 2 hrs a TA. Los focos se contaron en un microscopio de fluorescencia. El título viral se expresó como unidades formadores de focos por mililitro (UFF/ML).

Cuantificación del genoma viral por qRT-PCR

Para la generación de los estándares de cuantificación por qRT-PCR se amplificó primero mediante una RT-PCR convencional el RNA viral aislado

de células infectadas con DENV usando los siguientes primers: DV2C-F 5'-CAATATGCTGAAACGCGAGA-3' y DV2C-R 5'-TGCTGTTGGTGGGATTGTTA-3' para el fragmento de 151 pb del gen de la proteína viral de la cápside del DENV 2 y D4F 5'-GAGCCGGAAAGACAAAAAGA-3' y D4R 5'-ACAGCTGGGGTCTGATAACG-3' para el fragmento de 152 pb del gen de la proteína viral NS3 del DENV 4. Los productos de la PCR se clonaron en un sistema vector pJet1.2 (Thermo Scientific), y el plásmido recombinante se purificó y cuantificó por espectrofotometría a $\lambda = 260$ nm. Para preparar una dilución que contuviera 10^{10} copias del plásmido/mL se usó la siguiente fórmula:

$$\text{No. Copias} = \frac{(6 \times 10^{23} \text{ copias/mol}) (\text{concentración [g/}\mu\text{L]})}{\text{peso molecular del plásmido}} + \text{inserto [g/}\mu\text{L]}$$

Se prepararon diluciones seriadas del plásmido ($10^2 - 10^9$ copias/mL) y se generó una curva estándar.

Citometría de flujo e inmunofluorescencia

Para la determinación del porcentaje de células infectadas y la distribución de proteínas virales se realizaron ensayos de citometría de flujo y microscopía confocal. Las células Huh 7 se cultivaron en placas de formato de 24 pozos con laminillas para microscopía confocal y de 12 para los ensayos de citometría de flujo. Una vez que las células fueron recolectadas para citometría o presentes en laminillas para microscopía, se permeabilizaron con saponina al 0.1%, SFB al 1% y PBS 1X durante 20 minutos a TA, se agregaron los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo anti-prM-E de ratón (2h2), anti- NS3 de conejo (GENETEX) o anti-E de ratón (GENETEX) para teñir las proteínas virales, durante 2 horas a TA. Como anticuerpos secundarios se usaron cabra anti ratón y anti conejo Alexa Flour 488, cabra anti ratón Alexa Flour 405 y cabra anti-conejo Alexa Flour 555 incubándolos por 2 horas a TA y los núcleos se tiñeron con DAPI. Para la

tinción de colesterol intracelular se usó complejo de filipina II colorante (Sigma), además se usó el anticuerpo primario hecho en conejo anti NS4A y se tiñó con el secundario anti conejo acoplado al fluoróforo Alexa-Fluor 488 diluido en PBS 1X 1:200 por una hora a TA y los núcleos se contrastaron con tinción con yoduro de propidio. Las muestras se observaron en un microscopio confocal Zeiss LSM700 y las imágenes se analizaron con ZEN software v. 2010. La citometría de flujo se realizó en un BD LSR Fortessa y los datos se analizaron con el software FlowJo v.10.

Ensayo de unión

Las células Huh 7 en suspensión fueron pre tratadas con 50 μ M de ezetimiba o el anticuerpo anti NPC1L1 (en dilución 1:100) durante 2 h a 37 °C. Después las células se lavaron tres veces con PBS 1X estéril y se incubaron con DENV 2 y DENV 4 a 4 °C por 30 minutos. A continuación, las células se fijaron con paraformaldehído al 1% por 20 minutos a TA, se bloquearon con 2% SFB y se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal anti-E a una dilución 1:100. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo anti ratón Alexa flour 405 y se analizaron por citometría de flujo.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software Graph Pad Prism versión 6. Los datos numéricos se expresaron con el valor de la media y desviación estándar (SD). Para determinar diferencias entre las concentraciones utilizadas en los ensayos de inhibición con ezetimiba (0, 25 y 50 μ M) para los ensayos de focos y qRT-PCR se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis corregida para múltiples comparaciones con la prueba *post-hoc* de Dunn. Para el porcentaje de células infectadas en el ensayo de citometría de flujo se utilizó la prueba de t de Student con la corrección de Welch. La significancia estadística se estableció en el nivel del 95% ($p = <0,05$).

Resultados

Participación de receptor NPC1L1 en la infección por DENV

Dado que el receptor Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) está involucrado en la captación de colesterol en las células hepáticas y éstas son un blanco muy importante de la infección por DENV, el primer paso fue evaluar el efecto de la infección por DENV 2 sobre la presencia del receptor NPC1L1 en la superficie celular. El NPC1L1 es un transportador de colesterol que se encuentra en la membrana de hepatocitos, el cual puede ser bloqueado por el fármaco ezetimiba (aprobado por la FDA) (44). Para analizar la localización del receptor NPC1L1 en la superficie celular, se usó microscopía confocal. Durante la primera hora de infección (hpi) se observó un aumento del receptor NPC1L1 en la superficie celular en comparación con la imagen

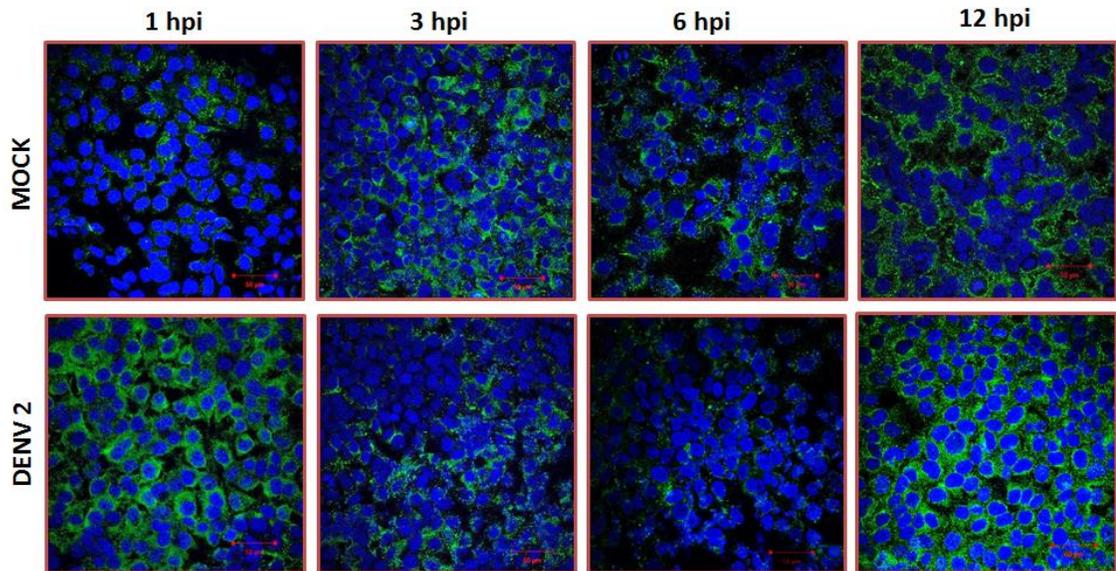


Figura 6. Efecto de la localización en membrana celular del receptor NPC1L1 en la infección por DENV. Las Células Huh 7 sin permeabilizar se infectaron o no (MOCK) con DENV 2, posteriormente se fijaron a las 1, 3, 6 y 12 horas post infección (Hpi) y se tiñeron con el anticuerpo primario contra NPC1L1, posteriormente con un anticuerpo secundario anti ratón conjugado con Alexa Flour 488 y el núcleo se tiño con DAPI (azul). Las células se analizaron por microscopia confocal. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

