



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTOMICA Y PATOGENESIS MOLECULAR

“Importancia del colesterol en la infección por el virus
vacunal de la fiebre amarilla (YFV 17D)”

T E S I S

QUE PRESENTA:

CARLOS DANIEL CORDERO RIVERA

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

EN

INFECTÓMICA Y
PATOGENESIS MOLECULAR

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ROSA MARÍA DEL ANGEL NÚÑEZ DE CÁCERES

Ciudad de México.

AGOSTO, 2019

Abreviaturas

DENV.....	Virus de dengue
ZIKV.....	Virus Zika
JEV.....	Virus de la encefalitis japonesa
YFV.....	Virus de la fiebre amarilla
YF.....	Fiebre amarilla
YFV 17D.....	Cepa vacunal del virus de la fiebre amarilla
TBEV.....	Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas
WNV.....	Virus del Nilo Occidental
VHF.....	Fiebres hemorrágicas virales
YEL-AVD.....	Enfermedad vicerotópica asociada a la vacuna de YFV
YEL-AND.....	Enfermedad neurotrópica asociada a la vacuna de YFV
HMGC _o A Reductasa.....	Hidroxi-metilglutaril-Coenzima A reductasa
RC.....	Complejos de replicación
Huh-7.....	Línea celular de hepatocarcinoma humano
LDLr.....	Receptor de lipoproteína de baja densidad
UFP/ml.....	Unidades formadoras de placa por mililitro
MEM.....	Medio mínimo esencial
DMEM.....	Medio Dulbelco's Eagle mínimo esencial
VHF.....	Fiebre hemorrágica viral
SFB.....	Suero fetal Bovino
SP.....	Solución permeabilizadora
MβCd.....	Metil beta ciclodextrina
MOI.....	Multiplicidad de infección
Hpi.....	Horas post-infección
TA.....	Temperatura ambiente
RE.....	Retículo endoplásmico

Tabla de contenido

Abreviaturas	1
Resumen	5
Abstract	6
Introducción	7
Genero viral <i>Flavivirus</i>	8
Fiebre amarilla	8
Epidemiología	9
Virus de la fiebre amarilla	12
Estructura viral.....	12
Replicación del virus de la fiebre amarilla	14
Patogenicidad de YFV	15
Vacuna de YFV 17D	17
Historia del desarrollo de la vacuna YFV 17D	17
YFV 17D contra la fiebre amarilla como amenaza actual.....	19
YFV 17D como modelo de estudio de YFV-Asibi	20
Antecedentes Generales	21
Colesterol	21
Colesterol en las infecciones virales por flavivirus	24
Unión y entrada viral.....	24
Fusión viral.....	25
Replicación viral	25
Antecedentes Específicos	26
Justificación	27
Hipótesis	28
Objetivo General	28
Objetivos Particulares	28
Diagrama de flujo de trabajo	28
Materiales y métodos	29
Cultivos celulares y cepas virales	29
Cultivo de células HuH-7 (hepatocarcinoma humana).....	29
Células C6/36 (Células de larva de mosquito <i>Aedes albopictus</i>).....	29
Células BHK-21 (Riñón de hámster recién nacido)	29
Virus de fiebre amarilla	29
Propagación con YFV	29
Propagación en C6/36.....	29
Infección con YFV	30

Ensayo de placa lítica	30
Determinación de infección en células Huh-7.....	31
Microscopía confocal.....	31
Citometría de flujo.....	31
Cuantificación de colesterol celular	32
Microscopía confocal.....	32
Citometría de flujo.....	32
Método fluorimétrico	33
Ensayos de Viabilidad celular	33
Tratamientos.....	34
Metil beta ciclodextrina (M β CD).....	34
Metformina (MET)	34
Lovastatina (LOV)	34
Análisis Estadístico	35
Resultados.....	35
Titulación viral del virus propagado en células C6/36	35
Determinación del porcentaje de infección.....	35
Determinación en el nivel de colesterol celular en un contexto de infección con YFV 17D.....	37
Análisis mediante microscopía confocal de los niveles de colesterol en un contexto de infección con YFV 17D.....	37
Análisis mediante citometría de flujo de los niveles de colesterol en un contexto de infección con YFV 17D.....	39
Análisis mediante método fluorimétrico de los niveles de colesterol en un contexto de infección con YFV 17D	41
Evaluación de la importancia del colesterol celular en células Huh-7 durante la infección con YFV 17D.	41
Efecto del tratamiento con metformina (MET), lovastatina (LOV) y el pretratamiento con metil beta ciclodextrina (M β CD) sobre la viabilidad de células Huh-7	42
Efecto del tratamiento con MET sobre la infección y progenie viral en células Huh-7 infectadas con YFV 17D	46
Efecto del tratamiento con LOV sobre la infección y progenie viral en células Huh-7 infectadas con YFV 17D	47
Efecto del tratamiento con M β CD sobre la infección y progenie viral en células Huh-7 infectadas con YFV 17D	49
Efecto del tratamiento con MET sobre los complejos de replicación viral en células Huh-7 infectadas con YFV 17D	51
Discusión.....	53
Infección de líneas celulares con el YFV 17D	53
Cambios en el metabolismo del colesterol durante la infección por YFV 17D.	55
Importancia del colesterol durante el proceso de entrada del TFV 17D.....	59
Importancia del colesterol en el ciclo replicativo de YFV 17D	60
Conclusiones	64

Perspectivas..... 66
Bibliografía..... 67

Resumen

Entre los virus más relevantes del sector salud humano se encuentran el virus perteneciente a la familia *Flaviviridae*, de manera específica los virus pertenecientes a los géneros *Hepacivirus* y *Flavivirus*, los cuales han ocasionado diversos brotes alrededor del mundo, resurgiendo en nuevas áreas geográficas convirtiéndose en factores de riesgo para la salud humana y animal. El virus prototipo de la familia *Flaviviridae* es el virus de la fiebre amarilla (YFV), el cual, es uno de los pocos flavivirus que cuenta con una cepa vacunal (YFV 17D) que confiere una protección eficiente. Sin embargo, la falta de vacunación ha provocado en la actualidad una diseminación de la enfermedad que esta generando preocupación alrededor del mundo debido al índice de mortalidad que va del 20 al 60% en pacientes infectados. Durante el ciclo de vida, los virus dependen del buen funcionamiento de muchos procesos celulares y de los diferentes componentes celulares que secuestran para su replicación. Entre esos componentes, uno de los más importantes es el colesterol. Trabajos previos de nuestro laboratorio han reportado que el colesterol es importante para el establecimiento de la infección por DENV y ZIKV, los cuales, aumentan el colesterol celular para promover su replicación. Sin embargo, el papel del colesterol durante la infección por YFV (17D) es aún desconocido.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar si YFV 17D puede modificar el metabolismo del colesterol durante la infección en la línea celular de Huh-7. Esto fue analizado por citometría de flujo, un ensayo colorimétrico y técnicas confocales. Además, durante la infección del serotipo vacunal también se evaluó el efecto causado por diferentes fármacos ya aprobados por la FDA, capaces de inhibir la síntesis y la absorción de colesterol.

Nuestros resultados indican que la infección con YFV 17D no modifica los niveles de colesterol celular; sin embargo, el uso de medicamentos para reducir el colesterol o inhibidores de la absorción de colesterol aprobados por la FDA obstaculizó la infección viral y la producción de partículas virales infectivas, al afectar la formación de complejos replicativos, indicando que el colesterol es importante para el ciclo replicativo de YFV 17D en células de hepatocarcinoma humano.

Abstract

Among the most relevant viruses in the human health sector is the virus belonging to the family *Flaviviridae*, specifically the viruses belonging to the genera *Hepacivirus* and *Flavivirus*, which have caused various outbreaks around the world, reemerging in new geographical areas becoming risk factors for human and animal health. The prototype virus of the *Flaviviridae* family is the yellow fever virus (YFV), which is a flavivirus with a vaccine strain (YFV 17D) that provides efficient protection. However, the lack of vaccination has currently caused a spread of the disease that is generating concern around the world due to the mortality rate ranging from 20 to 60% in infected patients.

During the life cycle, viruses depend on the good performance of many cellular processes and different cellular components that they sequester for replication. Among these components, one of the most important is cholesterol. Previous work in our laboratory has reported that cholesterol is important for the establishment of infection by DENV and ZIKV, which increase cellular cholesterol to promote its replication. However, the role of cholesterol during YFV (17D) infection is still unknown.

Therefore, the objective of this study was to evaluate if YFV 17D could modify cholesterol metabolism during infection in Huh-7 cell line. This was analyzed by flow cytometry, a colorimetric assay, and confocal techniques. In addition, during infection of the vaccine serotype was also evaluated the effect caused by different drugs already approved by the FDA, able to inhibit the synthesis and absorption of cholesterol.

Our results indicate that infection with YFV 17D does not modify cell cholesterol levels; however, the use of cholesterol-lowering drugs or FDA-approved cholesterol absorption inhibitors hindered viral infection and the production of infective viral particles by affecting the formation of replicative complexes, indicating that cholesterol is important for the replicative cycle of YFV 17D in human hepatocarcinoma cells.

Introducción

La familia *Flaviviridae* comprende a más de 70 virus de RNA de polaridad positiva divididos en cuatro géneros: *Flavivirus* (53 especies); *Hepacivirus* (14 especies); *Pegivirus* (11 especies) y *Pestivirus* (4 especies), de los cuales, los géneros con mayor impacto en la salud humana son los virus pertenecientes al género *Hepacivirus* y *Flavivirus* (Neufeldt *et al.*, 2018); representando un importante problema de salud internacional. El género *Flavivirus* comprende virus de importancia médica como virus dengue (DENV), virus zika (ZIKV), virus de la encefalitis japonesa (JEV) y virus de la fiebre amarilla (YFV), los cuales son transmitidos a los vertebrados principalmente por mosquitos y garrapatas (García *et al.*, 2009).

La fiebre amarilla (YF) es una infección viral hemorrágica, presente en humanos y en primates no humanos. El desarrollo de una vacuna eficiente logro controlar los brotes en diversas partes del mundo, sin embargo, actualmente esta reemergiendo en lugares endémicos como África, América del Sur y América Central (Figura 1) donde no se ha logrado implementar el esquema completo de vacunación para la población susceptible, donde se estima que anualmente se presentan de 84,000 a 170,000 casos con tasas de muerte que van desde los 29,000 a los 60,00. Estos datos han despertado el interés en el estudio y análisis de la patogénesis del agente causal, tomado gran relevancia para el sector salud (Mulatu & Feyisa, 2018).

En la actualidad, México no se considera una zona endémica; sin embargo, ante el escenario epidemiológico actual por los brotes en Brasil y Angola, es necesario estar preparados ante un posible resurgimiento del virus (Acosta & Acosta, 2018).

El estudio del YFV, nos permitirá tener un mejor entendimiento de los procesos involucrado en la infección viral y en el proceso de replicación, resultando en el desarrollo de blancos terapéuticos para su tratamiento. Es por ello, que, en este proyecto, se evaluó la participación del colesterol en diversas etapas de infección viral y si la modificación de los niveles de este altera de forma significativa la replicación viral, en un contexto de infección con la cepa vacunal de YFV (YFV 17D).

Genero viral *Flavivirus*

De manera específica el género *Flavivirus*, denominado así por el virus de la fiebre amarilla (*flavus* amarillo en latín), comprende un grupo de virus envueltos cuyo genoma es de RNA monocatenario de polaridad positiva. Estos virus son transmitidos por artrópodos (arbovirus) y se mantienen en la naturaleza en ciclos de infección complejos que involucran diferentes vectores (principalmente mosquitos y garrapatas) y múltiples huéspedes vertebrados (aves, roedores, murciélagos, caballos, humanos no primates y humanos, entre otros) (Valderrama et al., 2017), con la capacidad de adaptarse rápidamente a cambios debido a la naturaleza de su material genético (Thomas et al., 2014). Un cambio que afecta a la interacción de estos elementos es fundamental para conducir a la aparición o resurgimiento de una enfermedad viral con mayor capacidad de infección, virulencia o transmisión.

Los virus de este genero ocasionan enfermedades virales agudas y autolimitantes con sintomatología de una enfermedad febril, fácilmente confundida con un resfriado común; que, en casos específicos, puede conducir a síntomas más severos, como pérdida vascular, hemorragia severa, shock o complicaciones neurológicas graves, como encefalitis y meningitis (García et al., 2009) parálisis o síndrome de Guillain-Barré (Wen & Shresta, 2019), por lo que han sido considerados como agentes patógenos en la salud pública.

Como medida de control no existen fármacos aprobados contra ningún flavivirus, y en la mayoría de los casos el tratamiento disminuye la sintomatología del paciente pero no ataca de manera directa al virus (Kok, 2016). Por otro lado, sólo se dispone de un número limitado de vacunas contra las principales infecciones flavivirales para uso humano como el YFV, el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV), el JEV, o uso animal como el virus del Nilo occidental (WNV); pero todavía no se dispone de vacunas eficientes contra otros flavivirus médicamente relevantes como el DENV y el ZIKV (Heinz & Stiasny, 2012; Ishikawa et al., 2014).

Fiebre amarilla

El YFV es el miembro prototipo de la familia viral *Flaviviridae* (Monath, 2001; García et al., 2009) y fue el primer arbovirus identificado a principios del siglo XIX como el responsable de grandes epidemias de enfermedad vírica aguda, acompañada de

fiebre hemorrágica en África y en Norte-, Centro- y América del sur (Thomas et al., 2014).

La patogénesis viral se ha dividido en tres etapas que se conocen como periodo de incubación, de remisión y toxico. Posterior al piquete del mosquito infectado, existe un el periodo de incubación de 6 a 10 días aproximadamente. La mayoría de la población infectada no presentan sintomatología; sin embargo, cuando hay síntomas se presentan como un cuadro clínico parecido a un resfriado común con fiebre, cefaleas, dolores musculares, náuseas, vómitos y cansancio (WHO, s/f); después, se presenta un periodo de remisión de 1-2 días en la cual desaparecen los síntomas mostrando mejoría en el paciente, y por ultimo una pequeña población puede progresar a una fase más toxica con síntomas graves caracterizados por fiebre hemorrágica, ictericia, trombocitopenia, fallo renal y hepático, alcanzando un rango de fatalidad que va del 20% al 60% en un plazo de 7 a 10 días compartiendo sintomatología con otras fiebres hemorrágicas virales (VHF) como la fiebre hemorrágica del dengue, la fiebre de Lassa y la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, con manifestaciones hemorrágicas con el característico "vomitito negro" (hematemesis, hemorragia gastrointestinal), trombocitopenia, fallo renal, pero a diferencia de otras VHF, la YF causa daño hepático seguido de ictericia (Douam & Ploss, 2018; WHO, 2018).

Epidemiología

Los flavivirus se mantienen en el ambiente mediante 3 ciclos de transmisión: i) un ciclo selvático que involucra artrópodos, como vectores, y vertebrados no humanos (aves, roedores, murciélagos o primates), como huéspedes, ii) un ciclo rural donde los humanos son infectados debido a actividades relacionadas con el contacto con el ciclo selvático, donde se han identificado diferentes géneros de *Aedes spp.* capaces de realizar la transmisión en ambos continentes. Por último, el iii) ciclo urbano utiliza la transmisión de humano a humano mediado por mosquitos (Valderrama et al., 2017).

La distribución de la infección por YFV se asocia principalmente a la distribución del vector en zonas tropicales y subtropicales y de manera específica es transmitido por el género *Haemagogus* y *Sabethes* en América y el género *Aedes* en África

(Valderrama et al., 2017; WHO, s/f); sin embargo, el cambio climático, la urbanización y el incremento de viajes ha generado un aumento de la distribución y extensión del vector, y por lo tanto del YFV a las poblaciones humanas.