correspondiente a las células no infectadas (MOCK) (Figura 6). A las 3 y 6 hpi se observó una caída abrupta en la intensidad de la fluorescencia en la superficie de las células infectadas, sugiriendo su internalización. Sin embargo, a las 12 hpi el receptor aparentemente vuelve a localizarse en mayor proporción en la superficie de las células infectadas en comparación con las Mock. Estos resultados sugieren que el receptor NPC1L1 se modula durante la infección por dengue, lo cual sugiere que éste pudiera estar participando en la toma de colesterol del medio en etapas tempranas de la infección (1 hpi) por DENV. Esta participación pudiera ser nuevamente necesaria durante la replicación viral (12 hpi).

Efecto de ezetimiba en la infección por virus dengue

Una vez que encontramos que el receptor NPC1L1 se localizaba en la superficie de las células infectadas con DENV, decidimos analizar su importancia durante infección. Primeramente, se determinó la viabilidad de las células tratadas con ezetimiba, las células se incubaron con distintas concentraciones (0, 25 y 50 μ M). Ninguna de las concentraciones usadas de ezetimiba fueron tóxicas para las células como lo demuestran los ensayos de viabilidad empleando yoduro de propidio (Figura 7A) y MTT (Figura 7B).

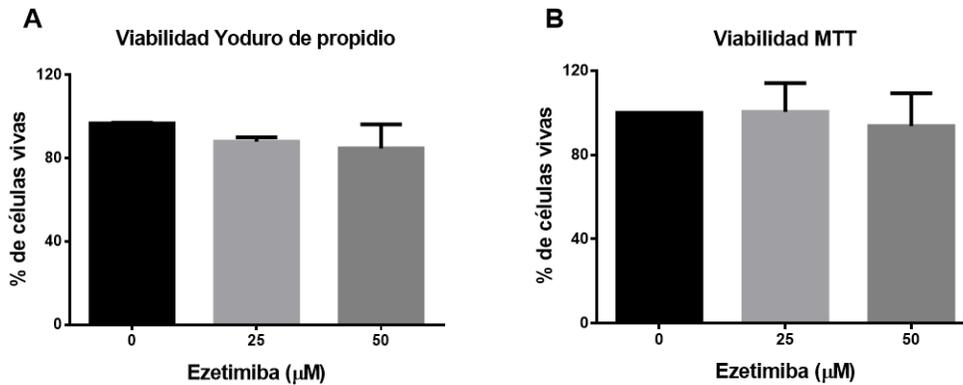


Figura 7. Viabilidad celular en presencia de diferentes concentraciones de ezetimiba. Las células Huh-7 se incubaron en presencia de 25 y 50 μM de ezetimiba y la viabilidad celular se evaluó mediante la incorporación de yoduro de propidio (A) y por la reacción de MTT (B). En las gráficas se muestra el porcentaje de células vivas Huh 7 tratadas durante 48 horas con diferentes concentraciones de ezetimiba. Se muestra la DS de un experimento por triplicado. * $p > 0.05$.

A continuación las células se infectaron con DENV 2 y DENV 4 a una MOI de 3 durante 48 horas. Analizamos el efecto del tratamiento de ezetimiba sobre la infección por DENV. Interesantemente, con la concentración de 50 μM se observó una reducción en la producción de la producción de progenie viral a medida que se incrementó la concentración de ezetimiba (0, 25 y 50 μM) (Figura 8A) y esta resultado ser estadísticamente significativa a la concentración de 50 μM. Esta inhibición fue de más de un logaritmo de UFF/mL para DENV 2 (95%) y de dos logaritmos de UFF/mL para DENV 4 (99%) ($p = 0.0146$ y 0.0141 , respectivamente). Para confirmar este resultado, se evaluó el efecto de las mismas concentraciones de ezetimiba sobre la producción de genoma viral por medio de qRT-PCR. En concordancia con los resultados de progenie viral, se observó una reducción estadísticamente significativa en el número de copias de RNA para DENV 2 y DENV 4 se observó con las concentraciones tanto de 25 como de 50 μM (Figura 8B). Este resultado confirma el efecto antiviral de ezetimiba.

Dado que el mayor efecto inhibitorio de ezetimiba fue a la concentración de 50 μM , ésta concentración se usó para los ensayos posteriores de citometría de flujo e inmunofluorescencias.

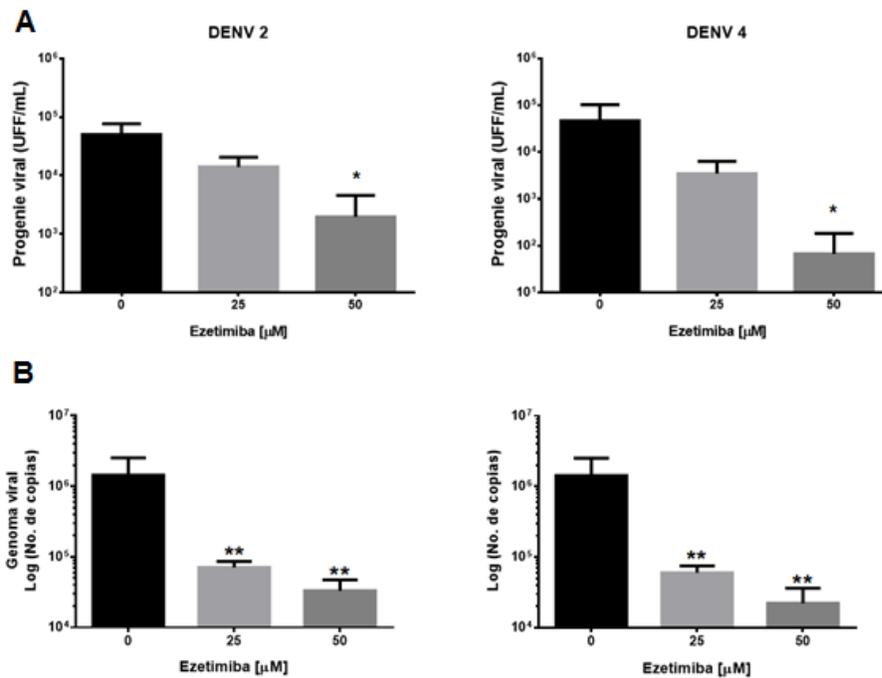


Figura 8. Ezetimiba induce un efecto antiviral en células infectadas por DENV. Las células Huh7 infectadas con DENV2 y DENV4 se trataron con 25 y 50 μM de ezetimiba por 48 hrs. El título viral se determinó por ensayos de focos (A) y la cantidad de RNA viral por qRT-PCR (B). Los resultados se expresaron en log de UPF/mL y log de número de copias de RNA +DS de tres ensayos independientes por duplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

Ezetimiba reduce el porcentaje de células infectadas por virus dengue

Los resultados anteriores indicaban que ezetimiba reducía la progenie viral y la cantidad de genoma viral en las células infectadas por lo cual decidimos analizar el efecto ezetimiba en la cantidad de células infectadas. Como puede observarse en el ensayo de microscopía confocal en donde se marcó la proteína viral prM-E, el tratamiento con ezetimiba causó una reducción significativa de la cantidad de células positivas a la infección por DENV 2 y DENV 4 en comparación con las células tratadas con vehículo (Figura 9A). Cuando éstas diferencias fueron cuantificadas por citometría de flujo se observó una reducción en el porcentaje de células infectadas, de 38,97% ($p = 0,0140$) y 39,43% ($p = 0.0355$) para DENV 2 y DENV 4, respectivamente (Figura 9B).

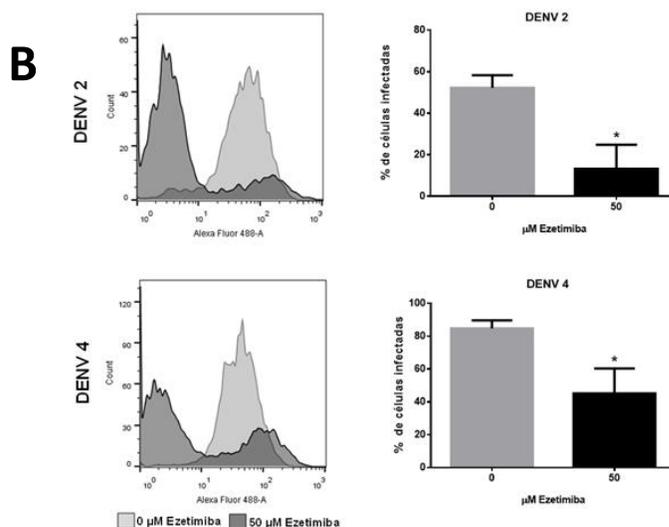
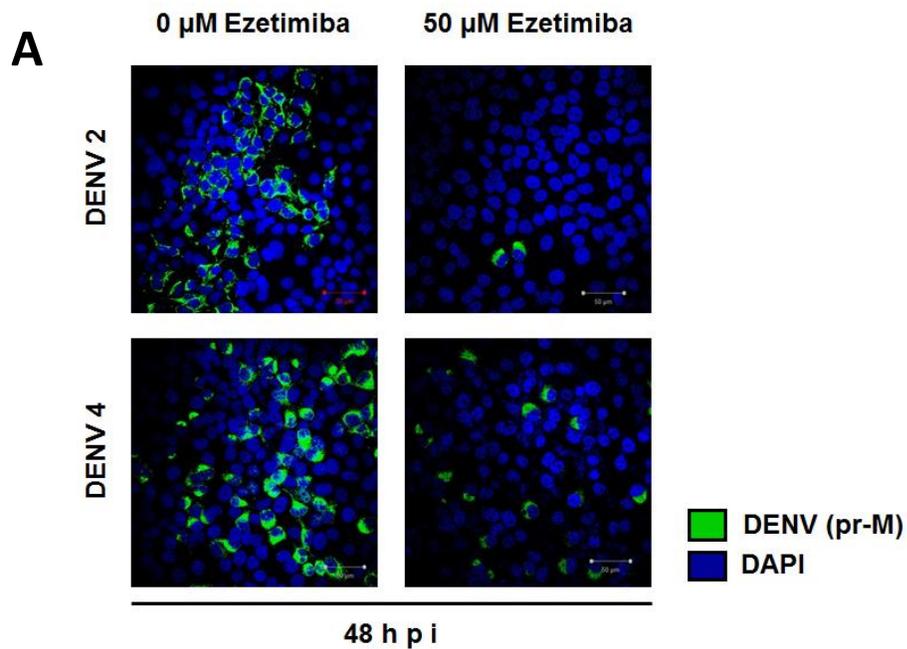


Figura 9. Ezetimiba induce un efecto antiviral en células infectadas con DENV. (A) Células Huh 7 infectadas con DENV 2 y DENV 4 y tratadas con 50 μM de ezetimiba y vehículo visualizadas a las 48 hpi por microscopía confocal usando el anticuerpo policlonal anti la proteína viral Pr-M y Alexa 488. Los núcleos se tiñeron con DAPI (Azul). Barra escala de 50 μm . Las imágenes corresponden a un experimento representativo de 3 ($n=3$). En el panel inferior (B) se observa el porcentaje de células infectadas con DENV 2 y 4 después de ser tratadas con 50 μM de ezetimiba, esto se determinó por citometría de flujo usándose el anticuerpo policlonal anti la proteína viral Pr-M y Alexa 488 para la detección. Se muestra el valor de la media la desviación estándar de un triplicado. La diferencias estadísticas se expresan en asteriscos con el siguiente valor de $*p = <0.05$.

El efecto antiviral de ezetimiba en el ciclo viral de DENV

Con el fin de investigar el paso en el ciclo replicativo de DENV en donde ezetimiba estaba actuando realizamos primeramente ensayos de unión viral en presencia del fármaco. Como puede verse en la figura 10A, la cantidad de proteína E unida a la superficie celular fue la misma en las células infectadas e incubadas con el vehículo con respecto a las incubadas con ezetimiba indicando que el fármaco no impide la unión de DENV a su receptor (Figura 10A). Dado que el sitio de unión de ezetimiba al NPC1L1 es distinto al sitio de reconocimiento del anticuerpo anti-NPC1L1, las células también fueron incubadas con el anticuerpo anti-NPC1L1 y posteriormente fueron infectadas con DENV (Figura 10A). Como ocurrió en el caso del fármaco, el anticuerpo fue incapaz de inhibir la unión de DENV a la superficie celular, indicando que ezetimiba inhibe la infección por DENV en pasos posteriores a la unión y entrada viral. Para confirmar esta posibilidad las células Huh7 se infectaron con DENV y se trataron con la concentración de 50 μ M de ezetimiba a diferentes tiempos de infección, esto es i) 6 hrs antes de la inoculación del virus, ii) al tiempo 0 de infección, iii) a las 12 hrs postinfección y iv) 24 y v) 36 hpi. Como puede verse en la figura 10B, el pretratamiento con ezetimiba no tuvo ningún efecto inhibitorio de la infección confirmando que el efecto del fármaco es en pasos posteriores a la unión y entrada viral. Esto se corroboró pues ezetimiba tuvo efecto inhibitorio de la infección a todos los tiempos de tratamiento posteriores a la entrada viral (Figura 10B).