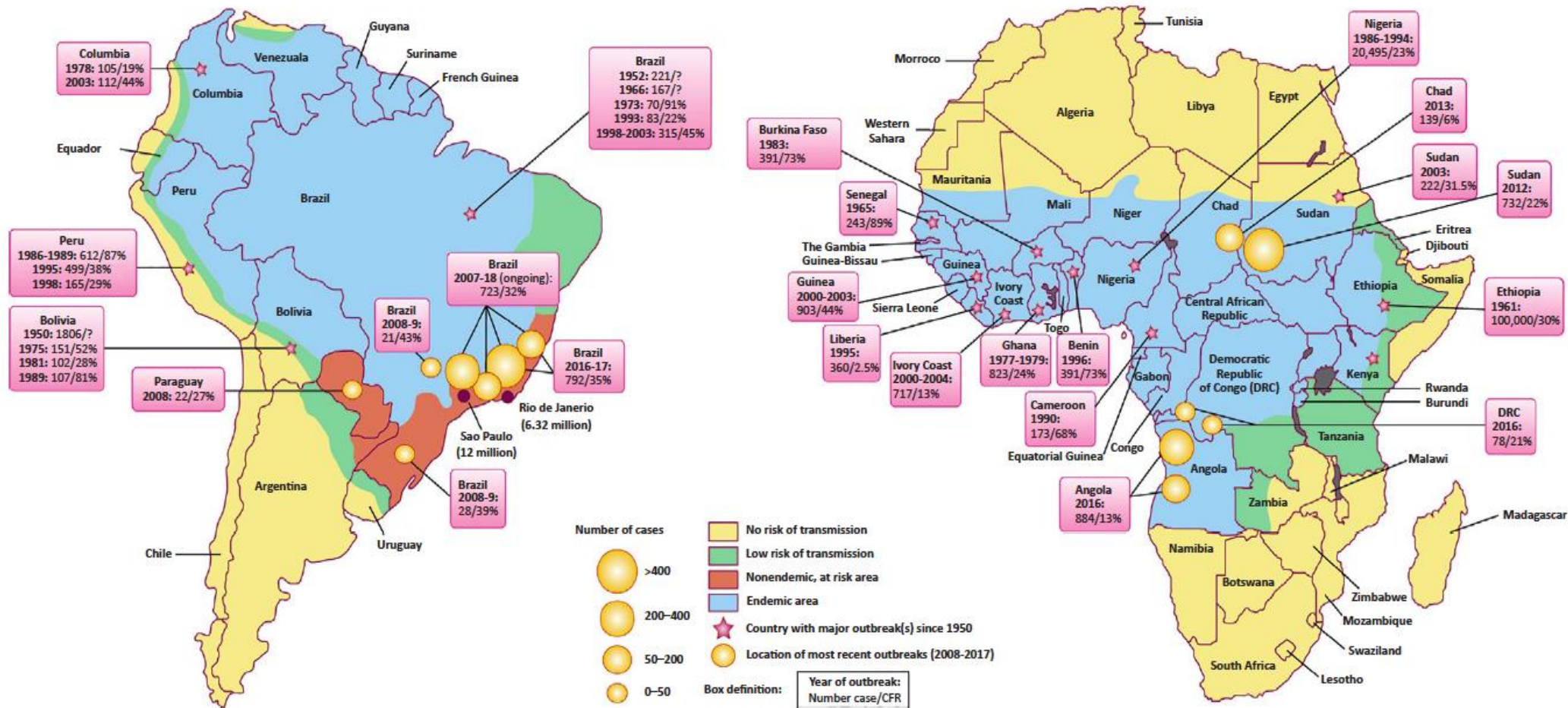


Figura 1 Áreas endémicas del virus de la fiebre amarilla (YFV) y distribución epidemiológica de los brotes de fiebre amarilla (YF) desde 1950. Se muestran las áreas endémicas de YFV (azul) en Sudamérica (izquierda) y África (derecha). También se muestran las áreas no endémicas de riesgo (rojas), las áreas con bajo riesgo de transmisión (verdes) y las áreas sin riesgo de transmisión (amarillas). En cada continente, los países en los que se produjeron brotes importantes de YF entre 1950 y 2018 están marcados por una estrella púrpura, y se muestra información epidemiológica (número de casos/tasa de letalidad, CFR) para algunos de estos brotes. Imagen obtenida de Doum & Hoolback (2018).

Virus de la fiebre amarilla

Estructura viral

El YFV es un virus envuelto de 50 nm de diámetro y que contiene como genoma una cadena de RNA de polaridad positiva de alrededor de 10 233 nucleótidos de longitud, flanqueados por 2 secuencias pequeñas no codificantes 5'UTR y 3'UTR con un tamaño de 100 y de 400 a 700 nucleótidos de longitud dependiendo del serotipo viral de los flavivirus; con un solo marco de lectura abierto generando una poliproteína de 3400 aminoácidos que se procesa en 10 proteínas: 3 proteínas estructurales (core, PrM y E) y siete proteínas no estructurales (NS) (NS1, NS2A-2B, NS3, NS4A-B, y NS5) (Douam & Ploss, 2018) (Figura 2).

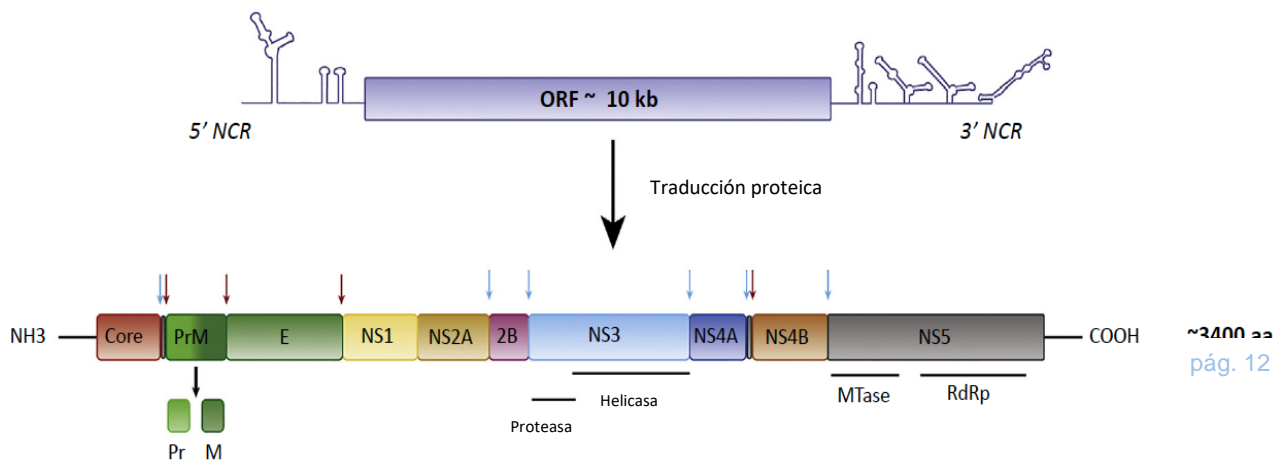


Figura 2 Representación esquemática de ARN viral YFV y poliproteína. Cada proteína viral se representa usando un color distinto y las flechas indican los sitios de corte en la poliproteína procesados por las proteasas de origen celular (flecha roja o negra) o viral (flecha azul). Imagen obtenida por (Douam & Ploss, 2018)

Las proteínas estructurales se incorporan en viriones maduros mientras que las proteínas NS son responsables principalmente de dirigir la replicación viral en células infectadas. La envoltura viral consiste en una bicapa lipídica derivada de la célula infectada, con 90 dímeros de la proteína E, que se mantienen anclados en la superficie mediante sus colas hidrofóbicas

(Monath, 2001; Vratskikh *et al.*, 2013). La nucleocápside contiene al RNA viral y múltiples copias de la proteína C, mientras que en la envoltura viral se encuentran las proteínas prM y la proteína E (Figura 3). La eliminación de la estructura de E se debe a la presencia formas solubles de E (sE) - mostradas esquemáticamente en el panel de viriones maduros - que carecen de la llamada regiones de anclaje de tallo y de membrana (Vratskikh *et al.*, 2013).

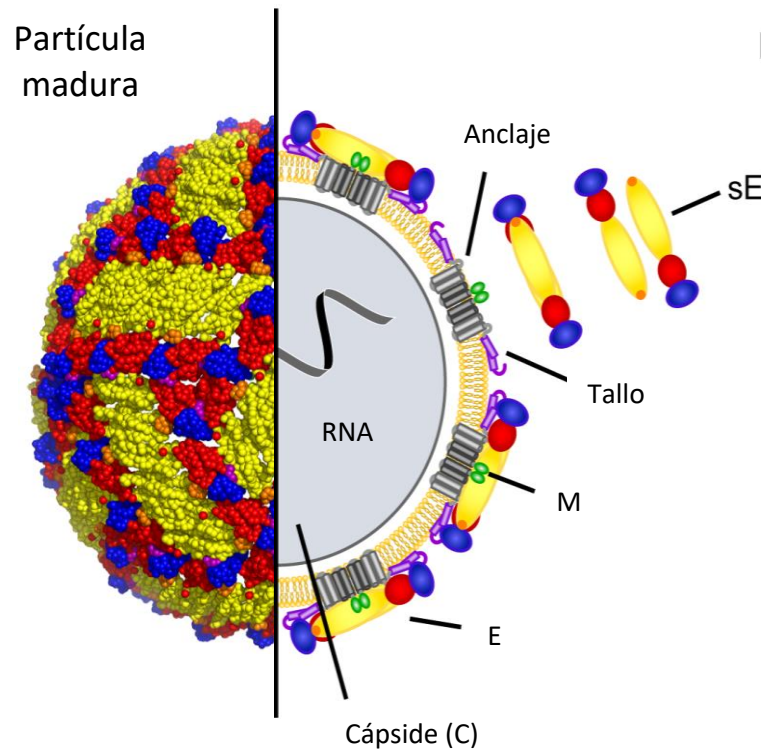


Figura 3 Estructura del virus de la fiebre amarilla. Modelo esquemático de una partícula madura de YFV. Imagen obtenida de Vratskikh *et al.*, 2013.

Replicación del virus de la fiebre amarilla

El ciclo de replicación de YFV se muestra en la Figura 4. La proteína E es la responsable de las fases iniciales (unión e internalización viral) de la infección debido entre otros, a un motivo proteico que contiene Arg-Gly-Asp (RGD) (Monath, 2001; Lee & Lobigs, 2008) involucrado en la unión no específica al glicosaminoglicano heparán sulfato presente en la superficie de células como hepatocitos y células dendríticas (DCs) (Figura 4.1) (Germi *et al.*, 2002). Sin embargo, la presencia de un motivo RGD clásico en el DIII de la proteína de la envoltura de YFV-17D y motivos similares en otros flavivirus sugirió un mecanismo para la interacción con integrinas (Kaufmann & Rossmann, 2011) por lo que se desconoce si es el único receptor celular del huésped al que se une la glicoproteína E de YFV. Posterior a la entrada por endocitosis mediada por clatrina (Figura 4.3 y 4.4) ocurre la liberación del genoma viral en el citoplasma debida al cambio de pH en el endosoma temprano, que permite la fusión de la membrana viral con la del endosoma (Figura 4.5 y 4.6). El RNA viral se traduce en una poliproteína larga que es procesada por acción de la peptidasa señal de origen celular y por la proteasa viral NS2B/3 (Figura 4.7).

Después de la traducción y procesamiento de poliproteína, se lleva a cabo la formación del complejo de replicación del RNA viral el cual ocurre con el reclutamiento de NS1 y el complejo de replicasa NS3 y NS5 por el anclaje a la membrana de NS2A, NS4A y NS4B- (Figura 4.8), todo ello en un ambiente de reordenamientos de las membranas del RE inducidos por NS4A.

El ensamblaje de YFV es poco conocido, pero se cree que las nucleocápsides de YFV recién ensambladas, compuestas de la proteína C y el RNA viral, permanecen dentro de las membranas del RE que albergan a las glicoproteínas E y PrM (Figura 4.9 y 4.10). Estas partículas inmaduras migran a la red trans-Golgi donde se glicosilan y la PrM se corta en dos subunidades, M y Pr, por la proteasa celular furina (Figura 4.11). La liberación de Pr del complejo E-M es un paso crítico para la exocitosis viral (Figura 4.12). Además de la furina, otros factores del huésped son importantes para la maduración de las partículas YFV en la red trans-Golgi, como la bomba de calcio SPCA1, involucrada en la maduración de la glicoproteína.

A pesar de la identificación de algunos factores celulares importantes para la infección, el ciclo de vida de YFV sigue sin entenderse totalmente. Esfuerzos para entender el mecanismo celular de entrada, ensamble y replicación por parte de este virus son urgentes para el desarrollo de estrategias antivirales potentes y específicas.

Patogenicidad de YFV

El tropismo de YFV es vicerotropico en humanos, con replicación viral en el hígado, lo que es crítico para el establecimiento de la enfermedad. Los modelos de infección sugieren que después de la transmisión de YFV de las glándulas salivales del mosquito al humano, el virus infecta DCs y circula a través del nódulo linfático. En el tejido, el YFV se amplifica y desencadena la respuesta inmune celular después de esparcirse por la sangre periférica y antes de alcanzar el hígado para la replicación activa. En este órgano, el YFV induce apoptosis de hepatocitos y necrosis lítica, lo cual, combinado con la esteatosis, resulta en el mayor daño hepático observado durante la infección. También se han descrito lesiones significativas en órganos como corazón, timo, riñón y bazo en humanos y/o en otros animales. Estudios en células humanas sugieren que la virulencia de YFV y/o YFV-17D pueden tener un amplio tropismo en los tejidos; y puede replicar en los hepatocitos, varias células derivadas de la línea hematopoyética, células T, células Kupffer, y células endoteliales (Douam & Ploss, 2018).

El mecanismo preciso de la patogénesis inducida con YFV es poco conocido, aunque muchos de los efectos patogénicos se han relacionado con la apoptosis de hepatocitos causados tanto por efecto citopático inducido por el virus como por una respuesta inmune exacerbada del huésped (Woodson & Holbrook, 2011). Muchos estudios sugieren que la respuesta inmune en sí, a través de una respuesta sistémica y desequilibrada de citoquinas es el principal responsable de la hepatotoxicidad durante la infección con YFV. Se ha visto la presencia de linfocitos T Th1 CD4+ y linfocitos T Th3 CD4+ en el hígado de pacientes que sucumbieron por Y

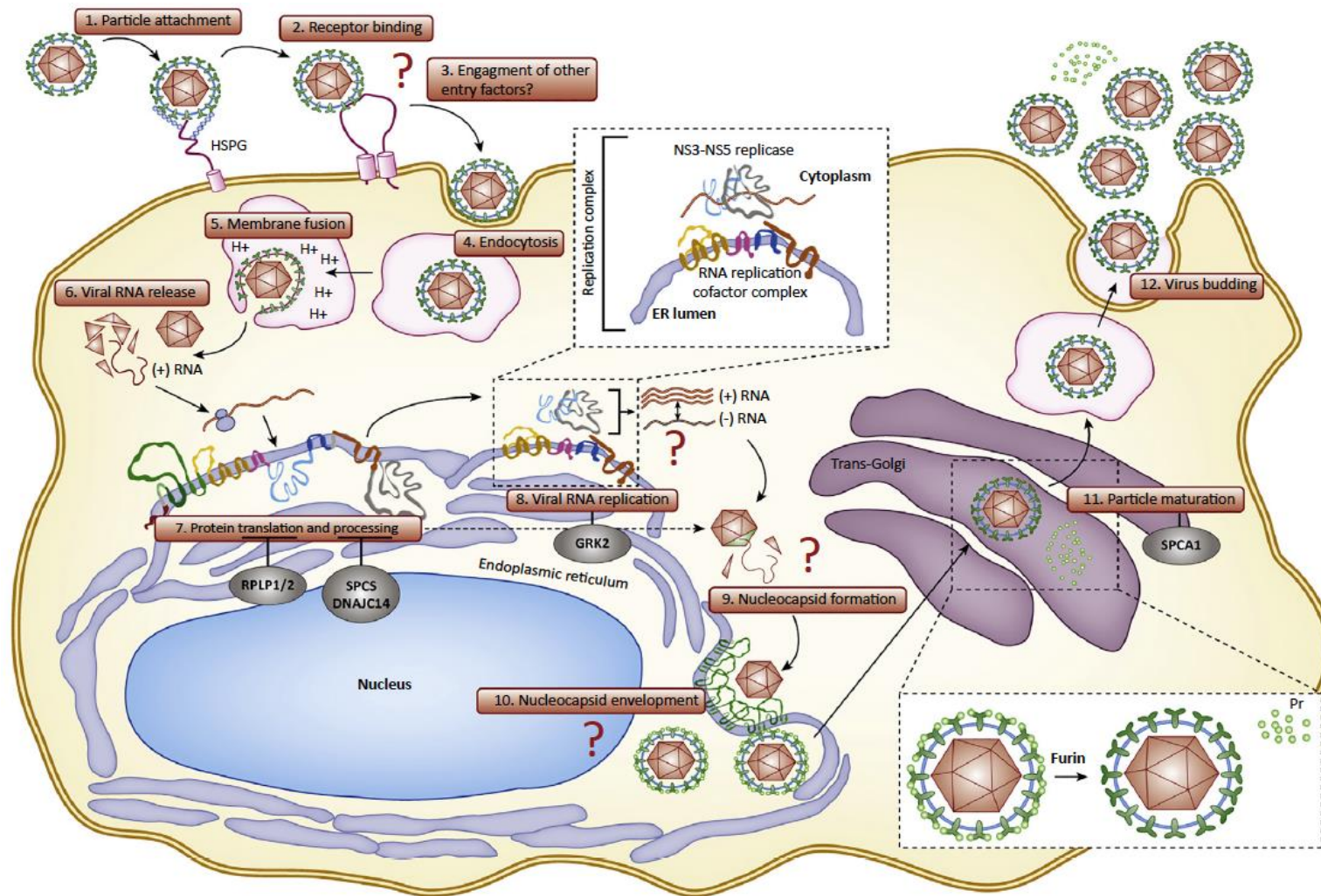


Figura 4 Representación esquemática del ciclo de vida del virus de la fiebre amarilla (YFV). Los pasos clave del ciclo de vida de la réplica YFV se muestran del 1 al 12. Los pocos factores de huésped identificados que regulan algunos de estos pasos se muestran en círculos. El paso de replicación de RNA viral y el paso de maduración PrM-E se amplían en cuadros blancos. Los principales vacíos en nuestra comprensión de los pasos específicos del ciclo de vida se ponen de relieve con signos de interrogación rojos. Imagen obtenida sin modificaciones de Douam & Ploss (2018).

Vacuna de YFV 17D

Historia del desarrollo de la vacuna YFV 17D

Durante muchos años, las terribles epidemias de YFV afectaron a zonas densamente pobladas pero la forma de propagación de la enfermedad permaneció desconocida durante siglos, y no había medios para una intervención racional. No fue hasta 1900, cuando la cuarta Comisión de Fiebre Amarilla del Ejército de los Estados Unidos encabezada por el cirujano Walter Reed utilizó voluntarios humanos para demostrar que un mosquito vector, *Aedes aegypti*, era capaz de diseminar el agente causal y, por lo tanto, la enfermedad (Reed *et al.*, 1900). En el mismo reporte, se demostró que la sangre contaminada seguía siendo infecciosa incluso cuando se pasada por filtros bacterianos, aludiendo a la naturaleza viral del agente causal.

En 1927 Stokes, Bauer y Hudson, miembros de esta comisión, realizaron la identificación del agente etiológico de la YF (Monath & Barrett, 2003; Norrby, 2007) mediante el aislado obtenido de muestra sanguínea de un paciente africano sobreviviente de 28 años, llamado Asibi. El YFV, designado como YFV-Asibi, fue usado para dar pases seriados en el mono *Macacus rhesus* de la India, el primer modelo de laboratorio que presentaba señales significativas de enfermedad y muerte (Stokes *et al.*, 1928), muy similares a los presentados en humanos. A fin de realizar el análisis y estudio viral en ratones, Theiler observó que al realizar inyecciones intraperitoneales de virus provenientes de monos infectados, se observaban afectaciones neurológicas pero no viscerales (Theiler, 1930) en dicho biomodelo. Sin embargo, cuando se inyectó intracranealmente, el virus fue adaptándose a inducir elevada neurovirulencia capaz de realizar infecciones a un nuevo ratón (Theiler & Smith, 1937; Norrby, 2007) pero disminuyendo su virulencia a los monos.

Debido a lo anterior, Max Theiler y colaboradores basándose en métodos de crecimiento y atenuación realizaron 235-240 pasajes del virus Asibi en tejidos embrionarios de ratones logrando obtener la primera cepa atenuada, llamada 17D (Theiler, 1930; Barrett, 2017), la cual presentaba disminución de daño vicerotrópico, con un ligero aumento de efectos neurológicos. De manera específica su desarrollo involucró pasar 18 veces la cepa Asibi en embriones de ratón entero triturado,

seguido de 58 pases en embrión de pollo entero triturado y finalmente se mantuvo continuamente en embrión de pollo triturado sin cerebro ni medula espinal conteniendo mínimas cantidades de tejido nervioso por más de 160 subcultivos (Theiler & Smith, 1937). La cepa vacunal 17D poseía las propiedades ideales de una vacuna viva atenuada debido a que producía altos niveles inmunogénicos, pérdida de vicerotropismo y disminución de neurotropismo, y su inyección subcutánea en macacos no generó evidencia de virulencia (Theiler & Smith, 1937); mientras que, en una población humana, la inyección subcutánea generó anticuerpos neutralizantes que fueron detectados en el suero después de 2 semanas post vacunación (Barrett, 2017; Douam & Ploss, 2018). El primer ensayo de campo con la nueva vacuna, se inició y supervisó por la Fundación Rockefeller en Brasil en 1938, resultando en un gran éxito (Norrby, 2007). Debido al uso continuo de más de 400 millones de dosis durante más de 60 años de la vacuna contra el virus 17D se ha demostrado que es un producto notablemente seguro y eficaz, llegando a ser considerada como la mejor vacuna viral desarrollada hasta el momento; por lo que, en 1951, Max Theiler, de la Fundación Rockefeller, recibió el Premio Nobel por su descubrimiento (Norrby, 2007).

Por otro lado, en años recientes se ha descubierto que la vacuna puede causar, en casos muy raros, diseminación de la enfermedad en individuos sanos con un porcentaje alto de mortalidad (de Menezes et al., 2015); por otro lado, existe la posibilidad de meningoencefalitis que se había visto solo en infantes menores de 6 meses de edad pero se ha comenzado a observar en niños mayores pero con una evolución favorable.

La relación entre efectos adversos posteriores a la vacunación ha sido denominada enfermedad vicerotrópica asociada con la vacuna (YEL-AVD -*Yellow vaccine-associated viscerotropic disease*- por sus siglas en inglés) o enfermedad neurotrópica asociada con la vacuna (YEL-AND -*Yellow vaccine-associated neurotropic disease*- por sus siglas en inglés). Existen estudios que mencionan que el riesgo estimado de complicaciones en pacientes vacunados es muy bajo con una tasa de YEL-AVD que oscila entre 0,25 y 0,4 por 100 000 dosis en Estados Unidos, mientras que en una campaña de vacunación en Perú, la tasa de YEL-AVD fue de 7,9 por 100 000 dosis (Porudominsky & Gotuzzo, 2018).

Es bien sabido que no hay antivirales para ninguna enfermedad causada por flavivirus, así que la única terapia es solamente de soporte, por tanto, es evidente que la vacunación con YFV 17D es una herramienta fundamental para prevenir la YF la cual es una enfermedad peligrosa por su alta tasa de letalidad (de Menezes et al., 2015). De hecho, si no fuera por la vacuna, el YFV se podría considerar como un virus de alto riesgo cuyo manejo requeriría del mayor nivel de bioseguridad patogénico (nivel 4) (Barrett, 2017).

YFV 17D contra la fiebre amarilla como amenaza actual

Se puede notar que las campañas de inmunización se han enfocado en áreas endémicas de fiebre amarilla; sin embargo, existen áreas donde los brotes son irregulares, pero su severidad es mayor debido a la ausencia de vacunación. Por ende, los beneficios de la vacuna son muy evidentes sobre todo en situación de brotes de la enfermedad como los ocurridos recientemente.

En África, el YFV ha sido históricamente endémico en regiones tropicales y subtropicales desde nueva Guinea a Etiopía. Entre 1986 y 1994, un brote mayor en Nigeria generó 20 495 casos con un porcentaje de 30% de casos fatales. En 2013, la WHO reportó un estimado de 84 000-170 000 casos de YF y 29 000-60 000 muertes en África (Douam & Ploss, 2018)(Figura 1).

Por el contraste, la cobertura de vacunación en áreas endémicas del este de África con menos actividad de YF se ha mantenido muy baja durante 70 años. Esta baja cobertura ha contribuido al incremento de brotes dramáticos como el brote de YF más largo que empezó en diciembre de 2015, con su pico más alto en febrero de 2016, continuando hasta junio del mismo año, en Angola con 884 casos confirmados y 121 muertes; y en República Democrática del Congo donde el brote fue controlado y erradicado después de una campaña de vacunación (involucrando hasta 20 millones de dosis), donde se agotó dos veces el arsenal mundial de YFV, demostrando problemas de oferta y demanda de la vacuna (Barrett, 2017; Porudominsky & Gotuzzo, 2018). Debido a lo anterior, se determinó el uso de dosis fraccional en las campañas de vacunación alcanzando niveles de inmunización satisfactorios y la estrategia puede ser usada en escenarios de emergencia.

Por su parte en Sudamérica, las áreas endémicas de YFV se extienden desde la región tropical del sureste de Paraguay hasta el norte de Colombia y Venezuela. Los brotes de YF disminuyeron significativamente en América del Sur a pesar de eventos de reemergencia poco frecuentes, pero a veces graves, como en Perú en 1995 (Figura 1). Sin embargo, durante la última década, varios países de América del Sur han experimentado importantes eventos de resurgimiento de la YF. En 2008-2009, un brote en áreas no endémicas de los estados brasileños de Sao Paulo y Rio Grande causó muertes humanas en un 39-43%. A pesar de que no hubo brotes importantes entre 2010 y 2015, se produjo un brote excepcional en Brasil entre diciembre de 2016 y mayo de 2017, donde 792 casos humanos (CFR: 35%) fueron reportados (Figura 4).

Aunque la propagación de la enfermedad se redujo predominantemente entre julio de 2017 y enero de 2018, el número de casos aumentó drásticamente en los primeros 3 meses de 2018, alcanzando un total de 723 casos y 274 muertes al 28 de febrero de 2018, sugiriendo que el resurgimiento cada vez frecuente de casos más intensos de YFV podrían estar conectado a un establecimiento en curso del virus en zonas más densamente pobladas con baja cobertura de vacunación (Douam & Ploss, 2018)

YFV 17D como modelo de estudio de YFV-Asibi

De acuerdo a la secuenciación y comparación de la cepa silvestre (YFV Asibi) y de la cepa vacunal (YFV 17D) se han encontrado 32 cambios en aminoácidos y 68 en nucleótidos (Beck *et al.*, 2013; Douam & Ploss, 2018), los cuales conllevan resultados opuestos en patogenicidad, lo que sugiere que en la interacción diferencial entre huésped-patógeno gobierna la inmunogenicidad de YFV 17D y la patogenicidad de YFV.

Trabajos en cultivo celular y en modelos animales han tratado de descubrir diferencias virológicas e inmunológicas entre la infección con YFV 17D y YFV Asibi. Woodson & Holdbrook (2011), realizando infecciones en líneas celulares no cancerígenas hepáticas (PH5CH8), observaron que YFV Asibi replica con títulos mas altos que YFV 17D; sin embargo, YFV-17D induce apoptosis en comparación

con YFV-Asibi; por otro lado, también demostraron que YFV 17D produce una respuesta de citocinas pro inflamatorias mayor que la cepa silvestre.

Trabajos en tejido primario de células endoteliales vasculares, células de kupffer, MDM y células dendríticas derivadas de monocitos humanos YFV Asibi causa una respuesta proinflamatoria mayor y más prolongada que el YFV-17D (Woodson *et al.*, 2011; Douam *et al.*, 2017).

La mayor diferencia que existe entre la cepa vacunal y la cepa silvestre es en la glicoproteína E con 12 aminoácidos, siendo propuesta como el mayor determinante de patogenicidad y atenuación de YFV ya que Lee & Lobigs (2008) demostraron que aminoácidos específicos ubicados en el dominio III de la proteína E de YFV-17D permiten una mejora en la unión, con una menor diseminación y mayor atenuación. La replicación de YFV-17D parece ser restringida a DCs maduras, previniendo su apoptosis, y permitiendo que las células dendríticas viajen al nódulo linfático mas cercano promoviendo la interacción con los linfocitos T.

A pesar de estos hallazgos, la comprensión general de las interacciones huésped-patógeno que determinan la atenuación y la patogénesis del YFV sigue siendo muy limitada por lo que se necesitan más estudios que permitan identificar las interacciones que gobiernan las diferencias en el resultado de la infección por YFV-17D y la infección por el YFV silvestre.

Antecedentes Generales

Colesterol

El colesterol cumple un papel importante en procesos biofísicos, de señalización y endócrinos en muchos sistemas biológicos. Es indispensable para mantener la homeostasis celular conservando las propiedades fisicoquímicas de las membranas biológicas, tal como la fluidez, estructura y permeabilidad (de Meyer & Smit, 2009). El colesterol es integrado en la membrana de manera espacio específico importante para el anclaje y localización de diversas proteínas; por otro lado, es precursor en la síntesis de vitamina D y de todas las hormonas esteroideas, incluyendo gluco-minero-corticoides y hormonas sexuales por lo que es importante dentro del sistema endócrino (Ikonen, 2008)

Las células cuentan con diversas fuentes de colesterol, la primera es la biosíntesis *de novo*, y la segunda es mediante fuentes exógenas como es la captación de colesterol del medio extracelular contenido en lipoproteínas (Tabas, 2002). Dentro del metabolismo lipídico, el hígado es uno de los órganos más importante para la síntesis, captación y distribución del colesterol, contribuyendo con el 50-75% de la producción diaria de esta molécula.

Los niveles de colesterol celular están regulados por el equilibrio entre la síntesis y captación de colesterol, en dinámica con el microambiente celular que modifica este equilibrio. Al haber gran cantidad de colesterol en el ambiente, se favorece la captación por parte de las células y se reducen la síntesis, mientras que en un ambiente pobre de colesterol se favorece la síntesis *de novo* (Tabas, 2002; Ikonen, 2008).

El colesterol es sintetizado en el retículo endoplásmico (RE) por la acción de más de 30 enzimas organizadas en la vía del mevalonato pero es un proceso que se puede resumir en tres fases: La primera comienza a partir de la condensación de tres moléculas de Acetil-CoA para generar Acetoacetil-CoA, y termina hasta la producción de mevalonato por la acción de la enzima Hidroxi-metilglutaril-Coenzima A reductasa (HMGCóA reductasa). La segunda es la conversión del mevalonato a escualeno y la tercera la conversión del escualeno a una molécula de 27 carbonos, denominada colesterol (Cortes, 2014)

La HMGCóA reductasa es la enzima limitante de la biosíntesis del colesterol, por lo que es el blanco farmacéutico de muchos medicamentos destinados a reducir el colesterol, como las estatinas (Burg & Espenshade, 2011) las cuales se unen directamente al sitio activo (Istvan, 2001) y han demostrado ser seguras para su uso en humano. Otra de las funciones de las estatinas es la inmunomodulación, mostrando disminución de moduladores de linfocitos T cooperadores del tipo 1 (TH1) y un incremento de moduladores de linfocitos T cooperadores del tipo 2 (TH2), lo que ayudaría a combatir las infecciones mediadas por parásitos que dependen de

una respuesta inflamatoria como helmintos, bacterias y virus (Parihar, Guler, & Brombacher, 2019).

Por su naturaleza hidrófoba, el colesterol no puede ser transportado en plasma, por lo que se asocia a complejos proteicos denominados lipoproteínas, las cuales se clasifican de acuerdo con su densidad: Quilomicrones, VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad), IDL (de densidad intermedia), LDL (de baja densidad) y HDL (de alta densidad). De las anteriores, las LDL es la de mayor contenido de colesterol, la cual está involucrada en su distribución de colesterol a los tejidos circundantes, a través de su captación e internalización por medio del receptor LDLR, en un proceso de endocitosis mediado por clatrina. Este receptor reconoce a la apoproteína B-100 que forma parte de la LDL y promueve la fusión y formación del endosoma que más tarde se fusiona con el lisosoma, en donde la apoproteína B-100 se hidroliza obteniendo como producto aminoácidos y ésteres de colesterol que al ser hidrolizados dan origen a colesterol libre, utilizado principalmente para el mantenimiento de membrana (de Meyer & Smit, 2009; Ikonen, 2008).

En general, la homeostasis de los lípidos en las células de vertebrados está regulada por una familia de factores de transcripción conocidos como proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBPs), los cuales activan directamente la expresión de más de 30 genes implicados en la síntesis y la absorción de colesterol, ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos (Goldstein and Brown, 1990). El genoma de mamíferos codifica tres isoformas SREBP, designados SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2, siendo este último el principal factor de transcripción que controla la expresión de genes implicados en la absorción de las lipoproteínas y la síntesis *de novo* de esteroides, activando los genes involucrados en la vía del mevalonato

Los SREBPs son sintetizados como precursores inactivos unidos al RE, los cuales pueden alcanzar el núcleo y actuar como un factor de transcripción debido a niveles bajos de colesterol celular. Los SREBPs Inmaduros (inactivos) están incrustados en la membrana del RE en asociación con dos proteínas chaperonas SCAP e INSIG, siendo esta última la que evita que el complejo SCAP-SREBP2 se transloque al

núcleo y active los genes de captación y síntesis de colesterol (Goldstein et al., 2006).

De igual manera, la HMGCoA reductasa se une a la proteína INSIG que se localizan en el RE, la cual ejerce acciones que limitan la síntesis del colesterol. La HMGCoA reductasa también tiene dominios de detección de esteroides. En presencia de esteroides, se favorece la unión de la HMGCoA reductasa a INSIG, la cual promueve su ubiquitinación y degradación, mientras que la disminución de los esteroides promueve la degradación de la proteína INSIG y por lo tanto incrementa el tiempo de vida de la HMGCoA reductasa (Parihar et al., 2019).

Colesterol en las infecciones virales por flavivirus

Debido a su austeridad, los virus dependen del buen funcionamiento de diferentes componentes celulares que utilizan para asegurar la generación de progenie viral y su diseminación en el huésped. Aunque el mecanismo no parece ser claro, el metabolismo (vía de síntesis y transporte) del colesterol es necesario para diversos pasos en la infección por virus de la familia *Flaviviridae* (García et al., 2009) como el WNV, JEV, y DENV (Mackenzie et al., 2007; Lee et al., 2008; Leier et al., 2018) específicamente en pasos como la unión y entrada, donde las balsas lipídicas, ricas en colesterol y esfingolípidos, sirven como sitio de reclutamiento de receptores y moléculas de adhesión que dan paso a la internalización del virión (Lee et al., 2008; Medigeshi et al., 2008) la replicación; así como también en la evasión de la respuesta inmune del huésped (Guardo et al., 2010).

Unión y entrada viral

En la infección por DENV la entrada viral es dependiente del uso de colesterol, ya que varias de las moléculas de adhesión y receptores están presentes en balsas lipídicas, las cuales son microdominios membranales ricos en colesterol y esfingolípidos (Guardo et al., 2010). Esta dependencia de colesterol en la entrada también ha sido observada en infección con WNV donde se ha visto que el virus utiliza balsas de lípidos durante las etapas iniciales de internalización (Medigeshi et al., 2008). Como confirmación de este hecho, fármacos que disminuyen la concentración de colesterol celular sobre todo por su secuestro de la membrana

como la M β CD, disminuye la producción vital tanto para DENV (Lee *et al.*, 2008) como para WNV (Medigeshi *et al.*, 2008), provocando un efecto antiviral.

De la misma manera, se ha visto que en las infecciones por DENV y ZIKV existe un incremento en los niveles de colesterol desde etapas muy tempranas, lo cual correlaciona con un incremento en la presencia del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLr) a 1 y 48 hpi aumentando así la absorción de colesterol exógeno (Acosta *et al.*, 2013). Otros receptores involucrados a la misma función son el receptor Niemann Pick C1-like 1 (NPC1L1) y el receptor clase B tipo I (Osuna *et al.*, 2018).

Fusión viral

Como virus envueltos, los flavivirus deben perder la envoltura para poder liberar el material genético en el citosol celular. Se ha observado que los virus deben tener concentraciones apropiadas de colesterol en su envoltura. Carro & Damonte (2013) mostraron que las partículas virales expuestas a M β CD antes de la interacción con las células, pierden la capacidad de infectar. Curiosamente, al tratar de revertir el efecto de M β CD e incubar los viriones con colesterol exógeno, también se inactiva la entrada viral, como lo demostró Lee *et al.* (2008). Para explicar este hecho, se argumenta que el colesterol puede mantener un estado inflexible que evite la unión entre las membranas virales y celulares del huésped. Estos datos sugieren que la fluidez de la membrana, otorgada principalmente por el colesterol, es un factor importante para la inducción de infección con flavivirus.