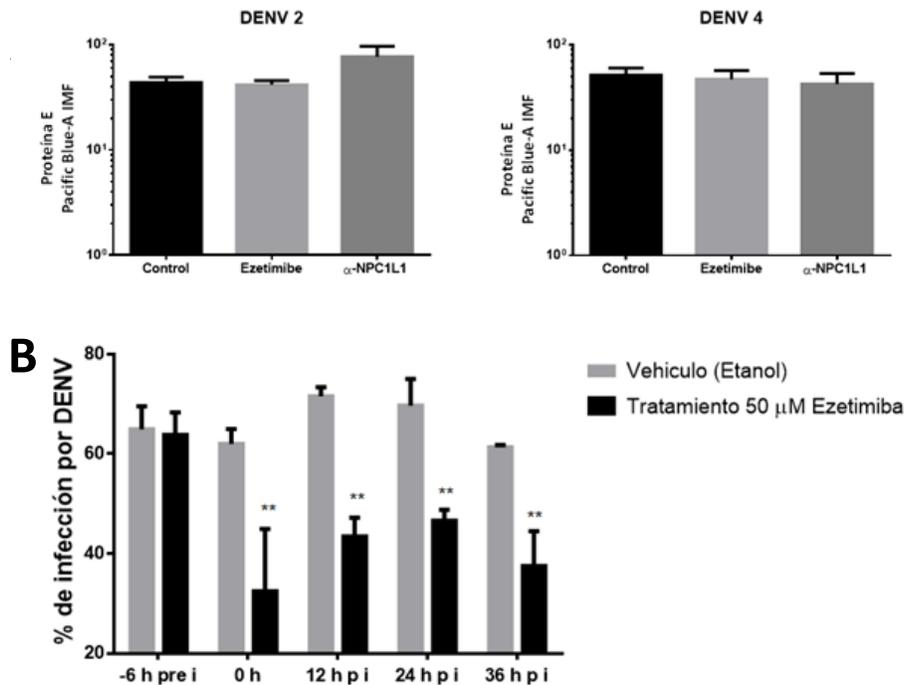


Figura 10. Ezetimiba inhibe la infección por DENV después de la unión y entrada a células Huh 7. En el ensayo de unión (A) las células Huh 7 en suspensión se trataron con ezetimiba o con el anticuerpo anti NPC1L1 2 horas antes del agregar el inóculo viral. Las células se dejaron interactuar con virus DENV 2 y 4 durante 30 minutos a 4 °C, se fijaron y se marcaron con anticuerpo primario anti E y secundario Alexa flour 405. La cantidad de virus unido a las células se cuantificó por citometría de flujo. (B) las células Huh 7 se pre trataron con 50 μ M durante 6 horas antes de agregar el inóculo de virus, inmediatamente al inicio de la infección (0 h), a las 12 horas postinfección (12 hpi) y 24 y 36 hpi. El porcentaje de células infectadas por DENV se determinó por citometría de flujo usando el anticuerpo primario anti PrM y secundario Alexa flour 405. Se presentan los resultados de tres experimentos independientes. . * $p = <0.05$

El tratamiento con ezetimiba afecta la integridad de los complejos replicativos de DENV

Debido a que el efecto más importante de ezetimiba es la reducción de la captación de colesterol y siendo el colesterol un elemento importante en la formación de los complejos replicativos (CR), decidimos evaluar el efecto del tratamiento con ezetimiba en la integridad de los CR. Para ello, se analizó la localización de las proteínas virales E y NS3, localizadas en los CR (50), en células infectadas con DENV 2 y tratadas con ezetimiba mediante microscopía confocal (Figura 11). En el caso de células infectadas y tratadas con vehículo (0 μ M de ezetimiba), se observó una distribución compacta y perinuclear de ambas proteínas virales E y NS3. Sin embargo, en células infectadas y tratadas con ezetimiba (50 μ M Ezetimiba) los CR tuvieron una distribución perinuclear difusa, sugiriendo que el bloqueo de la captación de colesterol por inhibición del receptor NPC1L1 alteró la estructura de los CR. Esta modificación en la distribución de ambas proteínas virales podría ser la responsable, de la inhibición en la replicación del genoma viral y subsecuente reducción de la progenie viral observada en las células tratadas con ezetimiba.