Replicación viral

Los flavivirus tienen la capacidad de manipular las membranas de la célula huésped a fin de crear un microambiente apropiado para el ensamble de complejos de replicación (RC) y la amplificación del RNA (Neufeldt *et al.*, 2018), funcionando también como una barrera para la detección del material genómico viral en el citoplasma.

De manera específica se ha observado que los ácidos grasos y principalmente el colesterol son componentes fundamentales para la formación de los RCs. De hecho, la proteína NS3 secuestra a la enzima ácido graso sintetasa en los RC, y la HMCoA

reductasa (Acosta *et al.*, 2013) es una enzima residente del RE, lo que hace que la síntesis de los RC se realice eficientemente.

Antecedentes Específicos

Debido a que los hepatocitos son las células con el mayor nivel de síntesis de colesterol y al ser el blanco principal en las infecciones por flavivirus, se decidió evaluar la importancia del colesterol en infecciones con YFV en este tipo celular.

De manera específica en el laboratorio, Acosta *et al.* (2013) demostraron que la cantidad total de colesterol y la formación de balsas lipídicas se incrementaba después de la infección con DENV en la línea celular de hepatocarcinoma humano (Huh-7), correlacionado con el incremento del receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDLr) y un incremento en los niveles de actividad de la HMGCoA. Mediante el uso de fármacos inhibidores del colesterol celular (nistatina, filipina y M β CD) e inhibidores de la síntesis de colesterol (lovastatina y pravastatina), se confirmó la importancia del colesterol y las balsas lipídicas en la entrada de dos serotipos de DENV (2 y 4) y se concluyó que el colesterol tiene un papel en etapas posteriores a la entrada.

El incremento del 15 al 20% en los niveles de colesterol total se observó desde la primera hpi, lo que sugiere que la unión viral dispara una serie de mecanismos que llevan a la acumulación de colesterol; sin embargo, se requiere de la replicación viral, para que el aumento en la captación y síntesis de colesterol se mantenga.

Por su parte, Farfán en su tesis de maestría (2018), realizó estudios para determinar los niveles de colesterol durante la infección con ZIKV en líneas celulares de linaje neural (U-87), hepático (Huh-7) y placentario (BeWo). Comprobó que a una MOI de 10 se logró tener una infección exitosa. Sin embargo, mediante microscopia confocal y tinción del colesterol con filipina III, no encontró diferencias significativas entre la cantidad de colesterol de las células infectadas y las células no infectadas. Cuando se evaluaron los niveles de colesterol mediante citometría de flujo, las diferencias entre la cantidad de colesterol de las células no infectadas e infectadas con ZIKV si pudieron ser detectadas. Estas diferencias fueron confirmadas mediante ensayos colorimétricos de colesterol total. Los resultados obtenidos con células U-87 y BeWo,

mostraron que la infección causada por ZIKV, produce un incremento en los niveles de colesterol a las 24 hpi, medido tanto por citometría de flujo como por un ensayo colorimétrico de colesterol total. El uso M β CD y metformina, como una posible herramienta terapéutica en la infección con ZIKV fue nuevamente confirmada ya que se logra reducir la infección en células Huh-7, BeWo y en U-87, con inhibiciones que iban desde el 40% hasta el 15%, respectivamente; y la generación de progenie viral disminuyó en las tres líneas celulares. Con metformina se logró una mayor reducción de infección en la línea celular Huh-7 alcanzando una disminución de hasta el 50% con cambios discretos en BeWo y U-87, y con un descenso en la progenie viral de las 3 líneas celulares. Analizando el uso de otra estatina, la lovastatina, se observó una reducción estadísticamente significativa en el porcentaje de infección y la progenie viral del ZIKV en células Huh-7, tal como lo hace con DENV.

Justificación

Dentro del género *Flavivirus*, se encuentran diversos virus de interés clínico para el ser humano como DENV, ZIKV y YFV; este último es de gran interés, ya que es considerado el virus prototipo de VHF capaz de causar daño hepático severo seguido de ictericia, alcanzando así una alta tasa de mortalidad.

Debido a su austeridad, durante el ciclo de replicación los virus dependen del buen funcionamiento de diferentes componentes celulares que utilizan para hacer más eficiente su replicación. Trabajos previos de nuestro laboratorio han reportado que el colesterol es importante para el establecimiento de la infección por DENV y ZIKV; sin embargo, el papel del colesterol durante la infección por YFV es aún desconocido por lo que determinar la importancia de dicho componente puede ayudar a conocer más sobre la biología y patogénesis del virus. Por otro lado, la inhibición de factores celulares del huésped con el objetivo de descubrir compuestos potencialmente antinflavivíricos es una estrategia benéfica para el control de enfermedades potencialmente mortales causadas por ellos. Aunque existe una vacuna aprobada y efectiva para el YFV, la baja cobertura mundial y los cada vez más continuos, requieren de medidas alternativas para su tratamiento.

Hipótesis

El colesterol es fundamental para el ciclo replicativo de YFV 17D en células hepatocarcinoma humano (Huh-7).

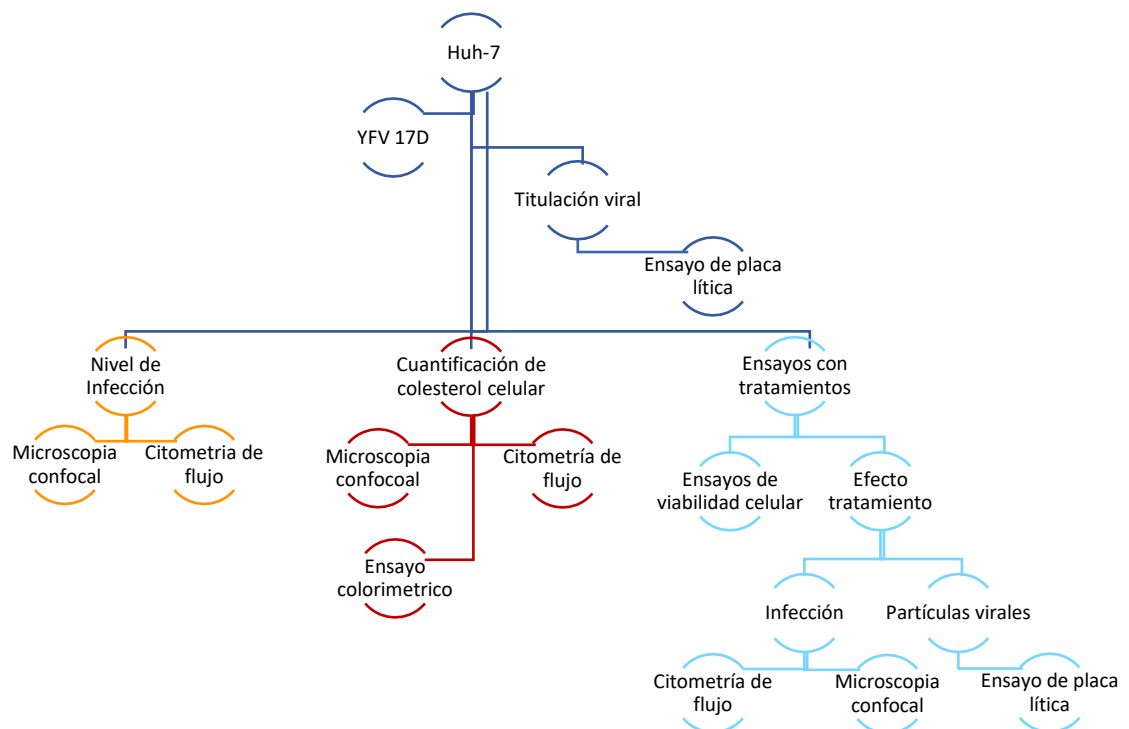
Objetivo General

Determinar la importancia del colesterol en la infección por YFV 17D

Objetivos Particulares

- Establecer un sistema de propagación de YFV 17D en células Huh-7
- Determinar si la infección con YFV 17D induce cambios en los niveles de colesterol en células Huh-7
- Evaluar la importancia del colesterol en el ciclo replicativo viral de YFV 17D en células Huh-7

Diagrama de flujo de trabajo



Materiales y métodos

Cultivos celulares y cepas virales

Para la evaluación de cambios en los niveles de colesterol se utilizó la línea celular de hepatocarcinoma humano (HuH-7).

Cultivo de células HuH-7 (hepatocarcinoma humana)

Las células Huh-7, se cultivaron en placas de 12 pozos con medio DMEM suplementado con glutamina a 2mM, SFB al 8%, penicilina (104 U/ml) y estreptomycin (50µg/ml), 1 mL/L de anfotericina B (Fungizona) a 37 °C con 5% de CO₂ atmosférico.

Células C6/36 (Células de larva de mosquito *Aedes albopictus*)

Las células C6/36 se cultivaron en placas de 12 pozos con medio MEM (Invitrogen) suplementado con SFB 10% (Sigma), vitaminas (Invitrogen), 0,034% bicarbonato de sodio (J.T. Baker), 100 µg/mL estreptomycin y 100 U/mL de penicilina (Sigma) a 35°C con 5% de CO₂ atmosférico.

Células BHK-21 (Riñón de hámster recién nacido)

Las células BHK 21 se cultivaron en placas de 12 pozos con medio MEM (Invitrogen) suplementado con 10% de SFB (Sigma) a 37°C con 5% de CO₂ atmosférico.

Virus de fiebre amarilla

Se utilizó la cepa vacunal YFV 17D, la cual se obtuvo mediante la generosa donación del Dr. Juan Santiago Salas Benito de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional.

Propagación con YFV

Propagación en C6/36

Para llevar a cabo la propagación del virus se utilizaron frascos de crecimiento celular los cuales fueron infectados con el sobrenadante criopreservado con YFV 17D, recuperado de la línea celular C6/46 durante 6 días de infección. En una monocapa de células C6/36 al 80% de confluencia cultivadas en un frasco de cultivo de 25cm², se lavó con medio HANKS y se infectó con YFV 17D en una relación 1:6 entre volumen de partículas virales y cultivo celular, respectivamente. Se dejó incubando durante una hora a 37°C sin agitación. A continuación, el medio se eliminó

y la monocapa se lavó con 5 ml de PBS-SFB 0.5% y se agregaron 10 ml de MEM suplementado con SFB 10% incubándolas a 37°C. El sobrenadante fue recuperado a los 5 días post-infección.

Concluido el tiempo de incubación, el sobrenadante se transfirió a un tubo cónico de 50 ml (Falcón), posteriormente se centrifugo a 800 rpm durante 7 minutos a TA, recuperando el sobrenadante y se almacenó a -70°C.

Las propagaciones posteriores se realizaron infectando, con el sobrenadante obtenido de la primera propagación las células C6/36, en frascos de cultivo de 75cm² manteniendo la relación 1:6; repitiendo el procedimiento hasta obtener el tercer pase viral, el cual se utilizó para los siguientes experimentos.

Infección con YFV

Las células C6/36, sembradas al 80% de confluencia e incubadas a 35°C durante 24 horas, fueron lavadas tres veces con medio de HANKS, e infectadas con YFV 17D durante 2 horas a 37 °C. A continuación, las células fueron lavadas con glicina ácida (pH 3) para inactivar el virus no internalizado, se lavaron 3 veces con PBS 1X y se permitió un tiempo de incubación de 48 horas a 37 °C.

Ensayo de placa lítica

El rendimiento viral se cuantificó mediante ensayos de placa lítica. La titulación se llevó a cabo a través de ensayos de placa lítica utilizando la técnica semilíquida descrita por Morens *et al.* (1985) y actualizada por Acuña *et al.* (2001) con algunas modificaciones. A partir de cultivos celulares de BHK-21, sembrados en una multiplaca de 24 pozos, se preparó una suspensión de 2.5×10^5 células/pozo en medio de cultivo D-MEM (Invitrogen) con 10% de SFB y se colocaron 0.5mL por pozo en multiplacas de 24 pozos. Para infectar las células se utilizaron las partículas virales de YFV 17D obtenidas del tercer pase viral por células C6/36 como se indicó con anterioridad. Como medio de absorción se prepararon diluciones seriadas en base 10 (hasta la dilución 10^{-5}) con 50µL de la dilución precedente. Se incluyó un control de células no infectadas donde se agregaron 50µL de medio HANKS sin partículas virales y previamente estéril. Las muestras se dejaron incubando con medio de absorción a razón de 200µL/pozo durante dos horas a 37°C y posteriormente, se le agregó medio de soporte carboximetilcelulosa (CMC) al 1.6%

con medio MEM 2X adicionado con 7% de SFB a razón de 1ml/pozo, dejando incubando la multiplaca a 37°C en atmosfera con CO² al 5% por 5 días. Transcurrido este tiempo, las células se fijaron y tiñeron con naftol blue-black/ácido acético. El revelado sirvió para poder realizar el conteo de las placas líticas formadas. El titulo viral fue expresado en PFU/ml utilizando la siguiente formula:

$$\text{Titulo del virus} = (\text{X placas} * \text{inversa de la dilución viral} * 1000) / 200$$

Donde:

X placas = promedio de las placas contadas

Determinación de infección en células Huh-7

Microscopía confocal

Las células Huh-7 se crecieron en cubreobjetos en placas de 24 pozos, realizando cinéticas de infección con YFV 17D a una MOI de 1. Al término de cada ensayo fueron fijadas con PBS-formaldehido 4% (en una relación 1:2) durante 25 minutos a TA. Los lavados con PBS 1X se realizaron al termino de cada procedimiento y se agregó solución permeabilizadora (saponina al 0.2% y 1% SFB) durante 20 minutos a TA. Para detectar la infección se incubaron con el anticuerpo primario anti-ratón 4G2 (1:200) toda la noche a 4°C y seguido de una contra tinción con el anticuerpo secundario anti-ratón Alexa 488 (1:1000) por 2 horas a TA. Como control negativo se colocó medio HANKS sin partículas virales y previamente estéril. Después de 5 lavados con PBS 1X los cubre objetos se montaron sobre porta objetos con 4µL de Vectashield. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio confocal invertido Zeiss LSM700 laser confocal para finalmente realizar el análisis en el Software ZEN (v 2.3).

Citometría de flujo

Las células Huh-7 se crecieron en placas de 12 pozos, realizando cinéticas de infección con YFV 17D a una MOI de 1. Las células fueron recuperadas mediante el uso de tripsina + EDTA en tubos cónicos de 1.5 mL y lavados con PBS 1X. Las células fueron fijadas con PBS-formaldehido al 4% (en relación 1:2) por 20 minutos y posteriormente fueron bloqueadas con solución permeabilizadora (saponina al 0.2% y 1% SFB) durante 25 minutos a TA. Para marcar la infección se utilizó el

anticuerpo primario anti-ratón 4G2 (1:200) en solución permeabilizadora, dejándolo en incubación toda la noche a 4°C. Mediante lavados con solución permeabilizadora se eliminó el exceso de anticuerpo primario y se utilizó el anticuerpo secundario anti-ratón Alexa 488 (1:1000) por 2 horas a TA. Los controles negativos se procesaron de la misma manera omitiendo el tratamiento con el anticuerpo primario. El conteo celular se realizó en el citómetro de flujo BD LSRFortessa® considerando 10 mil eventos para cada muestra.

Cuantificación de colesterol celular

La cuantificación de los niveles de colesterol celular se realizó por medio de 3 estrategias: la primera y segunda, basada en la cuantificación de la molécula filipina III, la cual forma complejos fluorescentes con el colesterol, que pueden ser analizados por microscopía confocal y por citometría de flujo; y la tercera mediante la medición del colesterol total de células infectadas mediante un ensayo fluorométrico.

Microscopía confocal

Las células Huh-7 se crecieron en cubreobjetos en placas de 24 pozos, realizando cinéticas de infección a 1, 3, 6, 12, 24, 48 h con YFV 17D a una MOI de 1. Estas fueron recuperadas y fijadas siguiendo el procedimiento ya antes mencionado utilizando la tinción con 0.25mg/mL de filipina III (SIGMA®) durante 2 horas a TA seguido de una contra tinción utilizando yoduro de propidio (25 µg/mL-1:1000) por 15 minutos. Los controles negativos se procesaron de la misma manera omitiendo el tratamiento con filipina III (SIGMA®). Después de 5 lavados con PBS los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con 4µL de Vectashields. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio confocal invertido Zeiss LSM700 laser confocal para finalmente realizar el análisis en el Software ZEN (v 2.3).

Citometría de flujo

Las células Huh-7 se crecieron en placas de 12 pozos, realizando cinéticas de infección con YFV 17D a una MOI de 1. Estas fueron recuperadas y fijadas siguiendo el procedimiento ya antes mencionado. Para realizar la tinción del colesterol se utilizó 0.25 mg/mL de filipina III (SIGMA) incubando 2 horas a TA. Posteriormente, se realizó el conteo celular utilizando el citómetro de flujo CytoFLEX con el filtro (VB510-

A), para la detección y cuantificación del colesterol presente en un mínimo de 10 mil eventos por muestra. El análisis de los resultados se realizó utilizando el Software, Flow Jo (vX 0.7).