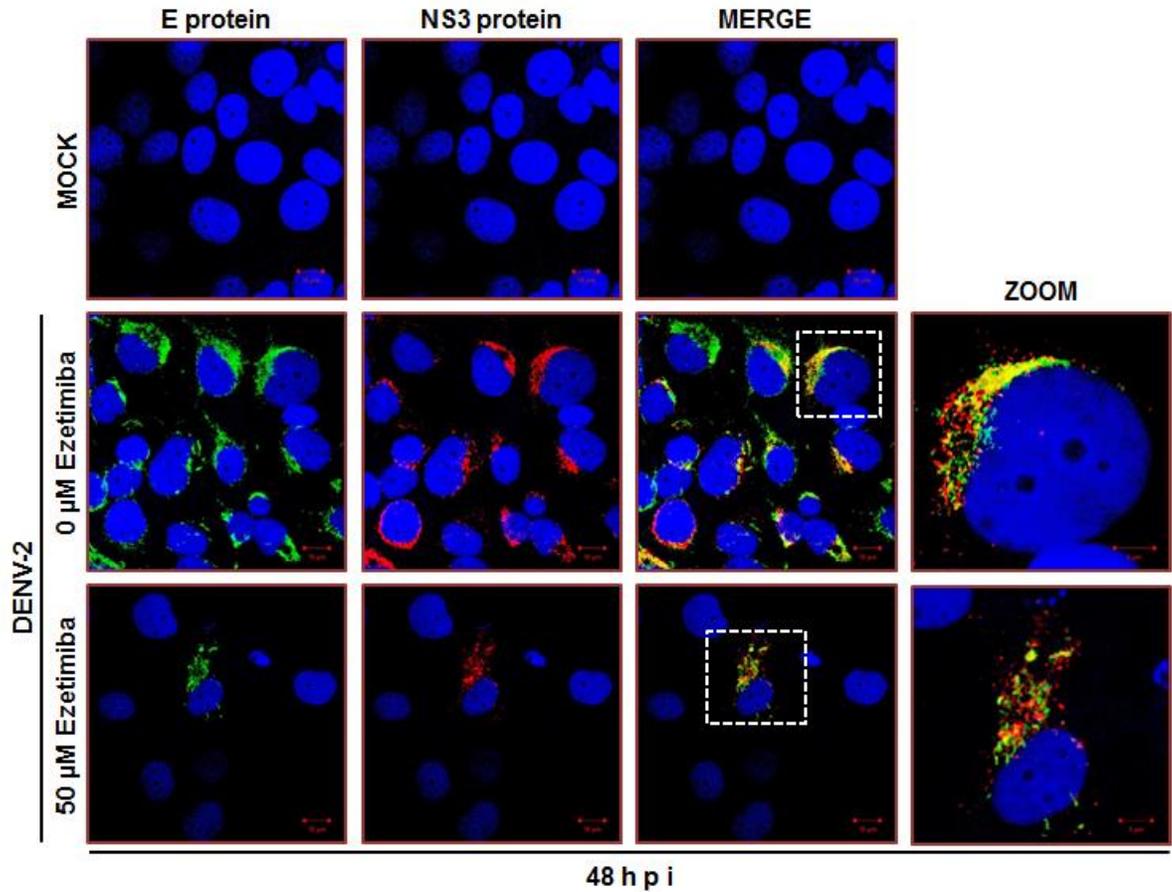


Figura 11. La integridad de complejos replicativos (CR) del virus DENV 2 se altera en células tratadas con ezetimiba. La distribución de las proteínas virales E y NS3 (rojo) se evaluó en células Huh 7 infectadas con DENV 2 y tratadas con vehículo (0 μM Ezetimiba) o 50 μM Ezetimiba mediante anticuerpos anti-E y anti-NS3. Después de 48 horas de tratamiento las células se fijaron y el núcleo se tiñó con DAPI (azul). El patrón de distribución de las proteínas virales se analizó mediante microscopia confocal. El área seleccionada en la imagen (cuadro blanco), es una ampliación de 2.5X donde se muestra la deslocalización en ZOOM de las proteínas virales. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

El efecto del tratamiento con ezetimiba sobre el colesterol celular durante la infección por DENV

Sabiendo que ezetimiba es un fármaco que inhibe la absorción del colesterol libre en células hepática y que la infección por DENV induce el aumento de colesterol celular, investigamos el efecto del tratamiento con fármaco ezetimiba en la cantidad de colesterol presente en células infectadas con DENV durante 48 horas mediante microscopia confocal. Como puede observarse, el colesterol aumentó en células infectadas y tratadas con vehículo (0 μ M de ezetimiba) comparado con el MOCK (Figura 12). El colesterol teñido con filipina III se encontraba presente en los CR pues cuando utilizamos un anticuerpo contra la proteína no estructural NS4A, presente en los CR, observamos la colocalización de colesterol y NS4A (15). La proteína viral NS4A en las células infectadas y no tratadas con ezetimiba, se observa compacta en la región perinuclear junto con la marca de colesterol. Sin embargo, en las células infectadas y tratadas con 50 μ M de ezetimiba, se observó un menor número de células infectadas y la marca de NS4A no rodea al núcleo, sino que se aprecia de manera más dispersa en el citoplasma. Además, observamos que hay una menor colocalización entre NS4A y colesterol. Esto nos sugiere que el tratamiento con ezetimiba inhibe la formación de CR requeridos para la replicación del virus, inhibiendo la acumulación de colesterol en las células tratadas e infectadas con DENV y siendo esta condición la que confiere el efecto antiviral del fármaco.

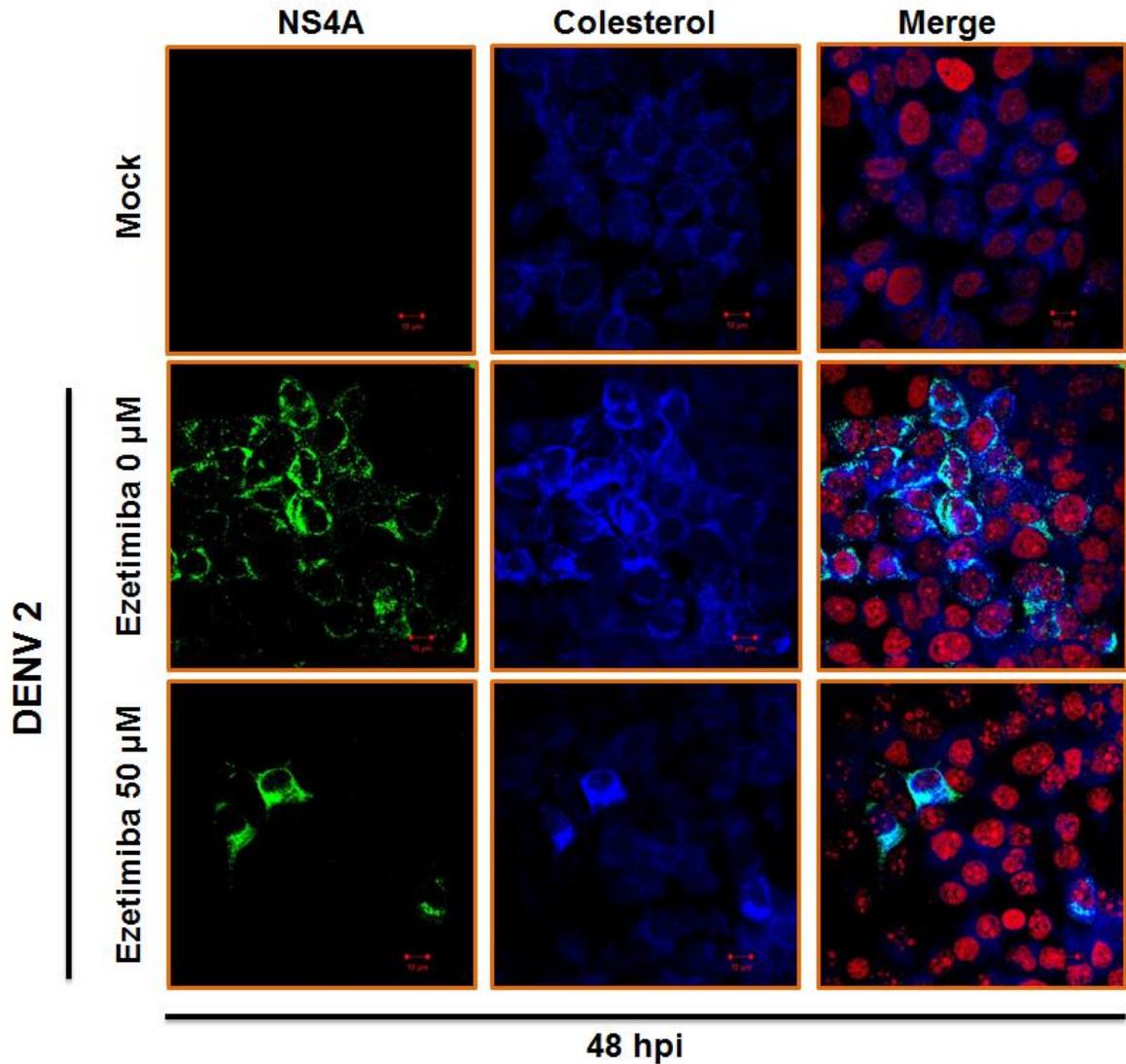


Figura 12. La infección por virus dengue estimula la acumulación de colesterol celular y el tratamiento con ezetimiba inhibe la formación de complejos replicativos. Las células Huh-7 no infectadas (mock) y las infectadas (por 48 hrs) con DENV2 no tratadas (0uM) o tratadas con ezetimiba (50 uM) se incubaron con el complejo filipina III (azul) y con anticuerpos anti-proteína viral NS4A. El núcleo se marcó con yoduro de propidio (rojo). Las células fueron analizadas mediante microscopia confocal. Se muestran imágenes representativas de cada condición.

Discusión

Nuestros resultados demuestran que el fármaco ezetimiba es capaz de inhibir tanto la replicación del genoma viral, como la producción de nuevas partículas virales de DENV 2 y DENV 4, por inhibición de la captación de colesterol extracelular (Figura 11). El colesterol es un componente de las membranas celulares y es indispensable para su buen funcionamiento. La cantidad de colesterol celular se regula a través de la síntesis de *novo* y de su captación. En estudios realizados previamente en nuestro laboratorio se ha demostrado que la infección por DENV aumenta la cantidad de colesterol mediante un incremento en la síntesis por aumento de la actividad de la HMG-CoA reductasa, a través de la alteración de la fosforilación de AMPK (33). Por ello, el tratamiento con estatinas, que inhiben la actividad de la HMG-CoA reductasa, en modelos celulares y animales parecía prometedor contra la infección por DENV (24, 25, 33, 51, 52). Sin embargo, el tratamiento con lovastatina, que tuvo efecto antiviral en estudios *in vitro* e *in vivo*, no fue capaz de inhibir la infección en humanos infectados con DENV (37). Este hecho podría sugerir que el colesterol podría estarse obteniendo a través de otras vías. Una posibilidad es la captación de colesterol del medio. A este respecto, Soto-Acosta en el 2013 reportaron que el aumento del colesterol en las células Huh-7 correlaciona con el aumento del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLr) en la superficie de las células durante la primera hora de infección (24). En nuestro estudio observamos también un aumento del receptor NPC1L1 en la superficie celular durante la primera hora postinfección. Posteriormente, a las 3 y 6 horas se observó una reducción en membrana del receptor NPC1L1. Sin embargo, a diferencia de lo reportado con el LDLr en la infección por DENV, a las 12 hpi nosotros observamos una recuperación del receptor NPC1L1 en membrana. A este tiempo, es de esperarse que exista una alta eficiencia de replicación viral con importante requerimiento de colesterol. Esta recuperación del receptor NPC1L1 en la membrana plasmática está directamente relacionada con los niveles de colesterol que son censados por la célula. Se ha descrito que cuando se

elimina el colesterol del medio y posteriormente se le añade a células hepáticas, un 85% del receptor NPC1L1 se localiza en la membrana plasmática para captarlo. Esto es lo que sucede a la hora post-infección aumentando la captación de colesterol extracelular (41). Este hallazgo sugiere que la unión o la entrada desencadena la acumulación del colesterol en la célula, pero el colesterol en pasos post entrada viral también son necesarios (24). Nosotros corroboramos por medio de microscopia confocal que la infección por DENV estimula la acumulación de colesterol celular a las 48 hpi (figura 15). Aunque el tratamiento con ezetimiba no fue capaz de inhibir la unión ni entrada del DENV, podemos sugerir que el receptor NPC1L1 no es un factor de entrada para DENV, a diferencia de lo que sucede durante la infección con el virus de la hepatitis C, que lo utiliza como factor de entrada (45). Por lo que el tratamiento con ezetimiba, fármaco que tiene como blanco al receptor NPC1L1, tuvo efecto antiviral. Otro caso de éxito en el efecto antiviral con el tratamiento de ezetimiba, es el bloqueo de la infección del virus de la hepatitis B después de la entrada viral en hepatocitos (46). En nuestros experimentos de tratamiento con ezetimiba corroboramos que efectivamente, ezetimiba no afecta tiempos tempranos de la infección pero si en tiempos de tratamientos posteriores a estos eventos de unión y entrada (figura 13 B). Por otra parte, observamos que la reducción en la cantidad de virus producido y la menor cantidad de genoma viral en células infectadas y tratadas con ezetimiba, es consecuencia de pérdida de la integridad de los complejos replicativos (CR). Evaluamos la integridad de los CR mediante microscopia confocal, marcando proteínas virales estructurales y no estructurales del DENV. Tal como se ha descrito previamente, cuando se usan fármacos que tienen propiedades hipolipemiantes como el NDGA (50) la proteína E y NS3, pierden su localización perinuclear compacta, distribuyéndose de manera difusa en el citoplasma y perinuclear. Este hecho lo que nos habla de que el uso de fármaco ezetimiba altera la integridad de los CR. Recientemente se reportó que la infección por DENV estimula la acumulación de colesterol en los CR y esto se da a través de la activación de

la HMG-CoA reductasa (33). En este trabajo se observó que el tratamiento con metformina y lovastatina, otros fármacos que también tiene un efecto hipolipemiente, a las 24 hpi se observa que la colocación de una proteína no estructural (NS4A) con el colesterol celular (marcado con filipina III) se pierde. Corroborando la importancia del colesterol en la formación e integridad de los CR. Al contar con este antecedente, nosotros reproducimos el experimento y logramos observar un efecto similar a las 48 hpi, las células que estaban infectadas y no tratadas, también logramos ver una acumulación de colesterol y que colocaliza con la proteína no estructural NS4A presente en los complejos replicativos, pues NS4A se encuentra anclada a la membrana del RE (53). Y con el tratamiento con ezetimiba se observó una menor cantidad de colesterol en las células muy semejante a lo que observamos en el Mock, y las pocas células que estaban infectadas, la proteína NS4A se observó deslocalizando con la marca del colesterol. Corroborándose con esto la importancia del colesterol exógeno, para la integridad y formación de los CR. Sin embargo, existen otros receptores celulares, tales como SR-BI, receptor de HDL, el receptor de LDL (LDLr) y VLDL (VLDLr) y el receptor NPC1L1 (54). Este último tiene un papel importante para la homeostasis del colesterol en el organismo y puede ser inhibido con ezetimiba (39, 44). El efecto antiviral que estamos observando es entonces debido a la modificación en la cantidad de colesterol extracelular y que a su vez genera la alteración en la distribución de las proteínas virales presentes en el RE, formando los CR y esta alteración podría ser responsable, en una parte de la inhibición en la replicación del genoma viral y subsecuente reducción de la progenie viral observada en las células tratadas.