Método fluorimétrico

Mediante un ensayo fluorimétrico (No.10007640, caymanchem, USA) se realizó la cuantificación del colesterol celular total mediante una serie de reacciones enzimáticas que actúan sobre el colesterol libre y los ésteres de colesterol, para posteriormente, a través de una sonda altamente sensible y fluorescente, detectar los productos correspondientes de esta reacción. La reacción se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para cada ensayo, se contaron 1×10^5 células en cámara de newbauer, las cuales fueron lisadas con 200 μ l de Cloroformo: Isopropanol: NP-40 (7:11:0.1) con ayuda del vortex. El lisado celular se centrifugó a 13 000 x g por 10 minutos recuperando la fase orgánica, la cual se incubó a 50 °C por una hora para evaporar los solventes. El colesterol recuperado se resuspendió en 100 μ l de buffer diluyente para colesterol. A continuación, se adicionaron 50 μ l del colesterol celular más 50 μ l de la solución para la reacción fluorimétrica (47.5 μ l de buffer, 1.5 μ l detector colesterol, 0.5 μ l de HRP, 0.5 μ l oxidasa de colesterol y 0.05 esterasa de colesterol) en una placa oscura de 96 pozos. La reacción se incubó por 30 minutos a 37 °C y la lectura se realizó en un lector de ELISA (TECAN-CFA7691F7) con una longitud de onda de excitación 530-540 nm y una longitud de onda de emisión de 585-595nm.

Ensayos de Viabilidad celular

Para evaluar las concentraciones de los fármacos que fueron utilizadas se realizaron ensayos de viabilidad en la línea celular Huh7, por medio de ensayos de MTT (Bromuro de (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).

Las células Huh-7 se sembraron en placas de 96 pozos y se trataron o no con los diferentes fármacos. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se sustituyó por 100 μ l de medio de cultivo fresco, añadiendo 10 μ L de la solución stock de MTT de 12

mM. Como control negativo se incubaron 10 μ L de la solución de MTT 12mM en 100 μ L de medio solo. Se dejaron incubando a 37°C durante 4 horas. Posterior al tiempo de incubación, se añadió 100 μ l de la solución de SDS-HCl a cada pocillo y la microplaca se incubó nuevamente a 37°C durante 4 horas en una cámara humidificada. Se mezcló de nuevo cada muestra con una pipeta y se realizó la lectura de la absorbancia en un lector de placas de ELISA a 570 nm.

Tratamientos

Para evaluar el papel del colesterol durante la infección por el virus YFV se utilizaron tres diferentes fármacos: Metil beta ciclodextrina (M β CD) (Sigma- C4555), Metformina (MET) (D150959) y Lovastatina (LOV) (ab120614).

Metil beta ciclodextrina (M β CD)

Células Huh-7 cultivadas en multiplacas de 12 pozos fueron tratadas con M β CD utilizando las concentraciones determinadas en los ensayos de viabilidad. A continuación, las células se infectaron con YFV por 2 horas a una MOI de 1. Al término de este tiempo, se retiró el inóculo viral y se colocó medio completo fresco. La infección procedió durante 24 horas, y el porcentaje de células infectadas se determinó por citometría de flujo y la producción de partículas infecciosas por ensayo de placa lítica, siguiendo los procedimientos ya antes mencionados.

Metformina (MET)

A las células Huh-7 cultivadas en multiplacas de 12 pozos se infectaron con YFV a una MOI de 1 durante 2 horas se les retiró el inóculo de absorción y se colocó medio completo fresco en presencia de MET utilizando las concentraciones determinadas por los ensayos de viabilidad. La infección se incubó durante 24 horas. El porcentaje de células infectadas se determinó por citometría de flujo y la producción de partículas infecciosas por ensayo de placa lítica, siguiendo los procedimientos ya antes mencionados.

Lovastatina (LOV)

A las células Huh-7 cultivadas en multiplacas de 12 pozos que fueron infectadas con YFV a una MOI de 1 durante 2 horas se les retiró el inóculo de absorción y se colocó medio completo fresco en presencia de LOV utilizando las concentraciones

determinadas por los ensayos de viabilidad. La infección se incubó durante 24 horas. El porcentaje de células infectadas se determinó por citometría de flujo y la producción de partículas infecciosas por ensayo de placa lítica, siguiendo los procedimientos ya antes mencionados.

Análisis Estadístico

El software Graph Pad Prism vesion 7.0 fue utilizado para el análisis estadístico. Los datos numéricos fueron graficados utilizando el valor de la media y su correspondiente desviación estándar para cada una de las repeticiones independientes. Para evaluar el porcentaje de infección y la progenie viral se utilizó una prueba ANOVA con un intervalo de confianza de 95%, considerando una significancia estadística de 0.05 ($p < 0.05$).

Resultados

Titulación viral del virus propagado en células C6/36

Para determinar la eficiencia de propagación del YFV 17D en células C6/36, se determinó el título viral mediante ensayos de placa líticas, en la línea celular BHK-21, observándose un incremento del conteo de unidades formadoras de placa desde el pase número uno (4×10^5 PFU/mL) hasta el pase tres (4.42×10^7 PFU/mL) (Datos no mostrados). Los resultados mostraron que el virus fue capaz de propagarse eficientemente en la línea celular de mosquito y que se generó una muy buena cantidad de partículas virales que fueron usadas para los siguientes experimentos.

Determinación del porcentaje de infección

El primer paso para poder estudiar las posibles modificaciones en los niveles de colesterol fue encontrar la mejor línea celular para estudiar este proceso. Para ello, se determinó el porcentaje de infección mediante citometría de flujo en cada una de las líneas celulares: células Huh-7, VERO y DC-SIGN. Las tres líneas celulares fueron infectadas a una MOI de 1 a 24 y 48 horas.

Los resultados muestran que, infectando a una MOI de 1, las células Huh-7 lograron alcanzar un porcentaje de infección de 53% y 85% a las 24 y 48 hpi, respectivamente. Por su parte, la línea celular VERO alcanzó un porcentaje de infección de 18% y 60% a las 24 y 48 hpi, respectivamente. Por último, la línea celular

DC-SIGN mostró niveles de infección menores de 15% de infección a las 48 hpi. Con los resultados anteriores se seleccionó la MOI de 1 en las células Huh-7 para realizar los ensayos posteriores (Figura 5)

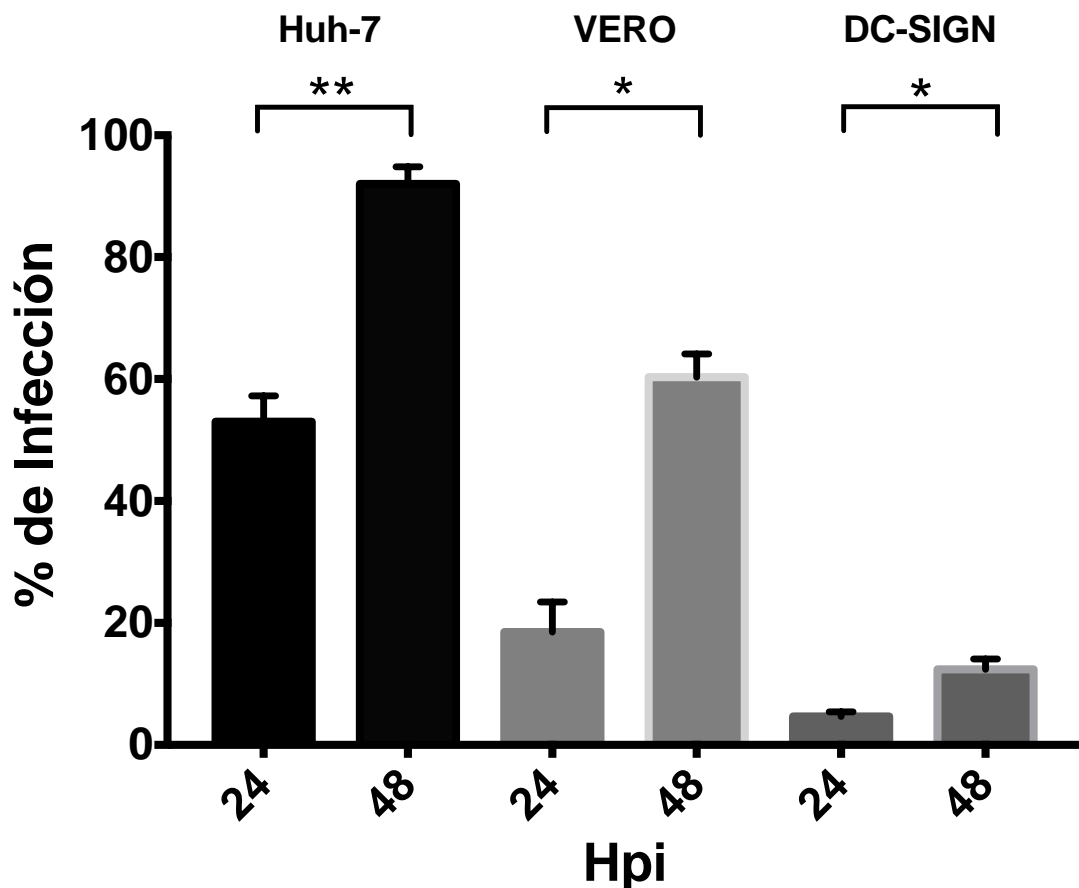


Figura 5 Porcentaje de infección con YFV 17D en células Huh-7, VERO, DC-SIGN analizado mediante citometría de flujo. Células Huh-7, Vero y DC-SIGN se infectaron con YFV 17D a una MOI de 1 durante 24 y 48 horas. La cantidad de células infectadas se analizó mediante citometría de flujo empleando un anticuerpo anti-E. Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la intensidad de fluorescencia media (IMF) de tres ensayos independientes normalizados respecto a la infección “mock”. La diferencia significativa del incremento de células infectadas con YFV 17D comparado con entre 24 y 48 hpi se determinó por T-student ($p > 0.05$).

El porcentaje de infección en las células Huh-7 se corroboró mediante microscopía confocal realizando una tinción con 4G2 (1:200) como anticuerpo primario dirigido contra proteína viral E y Alexa 488 (1:1000) como anticuerpo secundario (Figura 6). La marca de la proteína viral aparece a partir de las 12 hpi y se observa un incremento gradual conforme avanza el tiempo post-infección, corroborando los ensayos realizados mediante citometría de flujo (Figura 5).

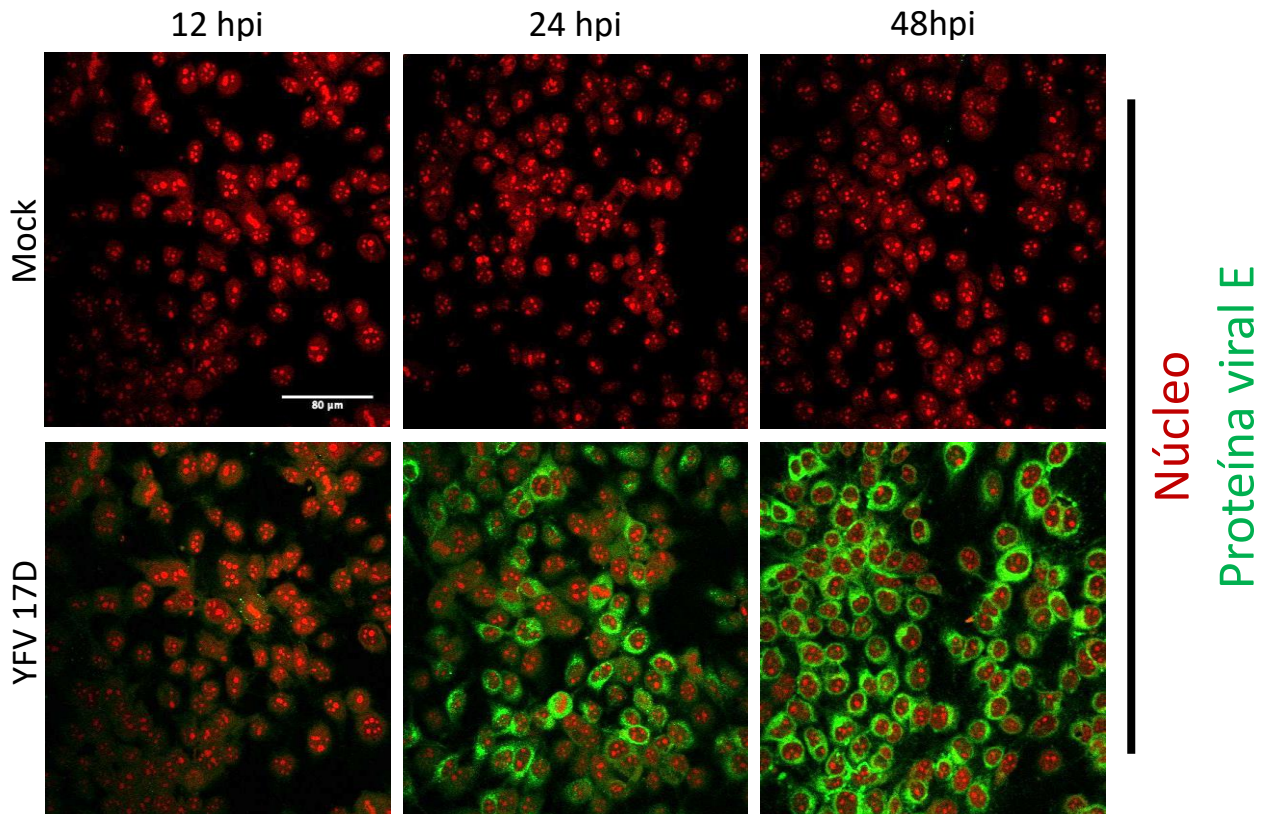


Figura 6 Porcentaje de infección con YFV 17D en células Huh-7 analizado por inmunofluorescencia. Las células Huh-7 infectadas a una MOI de 1 con YFV 17D durante 12, 24 y 48 hpi. La distribución subcelular de las proteínas virales E de YFV 17D fue examinada por inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos correspondientes. Los núcleos fueron teñidos por yoduro de propidio (rojo). Las imágenes provienen de tres experimentos diferentes y sólo se muestran las más representativas.

Determinación en el nivel de colesterol celular en un contexto de infección con YFV 17D

Análisis mediante microscopía confocal de los niveles de colesterol en un contexto de infección con YFV 17D

Como primera herramienta para identificar los cambios en los niveles del colesterol se decidió utilizar la microscopía confocal en células Huh-7 infectadas con YFV 17D a una MOI de 1 realizando una cinética de infección a 6, 12, 24 hpi, misma que fue utilizada en previos estudios con DENV (Soto-Acosta et al., 2013) y ZIKV (Farfan-Morales, 2018). Los resultados no mostraron cambios evidentes en la intensidad de fluorescencia del colesterol marcado con filipina III (1:50) (azul), entre las células no infectadas (mock) e infectadas con YFV 17D a las 6, 12 y 24 hpi. Debido a lo anterior y para corroborar que YFV 17D no cambia los niveles de colesterol celular se decidió analizar una mayor cantidad de tiempos en la cinética de infección con 1, 3, 6, 12, 24 y 48 hpi; sin embargo, tampoco se pudo encontrar cambios evidentes, en ninguna

de las mediciones realizadas, entre las células infectadas y el “mock” (Figura 7). Se puede observar los núcleos marcados con yoduro de propidio (1:1000), mientras que

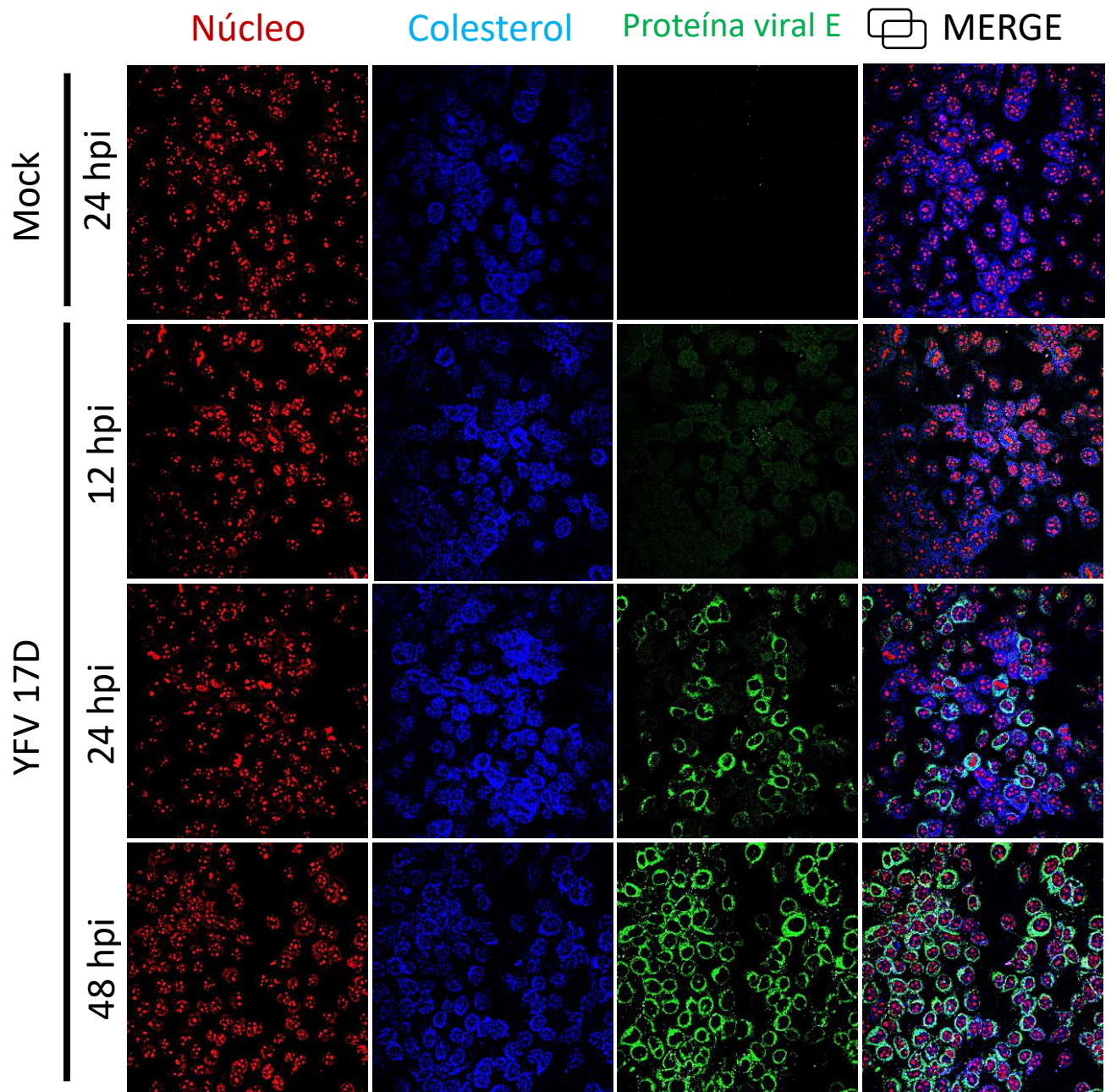


Figura 7 Cambios en los niveles de colesterol en células Huh-7 infectadas con YFV 17D analizado por inmunofluorescencia. Las células Huh-7 infectadas a una MOI de 1 con YFV 17D por 1, 3, 6, 12, 24 y 48 hpi. Las distribuciones subcelulares de las proteínas virales E de YFV 17D y el colesterol celular fueron examinadas por inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos correspondientes. Los núcleos fueron teñidos por yoduro de propidio (rojo). Las imágenes provienen de 3 experimentos diferentes y se muestran las más representativas.

la proteína viral E marcada con 4G2 (1:200) corrobora la presencia de infección celular.