Conclusión

La infección por DENV es capaz de modular la localización celular del receptor NPC1L1. Por otro lado, ezetimiba es capaz de inhibir la replicación del DENV, por depleción de colesterol. Siendo ezetimiba un fármaco inhibidor específico de la captación de colesterol extracelular por el receptor NPC1L1, puede ser un potencial agente terapéutico contra dengue, atacando la vía de absorción de colesterol en las células infectadas por DENV.

Perspectivas

1. Explorar el efecto de la combinación de ezetimiba con una estatina, considerando un posible efecto sinérgico que logre inhibir tanto la absorción de colesterol exógeno, como la síntesis *de novo*.
2. Explorar los mecanismos de señalización o intracelulares que accionan la acumulación de lípidos en las células infectadas por DENV.

Bibliografía

1. WHO. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. 3rd ed. Geneva 2009.
2. Gubler DJ. The global pandemic of dengue/dengue haemorrhagic fever: current status and prospects for the future. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*. 1998 Mar;27(2):227-34. PubMed PMID: 9663316.
3. Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen V, Wills B. Dengue. *The New England journal of medicine*. 2012 Apr 12;366(15):1423-32. PubMed PMID: 22494122.
4. Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet*. 2015 Jan 31;385(9966):453-65. PubMed PMID: 25230594.
5. Whitehorn J, Simmons CP. The pathogenesis of dengue. *Vaccine*. 2011 Sep 23;29(42):7221-8. PubMed PMID: 21781999.
6. Acosta EG, Bartenschlager R. The quest for host targets to combat dengue virus infections. *Current opinion in virology*. 2016 Oct;20:47-54. PubMed PMID: 27648486.
7. Murray NE, Quam MB, Wilder-Smith A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clinical epidemiology*. 2013;5:299-309. PubMed PMID: 23990732. Pubmed Central PMCID: 3753061.
8. Torres-Galicia I, Cortes-Poza D, Becker I. [Dengue in Mexico: an analysis of two decades]. *Gaceta medica de Mexico*. 2014 Mar-Apr;150(2):122-7. PubMed PMID: 24603992. Dengue en Mexico: analisis de dos decadas.
9. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 2002 Mar 08;108(5):717-25. PubMed PMID: 11893341. Pubmed Central PMCID: 4152842.
10. Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nature structural biology*. 2003

Nov;10(11):907-12. PubMed PMID: 14528291. Pubmed Central PMCID: 4148076.

11. Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Advances in virus research*. 2003;59:23-61. PubMed PMID: 14696326.

12. Friebe P, Shi PY, Harris E. The 5' and 3' downstream AUG region elements are required for mosquito-borne flavivirus RNA replication. *Journal of virology*. 2011 Feb;85(4):1900-5. PubMed PMID: 21123391. Pubmed Central PMCID: 3028882.

13. Villordo SM, Gamarnik AV. Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. *Virus research*. 2009 Feb;139(2):230-9. PubMed PMID: 18703097. Pubmed Central PMCID: 5440119.

14. Panyasrivanit M, Khakpoor A, Wikan N, Smith DR. Co-localization of constituents of the dengue virus translation and replication machinery with amphisomes. *The Journal of general virology*. 2009 Feb;90(Pt 2):448-56. PubMed PMID: 19141455.

15. Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Current opinion in microbiology*. 2008 Aug;11(4):369-77. PubMed PMID: 18644250. Pubmed Central PMCID: 2581888.

16. Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA, Deubel V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *Journal of virology*. 1999 Jul;73(7):6104-10. PubMed PMID: 10364366. Pubmed Central PMCID: 112675.

17. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *Journal of clinical microbiology*. 2000 Mar;38(3):1053-7. PubMed PMID: 10698995. Pubmed Central PMCID: 86336.

18. van der Schaar HM, Rust MJ, Chen C, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Zhuang X, et al. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS pathogens*. 2008

Dec;4(12):e1000244. PubMed PMID: 19096510. Pubmed Central PMCID: 2592694.

19. Cruz-Oliveira C, Freire JM, Conceicao TM, Higa LM, Castanho MA, Da Poian AT. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS microbiology reviews*. 2015 Mar;39(2):155-70. PubMed PMID: 25725010.

20. Stiasny K, Heinz FX. Flavivirus membrane fusion. *The Journal of general virology*. 2006 Oct;87(Pt 10):2755-66. PubMed PMID: 16963734.

21. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P, et al. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell host & microbe*. 2009 Apr 23;5(4):365-75. PubMed PMID: 19380115.

22. Noble CG, Chen YL, Dong H, Gu F, Lim SP, Schul W, et al. Strategies for development of Dengue virus inhibitors. *Antiviral research*. 2010 Mar;85(3):450-62. PubMed PMID: 20060421.

23. Guy B, Jackson N. Dengue vaccine: hypotheses to understand CYD-TDV-induced protection. *Nature reviews Microbiology*. 2016 Jan;14(1):45-54. PubMed PMID: 26639777.

24. Soto-Acosta R, Mosso C, Cervantes-Salazar M, Puerta-Guardo H, Medina F, Favari L, et al. The increase in cholesterol levels at early stages after dengue virus infection correlates with an augment in LDL particle uptake and HMG-CoA reductase activity. *Virology*. 2013 Aug 1;442(2):132-47. PubMed PMID: 23642566.

25. Rothwell C, Lebreton A, Young Ng C, Lim JY, Liu W, Vasudevan S, et al. Cholesterol biosynthesis modulation regulates dengue viral replication. *Virology*. 2009 Jun 20;389(1-2):8-19. PubMed PMID: 19419745.

26. van Gorp EC, Suharti C, Mairuhu AT, Dolmans WM, van Der Ven J, Demacker PN, et al. Changes in the plasma lipid profile as a potential predictor of clinical outcome in dengue hemorrhagic fever. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2002 Apr 15;34(8):1150-3. PubMed PMID: 11915007.