Análisis mediante citometría de flujo de los niveles de colesterol en un contexto de infección con YFV 17D

El análisis de los niveles de colesterol medido por citometría de flujo en las células Huh-7 infectadas con YFV 17D durante 1, 3, 6, 12, 24 y 48 hpi mostraron un comportamiento oscilatorio en comparación con las células no infectadas (figura 8). Sin embargo, estos cambios no resultaron estadísticamente significativos.

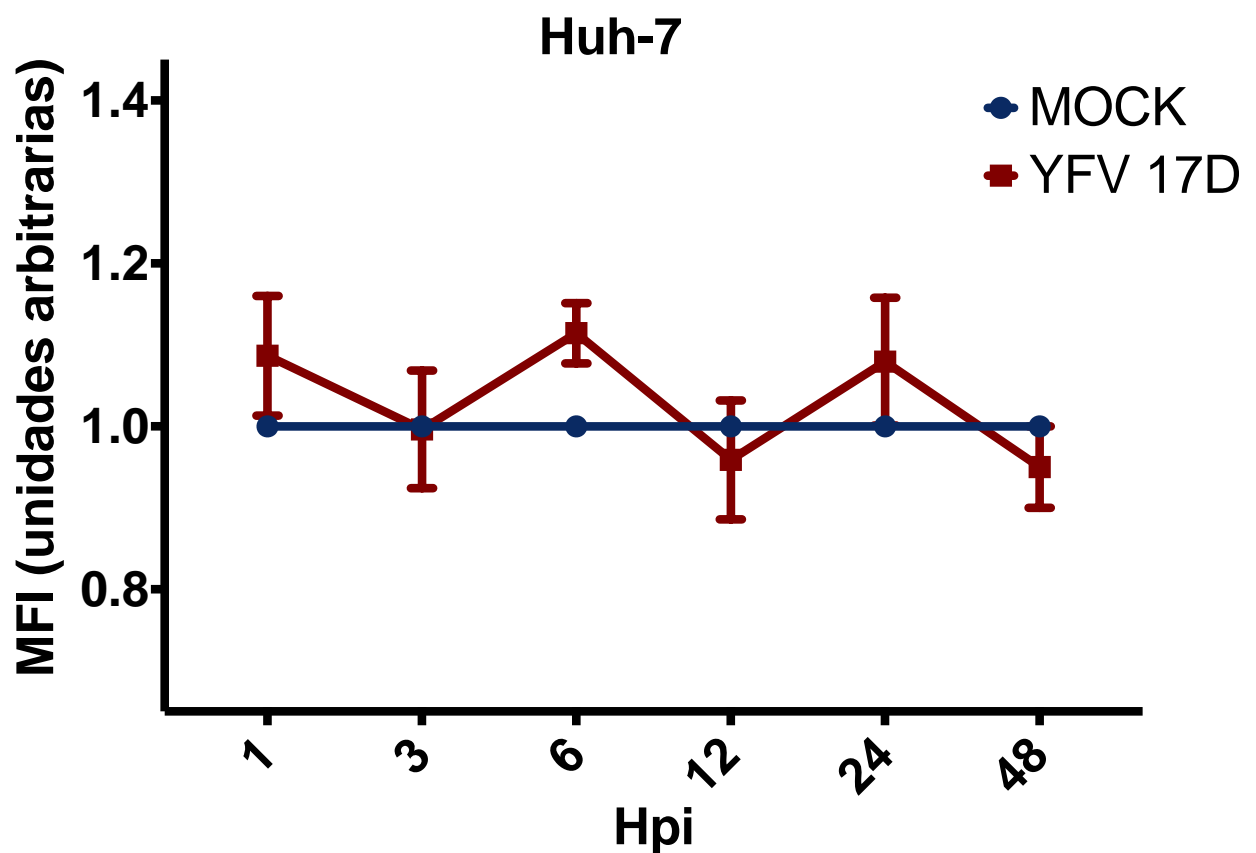


Figura 8 Cambios en los niveles de colesterol en células Huh-7 infectadas con YFV 17D analizado por citometría de flujo. Las células Huh-7 infectadas con YFV 17D a una MOI de 1 por 1, 3, 6, 12, 24 y 48 hpi se incubaron con Filipina III y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la intensidad de fluorescencia media (IMF) de tres ensayos independientes normalizados respecto al "mock". No se observó diferencia significativa en los niveles de colesterol celular entre las células infectadas y las no infectadas ($p > 0.05$, ANOVA).

Al observar los resultados, se considero pertinente analizar si el efecto podía ser diferente en otra línea celular, por lo que se realizó una determinación del nivel de colesterol en un contexto de infección en la línea celular VERO (Figura 9) en los

mismos tiempos de la cinética de infección. De manera interesante, se puede observar que al igual que lo que ocurrió en las células Huh-7 no hubo cambios estadísticamente significativos estadísticamente en los niveles de colesterol entre las células infectadas con el YFV 17D y las no infectadas (figura 9).

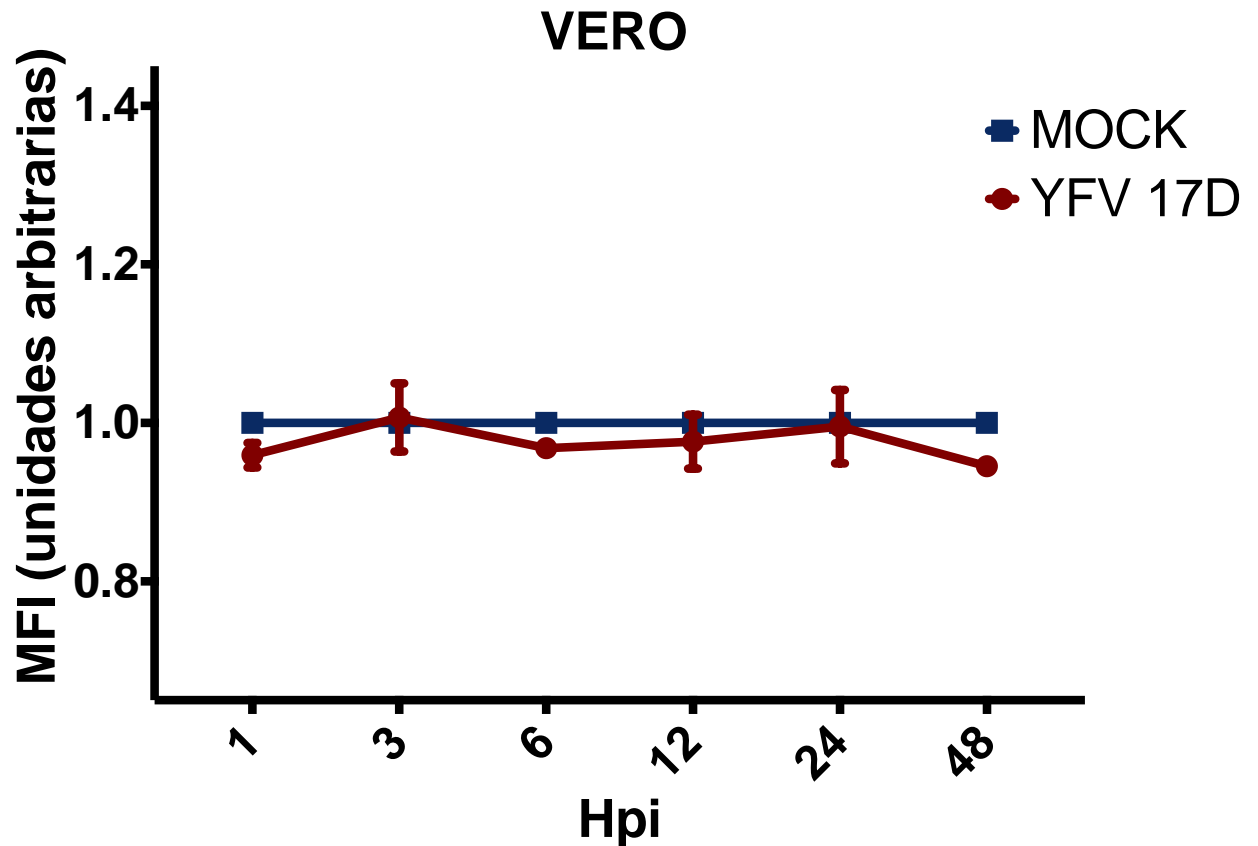


Figura 9 Cambios en los niveles de colesterol en células VERO infectadas con YFV 17D analizado por citometría de flujo. Las células VERO infectadas con YFV 17D a una MOI de 1 por 1, 3, 6, 12, 24 y 48 hpi se incubaron con Filipina III y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la intensidad de fluorescencia media (IMF) de tres ensayos independientes normalizados respecto al “mock”. No se observó diferencia significativa en los niveles de colesterol celular entre las células infectadas y las no infectadas ($p > 0.05$, ANOVA).

Análisis mediante método fluorimétrico de los niveles de colesterol en un contexto de infección con YFV 17D

Debido a los resultados obtenidos con el citómetro de flujo, se decidió realizar un análisis fluorimétrico del colesterol celular total (esterificado y no esterificado). En congruencia con los datos anteriores, no hubo cambios significativos en la cantidad de colesterol celular en las células infectadas con YFV 17D comparadas con células no infectadas (“mock”). Estos resultados contrastan con el aumento en los niveles de colesterol observados en las células Huh-7 infectadas con DENV y ZIKV.

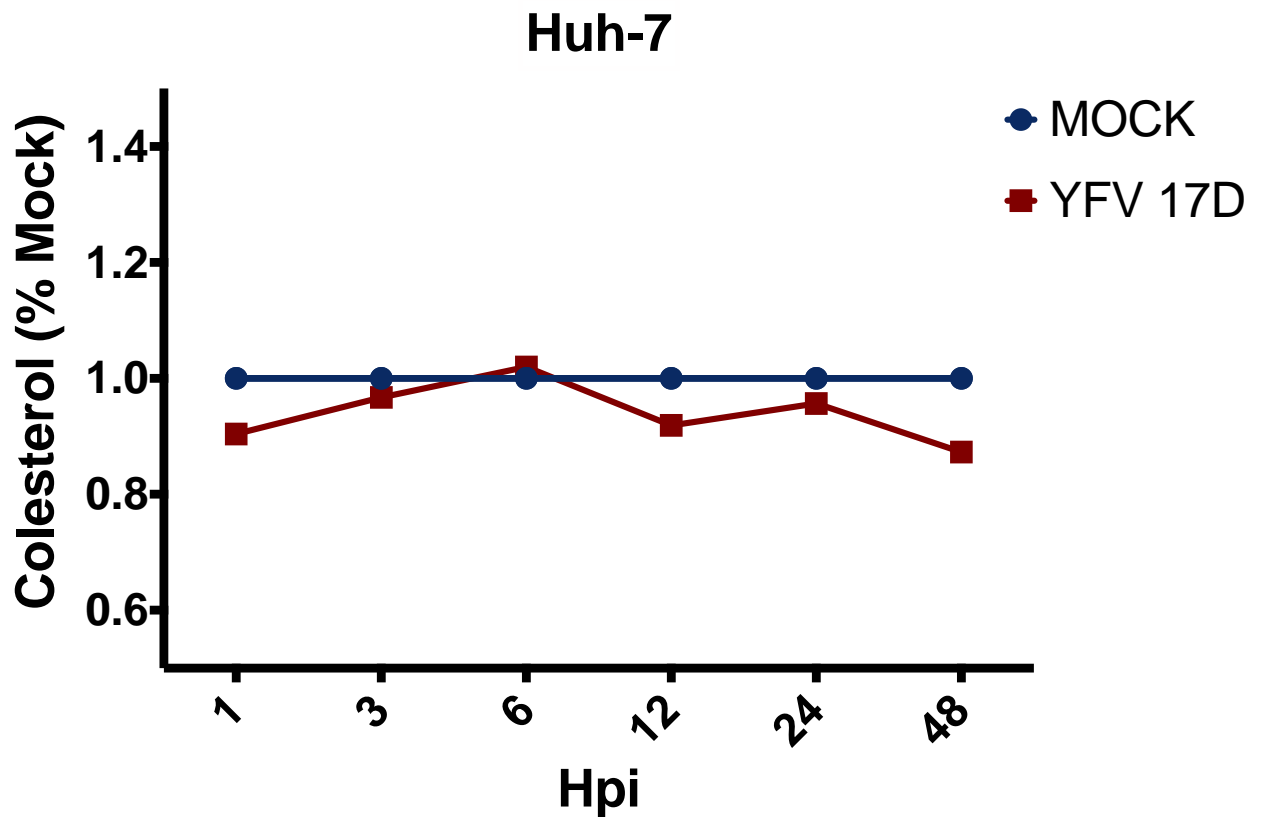


Figura 10 Cambios en los niveles de colesterol en células Huh-7 infectadas con YFV 17D analizado por ensayo colorimétrico. La cantidad de colesterol total de células Huh-7 infectadas con YFV 17D a una MOI de 1 por 1, 3, 6, 12, 24 y 48 hpi se determinó mediante ensayo colorimétrico. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar normalizados respecto al Mock. No se observó diferencia significativa en los niveles de colesterol celular entre las células infectadas y las no infectadas ($p > 0.05$, ANOVA).

Evaluación de la importancia del colesterol celular en células Huh-7 durante la infección con YFV 17D.

A pesar de que la infección no induce el aumento de colesterol, es probable que YFV utilice el colesterol presente en las células. Para determinar la importancia del colesterol celular en el ciclo replicativo de YFV se optó por la utilización de fármacos

que secuestran el colesterol celular como la I) Metil β ciclodextrina (M β CD), fármaco de uso experimental cuya característica de desacoplar el colesterol celular sintetizado de membranas o fármacos que inhiben de manera directa o indirecta la síntesis de colesterol como la II) Lovastatina (LOV), una estatina hidrosoluble que tiene la capacidad de inhibir la actividad de la HMGCoA reductasa, enzima limitante de la reacción de síntesis, provocando una disminución en la síntesis de colesterol o la III) Metformina (MET), fármaco diseñado para disminuir los niveles de glucosa en sangre, con la distinción de tener distintos blancos farmacológicos. Uno de sus blancos es un enzima de tipo cinasa, denominada AMPK la cual modula, al igual que las estatinas, la actividad de la HMGCoA reductasa.

Efecto del tratamiento con metformina (MET), lovastatina (LOV) y el pretratamiento con metil beta ciclodextrina (M β CD) sobre la viabilidad de células Huh-7

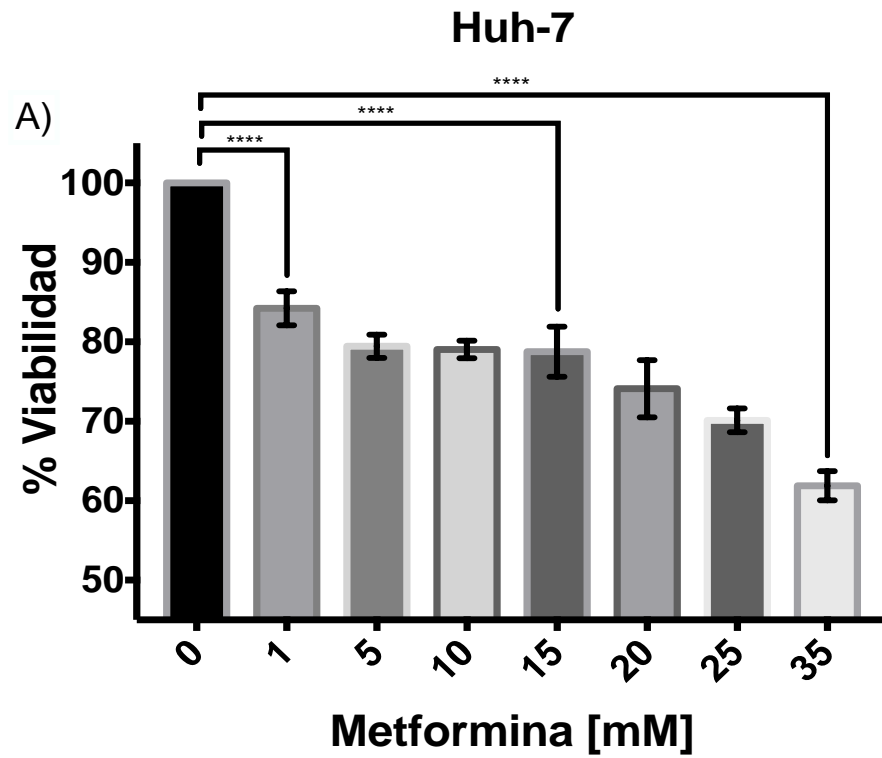
Debido a que algunos fármacos pueden resultar tóxicos y con la finalidad de evitar comprometer la integridad celular se realizaron ensayos de viabilidad celular en placas de 96 pozos mediante ensayos de MTT con los 3 fármacos a utilizar: MET, LOV y M β CD (Figura 11).