27. Suvarna JC, Rane PP. Serum lipid profile: a predictor of clinical outcome in dengue infection. *Tropical medicine & international health : TM & IH*. 2009 May;14(5):576-85. PubMed PMID: 19309479.
28. Duran A, Carrero R, Parra B, Gonzalez A, Delgado L, Mosquera J, et al. Association of lipid profile alterations with severe forms of dengue in humans. *Archives of virology*. 2015 Jul;160(7):1687-92. PubMed PMID: 25936955.
29. Biswas HH, Gordon A, Nunez A, Perez MA, Balmaseda A, Harris E. Lower Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels Are Associated with Severe Dengue Outcome. *PLoS neglected tropical diseases*. 2015;9(9):e0003904. PubMed PMID: 26334914. Pubmed Central PMCID: 4559460.
30. Heaton NS, Randall G. Multifaceted roles for lipids in viral infection. *Trends in microbiology*. 2011 Jul;19(7):368-75. PubMed PMID: 21530270. Pubmed Central PMCID: 3130080.
31. Lee CJ, Lin HR, Liao CL, Lin YL. Cholesterol effectively blocks entry of flavivirus. *Journal of virology*. 2008 Jul;82(13):6470-80. PubMed PMID: 18448543. Pubmed Central PMCID: 2447114.
32. Greenspan P, Yu H, Mao F, Gutman RL. Cholesterol deposition in macrophages: foam cell formation mediated by cholesterol-enriched oxidized low density lipoprotein. *Journal of lipid research*. 1997 Jan;38(1):101-9. PubMed PMID: 9034204.
33. Soto-Acosta R, Bautista-Carbajal P, Cervantes-Salazar M, Angel-Ambrocio AH, Del Angel RM. DENV up-regulates the HMG-CoA reductase activity through the impairment of AMPK phosphorylation: A potential antiviral target. *PLoS pathogens*. 2017 Apr;13(4):e1006257. PubMed PMID: 28384260. Pubmed Central PMCID: 5383345.
34. Faustino AF, Carvalho FA, Martins IC, Castanho MA, Mohana-Borges R, Almeida FC, et al. Dengue virus capsid protein interacts specifically with very low-density lipoproteins. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2014 Jan;10(1):247-55. PubMed PMID: 23792329.

35. Syed GH, Khan M, Yang S, Siddiqui A. Hepatitis C virus lipovirions (HCV-LVP) assemble in the endoplasmic reticulum (ER) and bud off from the ER to Golgi in COPII vesicles. *Journal of virology*. 2017 May 17. PubMed PMID: 28515296.
36. Li Y, Kakinami C, Li Q, Yang B, Li H. Human apolipoprotein A-I is associated with dengue virus and enhances virus infection through SR-BI. *PloS one*. 2013;8(7):e70390. PubMed PMID: 23894648. Pubmed Central PMCID: 3722190.
37. Whitehorn J, Nguyen CVV, Khanh LP, Kien DTH, Quyen NTH, Tran NTT, et al. Lovastatin for the Treatment of Adult Patients With Dengue: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2016 Feb 15;62(4):468-76. PubMed PMID: 26565005. Pubmed Central PMCID: 4725386.
38. Jia L, Betters JL, Yu L. Niemann-pick C1-like 1 (NPC1L1) protein in intestinal and hepatic cholesterol transport. *Annual review of physiology*. 2011;73:239-59. PubMed PMID: 20809793. Pubmed Central PMCID: 3965667.
39. Betters JL, Yu L. NPC1L1 and cholesterol transport. *FEBS letters*. 2010 Jul 02;584(13):2740-7. PubMed PMID: 20307540. Pubmed Central PMCID: 2909875.
40. Petersen NH, Faergeman NJ, Yu L, Wustner D. Kinetic imaging of NPC1L1 and sterol trafficking between plasma membrane and recycling endosomes in hepatoma cells. *Journal of lipid research*. 2008 Sep;49(9):2023-37. PubMed PMID: 18523240.
41. Ge L, Wang J, Qi W, Miao HH, Cao J, Qu YX, et al. The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol-induced internalization of NPC1L1. *Cell metabolism*. 2008 Jun;7(6):508-19. PubMed PMID: 18522832.
42. Weinglass AB, Kohler M, Schulte U, Liu J, Nketiah EO, Thomas A, et al. Extracellular loop C of NPC1L1 is important for binding to ezetimibe.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008 Aug 12;105(32):11140-5. PubMed PMID: 18682566. Pubmed Central PMCID: 2516253.

43. Chang TY, Chang C. Ezetimibe blocks internalization of the NPC1L1/cholesterol complex. *Cell metabolism*. 2008 Jun;7(6):469-71. PubMed PMID: 18522826.

44. Garcia-Calvo M, Lisnock J, Bull HG, Hawes BE, Burnett DA, Braun MP, et al. The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 Jun 07;102(23):8132-7. PubMed PMID: 15928087. Pubmed Central PMCID: 1149415.

45. Sainz B, Jr., Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, et al. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nature medicine*. 2012 Jan 08;18(2):281-5. PubMed PMID: 22231557. Pubmed Central PMCID: 3530957.

46. Lucifora J, Esser K, Protzer U. Ezetimibe blocks hepatitis B virus infection after virus uptake into hepatocytes. *Antiviral research*. 2013 Feb;97(2):195-7. PubMed PMID: 23266293.

47. Soza A. Hepatitis C RNA clearance after treatment with ezetimibe. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2012 Sep;32(8):1323-4. PubMed PMID: 22775777.

48. Helal GK, Gad MA, Abd-Elilah MF, Mahgoup EM. Coadministration of ezetimibe with pegylated interferon plus ribavirin could improve early virological response in chronic hepatitis C obese Egyptian patients. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2016 May;28(5):553-7. PubMed PMID: 26872109.

49. Maksymchuk O, Shysh A, Chashchyn M, Moibenko O. Dietary Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Alter Fatty Acid Composition of Lipids and CYP2E1 Expression in Rat Liver Tissue. *International journal for vitamin and nutrition research Internationale Zeitschrift für Vitamin- und*

Ernahrungsforschung Journal international de vitaminologie et de nutrition. 2016 Jul 21;1-7. PubMed PMID: 27442787.

50. Soto-Acosta R, Bautista-Carbajal P, Syed GH, Siddiqui A, Del Angel RM. Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) inhibits replication and viral morphogenesis of dengue virus. Antiviral research. 2014 Sep;109:132-40. PubMed PMID: 25017471.

51. Martinez-Gutierrez M, Castellanos JE, Gallego-Gomez JC. Statins reduce dengue virus production via decreased virion assembly. Intervirology. 2011;54(4):202-16. PubMed PMID: 21293097.

52. Martinez-Gutierrez M, Correa-Londono LA, Castellanos JE, Gallego-Gomez JC, Osorio JE. Lovastatin delays infection and increases survival rates in AG129 mice infected with dengue virus serotype 2. PloS one. 2014;9(2):e87412. PubMed PMID: 24586275. Pubmed Central PMCID: 3931612.

53. Fajardo-Sanchez E, Galiano V, Villalain J. Spontaneous membrane insertion of a dengue virus NS2A peptide. Archives of biochemistry and biophysics. 2017 Jun 27;627:56-66. PubMed PMID: 28666739.

54. Ikonen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. Nature reviews Molecular cell biology. 2008 Feb;9(2):125-38. PubMed PMID: 18216769.