Los resultados muestran que la viabilidad desciende de manera, dependiente a la dosis, con MET, llegando a disminuir casi un 40% a una concentración de 35 mM (Figura 11A), mientras que el tratamiento con LOV (Figura 11B) y el pretratamiento con M β CD no mostraron una caída tan drástica de la viabilidad alcanzando disminución no mayor al 20% (Figura 11C).

De manera específica, en la Figura 11A, se observa que existe una disminución significativa de la viabilidad desde el primer tratamiento con MET (1mM) con respecto al Mock y esta diferencia se mantiene hasta la última concentración evaluada (35mM). Por su parte, en el panel B no se obtuvo una diferencia significativa hasta la cuarta concentración evaluada (100 μ M) con LOV, a partir de la cual se observa una caída en la viabilidad celular con respecto al “mock”; y, por último, tratamientos con M β CD sólo muestran una diferencia significativa en la

tercera concentración empleada (5mM) con respecto al “mock”, sin embargo, en concentraciones posteriores no presenta diferencias significativas.

Con base en los estudios de viabilidad celular se escogieron concentraciones de cada fármaco que no afectarán más del 20% de la viabilidad celular con una concentración limitante (CL) máxima de 15mM, 50 μ M y 6.5mM para MET, LOV, y M β CD, respectivamente.



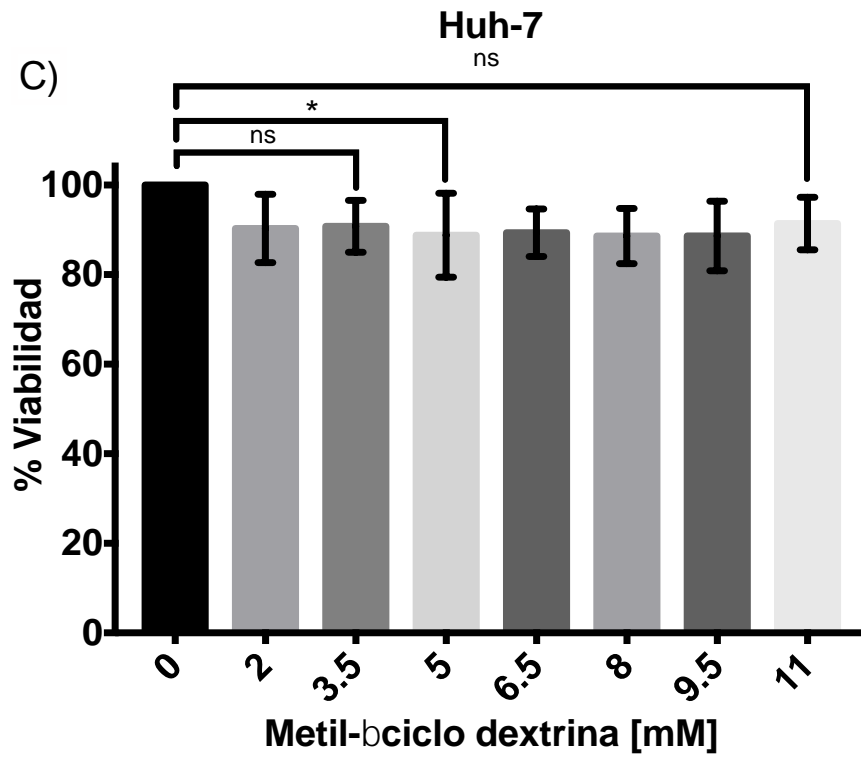
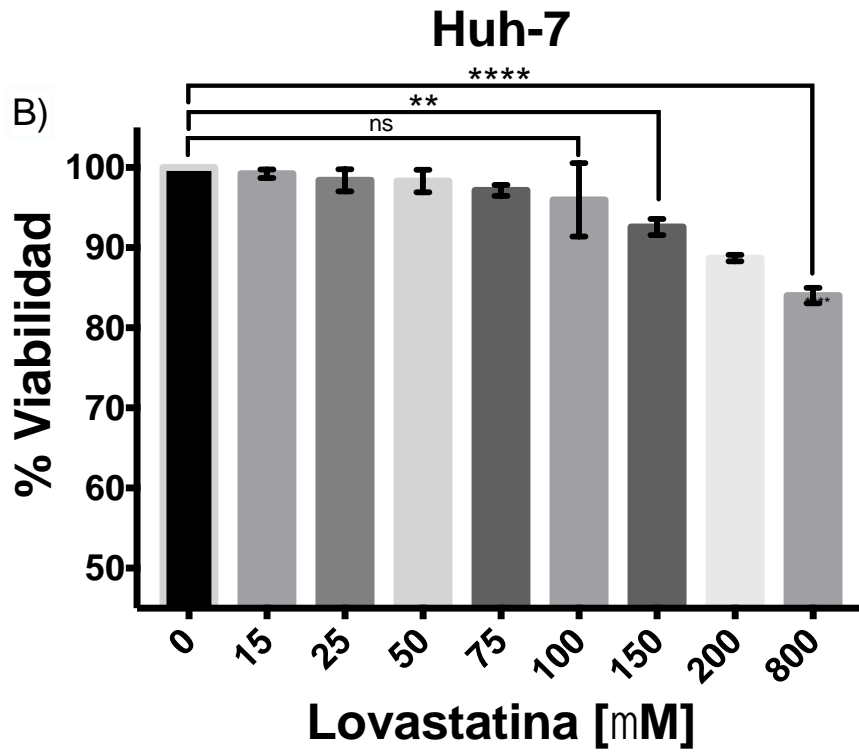


Figura 11 Efecto del tratamiento con MET y LOV, y el pretratamiento con MβCD sobre la viabilidad de células Huh-7. La viabilidad de las células Huh-7 se analizó mediante ensayos de MTT a las 24 horas post tratamiento con MET (A), LOV (B) y MβCD (C). Las células tratadas con el vehículo fueron utilizadas como control (0). Los resultados se expresaron como la media ± error estándar del porcentaje de células viables normalizadas con respecto al control. La CL de los fármacos utilizados fueron 15mM para A) MET; CL=50μl para B) LOV; y CL= 6.5mM para C) MβCD.

Para determinar la importancia de los resultados farmacológicos, se decidió analizar la concentración del fármaco necesaria para disminuir la viabilidad al 50% (CC₅₀). Los resultados se analizaron mediante su normalización con regresión lineal ajustando el intervalo de confianza de 95% (Alpha<0.05). En el caso de MET se obtuvo una EC₅₀ de 30.92. Por su parte la LOV obtuvo una EC₅₀ de 164.6. Por último, la MβCD no se pudo obtener una CC₅₀ debido a que no se pudo disminuir la viabilidad celular más del 90%.

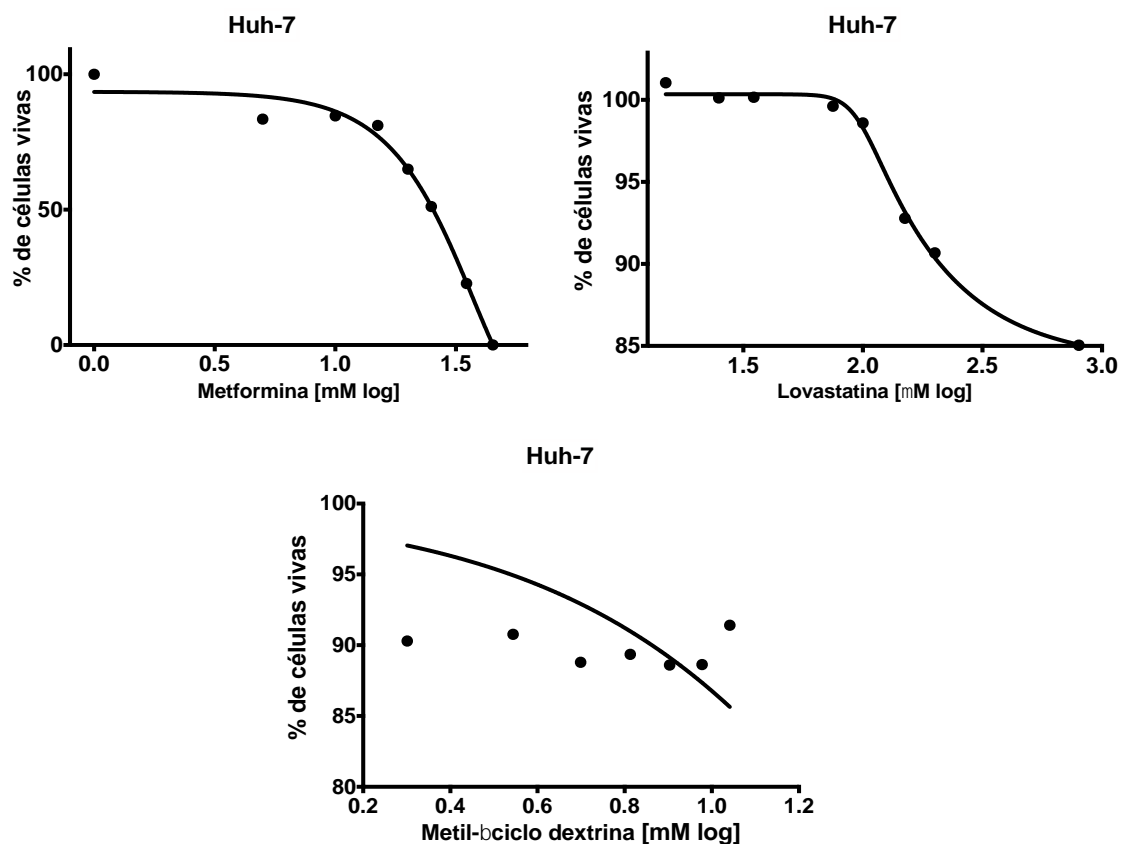


Figura 12 Efecto del tratamiento con MET y LOV, y el pretratamiento con MβCD sobre la viabilidad celular en células Huh-7 mediante regresión lineal.

De acuerdo con las gráficas mostradas se puede observar que la MET presenta un mayor efecto sobre la viabilidad celular, ya que a mayor concentración la pendiente de regresión lineal es mucho más pronunciada. Con respecto a la LOV, donde la

misma pendiente es menos pronunciada y para la MβCD nunca se alcanzó la pendiente (Figura 12), siendo esta última la menos tóxica para las células.

Efecto del tratamiento con MET sobre la infección y progenie viral en células Huh-7 infectadas con YFV 17D

Considerando los ensayos de viabilidad, las células Huh-7 después de ser infectadas a una MOI de 1, fueron tratadas con concentraciones crecientes de MET hasta la CL (15mM) obteniendo como resultado una reducción de manera dependiente a la dosis significativa de más del 75% de la infección (Figura 13).

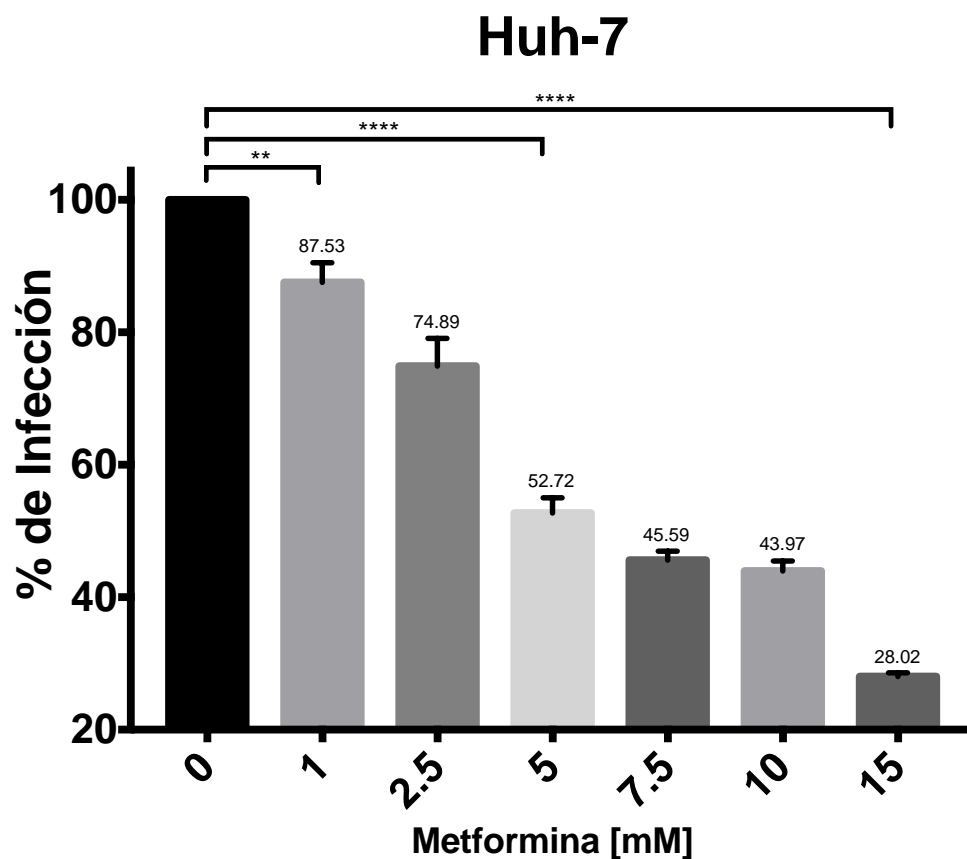


Figura 13 Inhibición de la infección de células Huh-7 por YFV por el tratamiento con LMET. Las células Huh-7 se infectaron con YFV a una MOI de 1. Posterior a la absorción viral, las células fueron tratadas con cantidades crecientes de MET. La cantidad de células infectadas se analizó mediante citometría de flujo usando el anticuerpo 4G2 anti la proteína E. Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar del porcentaje de células infectadas de tres ensayos independientes por duplicado normalizados respecto al control (0mM). * diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0.05$, ANOVA).

La inhibición de la infección causada por el tratamiento con MET fue confirmada al analizar el título viral en el sobrenadante de las células tratadas con el fármaco

mediante ensayo de placa lítica en células BHK-21. Como puede observarse en la figura 14 se encontró una disminución dependiente de la dosis de MET en el título viral, lográndose una reducción de 4.08×10^7 a 2.00×10^5 (2 logaritmos) partículas virales formadoras de placa lítica por ml (PFU/mL) en la dosis de 7.5mM de MET. El ligero incremento en el título viral observado en las concentraciones de 10mM y 15mM no fue significativo.

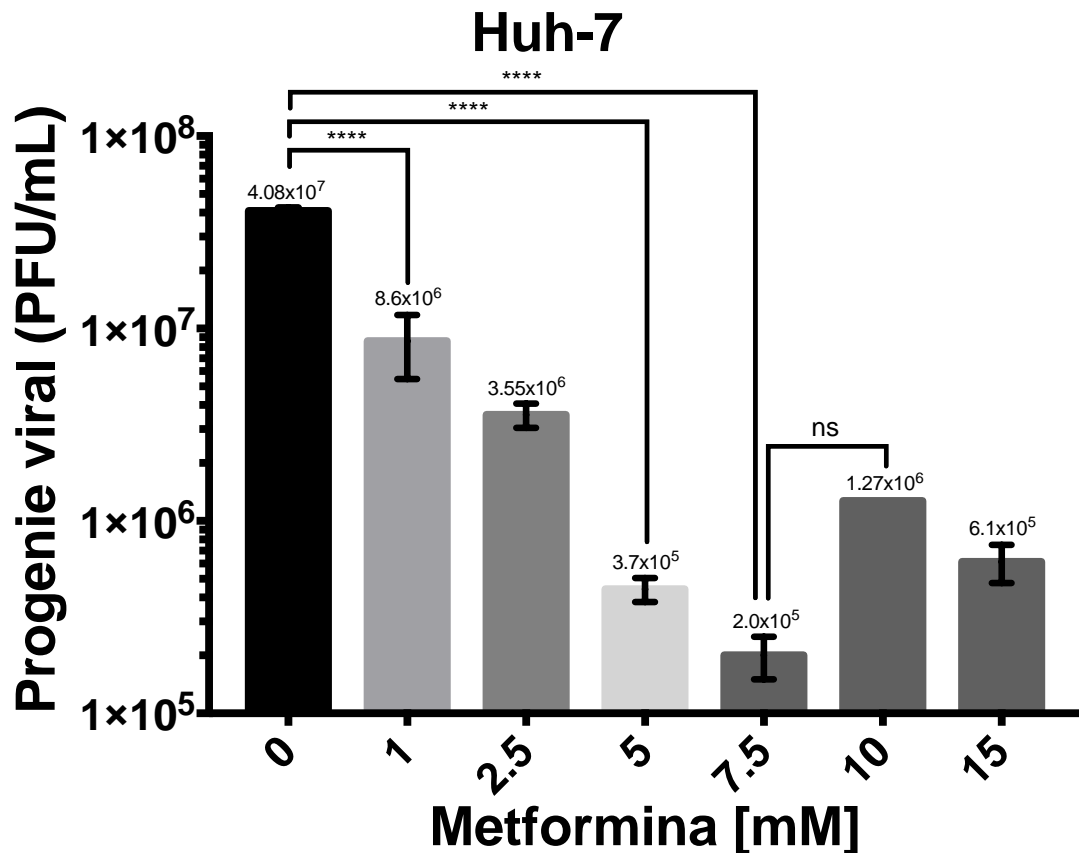


Figura 14 Inhibición de la progenie viral de YFV 17D en células Huh-7 mediante el tratamiento con MET. Tratamiento con MET hasta 15mM redujo de manera dependiente a la dosis, el porcentaje de infección en células Huh-7. Los resultados muestran una reducción significativa a la CL máxima de 4.08×10^7 a 2×10^6 PFU/mL y se expresan como la media + error estándar del porcentaje de células infectadas de tres ensayos independientes por duplicado normalizados respecto al control (0μM). * diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0.05$, ANOVA).

Efecto del tratamiento con LOV sobre la infección y progenie viral en células Huh-7 infectadas con YFV 17D

Para confirmar la importancia del colesterol durante el ciclo de replicación viral, se utilizó la LOV. Para estos ensayos se utilizaron las concentraciones previamente reportadas por nuestro laboratorio.

Considerando los ensayos de viabilidad, las células Huh-7 infectadas a una MOI de 1, fueron tratadas con LOV hasta la CL de 50 μ M. Se encontró una reducción significativa dependiente a la dosis del porcentaje de células infectadas de hasta un 40% en presencia de LOV (Figura 15), apoyando la idea de que el colesterol es importante en el ciclo replicativo viral.

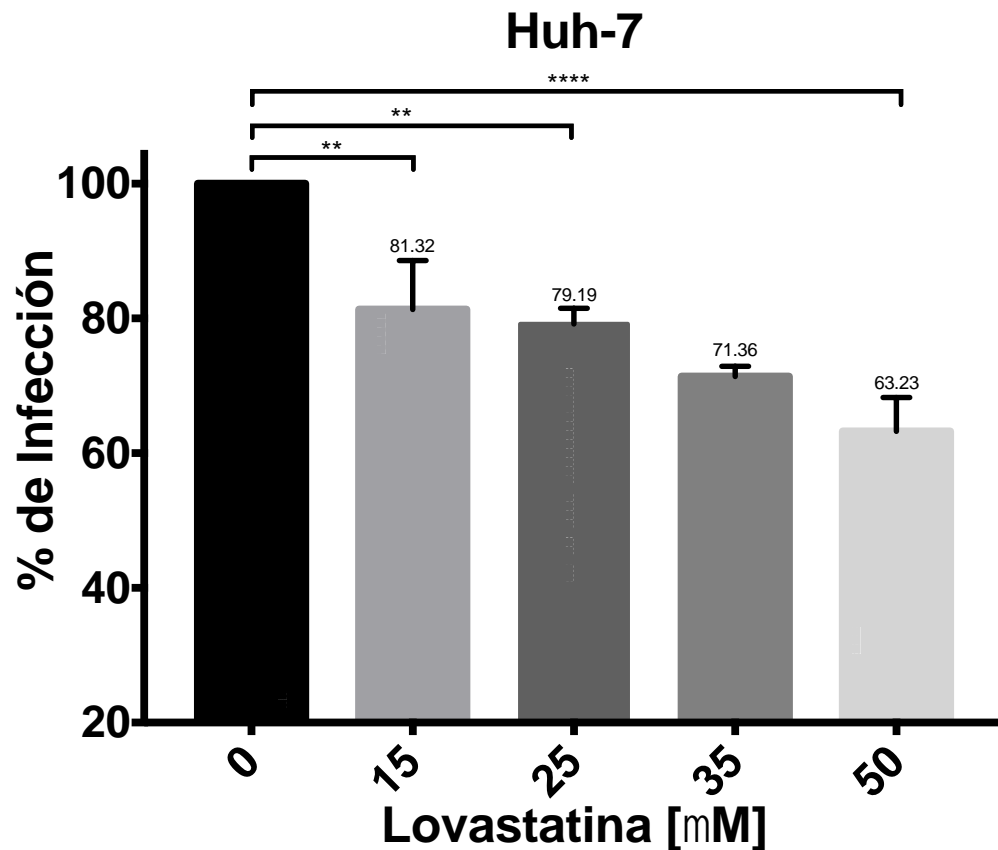


Figura 15 Inhibición de la infección por YFV 17D en células Huh-7 mediante el tratamiento con LOV. Las células Huh-7 se infectaron con YFV a una MOI de 1. Posterior a la absorción viral, las células fueron tratadas con cantidades crecientes de LOV. La cantidad de células infectadas se analizó mediante citometría de flujo usando el anticuerpo 4G2 anti la proteína E. Los resultados se expresaron como la media + error estándar del porcentaje de células infectadas de tres ensayos independientes por duplicado normalizados respecto al control (0mM). * diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0.05$, ANOVA).

Para confirmar el efecto inhibitorio de LOV en la infección de YFV 17D, la producción viral de células Huh-7 infectadas y tratadas con diferentes concentraciones de LOV fue cuantificada mediante ensayos de placa lítica. Como puede observarse hubo una reducción de la producción viral dependiente de la dosis de LOV. El título viral se redujo de 2.08×10^7 a 1.25×10^5 PFU/mL (2 logaritmos) en la dosis de 50 μ M de LOV (Figura 16). Con estos resultados podemos decir que tanto la MET como la LOV

causaron una reducción estadísticamente significativa de la infección de YFV a células Huh-7.

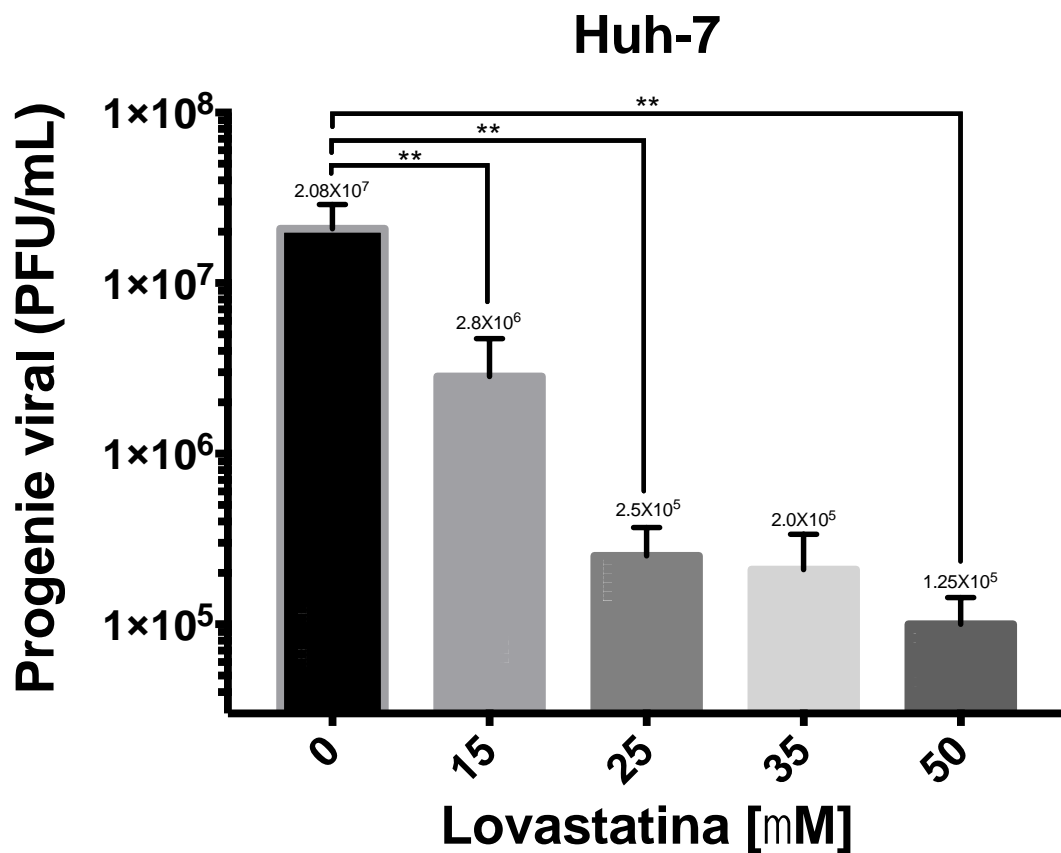


Figura 16 Inhibición de la progenie viral de YFV 17D en células Huh-7 mediante el tratamiento con LOV. Tratamiento con LOV hasta 50μM redujo de manera dependiente a la dosis, el porcentaje de infección en células Huh-7. Los resultados muestran una reducción significativa a la CL máxima de 2.08×10^7 a 1.25×10^5 PFU/mL y se expresan como la media + error estándar del porcentaje de células infectadas de tres ensayos independientes por duplicado normalizados respecto al control (0μM). * diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0.05$, ANOVA).

Efecto del tratamiento con MβCD sobre la infección y progenie viral en células Huh-7 infectadas con YFV 17D

Una vez determinado que la infección con el YFV requiere de colesterol, quisimos determinar que paso del ciclo replicativo requiere de colesterol. Con la idea de analizar la importancia de colesterol en la entrada de YFV 17D, las células Huh-7 fueron pre tratadas con un fármaco que permite el secuestro de colesterol presente en la membrana celular (Mahammad & Parmryd, 2015). Esto se realizó mediante el uso de concentraciones crecientes de MβCD hasta la CL máxima de 6.5mM y posteriormente fueron infectadas con YFV 17D a una MOI de 1. A las 24 hpi, la cantidad de células infectadas y la cantidad de progenie viral infectiva producida

fueron cuantificados por citometría de flujo y por ensayo de placa lítica, respectivamente. Como puede observarse, hubo una reducción significativa dependiente de la dosis del porcentaje de infección, logrando la reducción de más del 43% la infección (Figura 17).

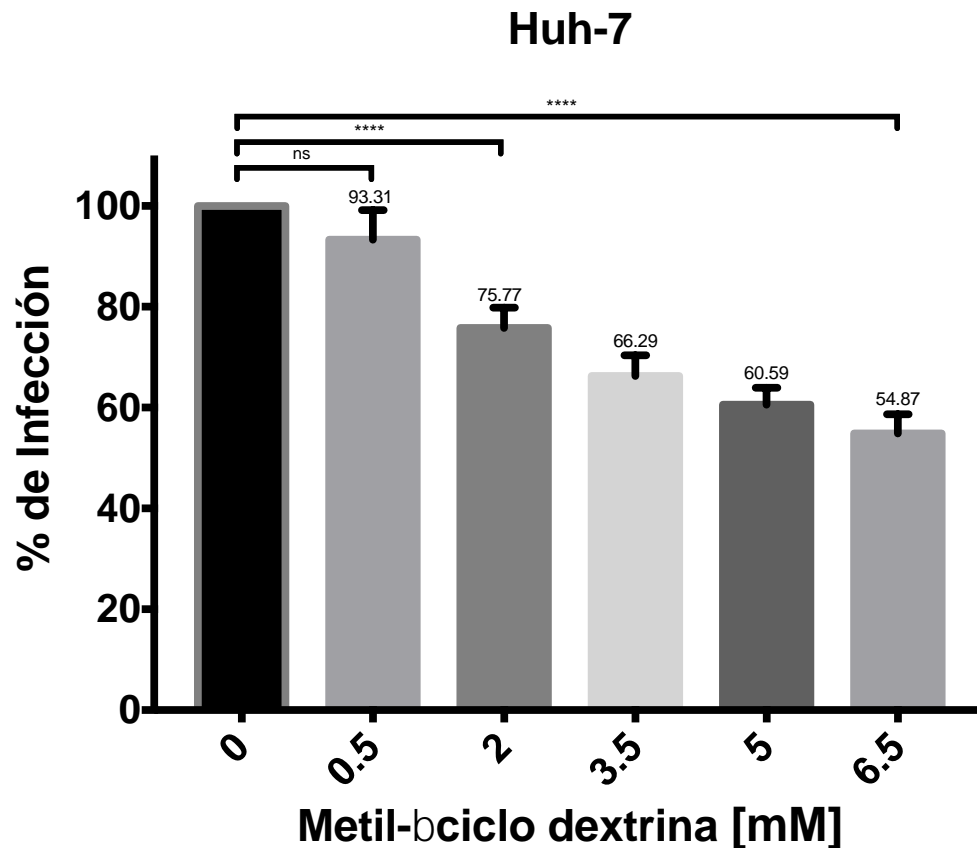


Figura 17 Inhibición de la infección de células Huh-7 por YFV 17D por el tratamiento con MBCD. Las células Huh-7 se infectaron con YFV a una MOI de 1. El pretratamiento se realizó antes de la absorción viral con cantidades crecientes de MBCD. La cantidad de células infectadas se analizó mediante citometría de flujo usando el anticuerpo anti-proteína E (4G2). Los resultados se expresaron como la media + error estándar del porcentaje de células infectadas de tres ensayos independientes por duplicado normalizados respecto al control (0mM). * diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0.05$, ANOVA).

Los resultados de ensayo de placa muestran el mismo patrón de disminución de manera dependiente de la dosis, logrando una reducción del título viral de 2.97×10^6 a 1.11×10^5 PFU/mL (1 logaritmo), en la dosis de 6.5mM de M β CD (Figura 18).

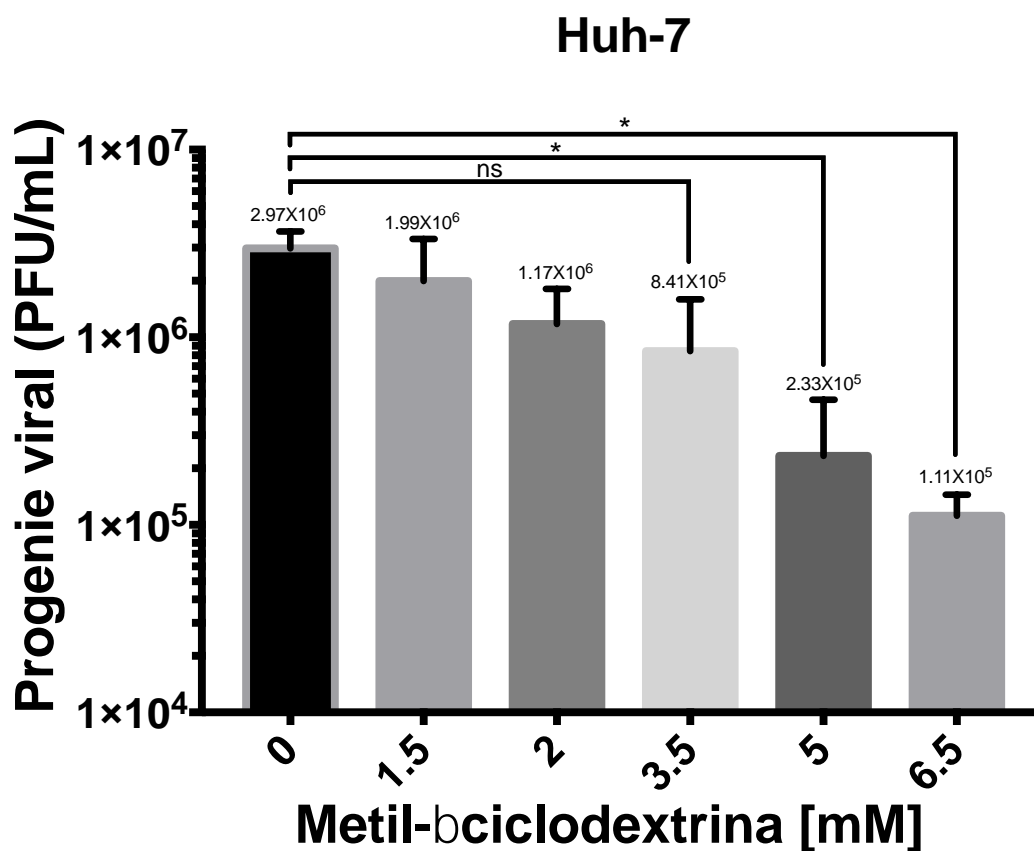


Figura 18 Inhibición de la progenie viral de YFV 17D en células Huh-7 mediante el tratamiento con MBCD. Pretratamiento con MBCD hasta 6.5mM redujo de manera dependiente a la dosis, el porcentaje de infección en células Huh-7. Los resultados muestran una reducción significativa a la CL máxima de 2.97×10^6 a 1.11×10^5 PFU/mL y se expresan como la media + error estándar del porcentaje de células infectadas de tres ensayos independientes por duplicado normalizados respecto al control (0μM). * diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0.05$, ANOVA).

Efecto del tratamiento con MET sobre los complejos de replicación viral en células Huh-7 infectadas con YFV 17D

Para determinar la importancia del colesterol en la replicación viral de YFV 17D en células Huh-7 se determinó el mecanismo de acción de la MET, fármaco con el que se obtuvo una mejor disminución del porcentaje de infección y una disminución más notoria de la progenie viral infectiva. La MET fue utilizada en tres concentraciones crecientes diferentes en un contexto de infección con YFV 17D. Se puede observar que las células infectadas con YFV 17D en ausencia del tratamiento con MET, presentan co-localización entre las proteínas virales E y NS4A; sin embargo, a medida que se incrementa la concentración del fármaco se observa una disminución de la presencia tanto de la proteína E como de la NS4A de manera dependiente de la dosis. Estos datos corroboran la importancia del colesterol en la formación de los CRs y de la replicación de YFV.

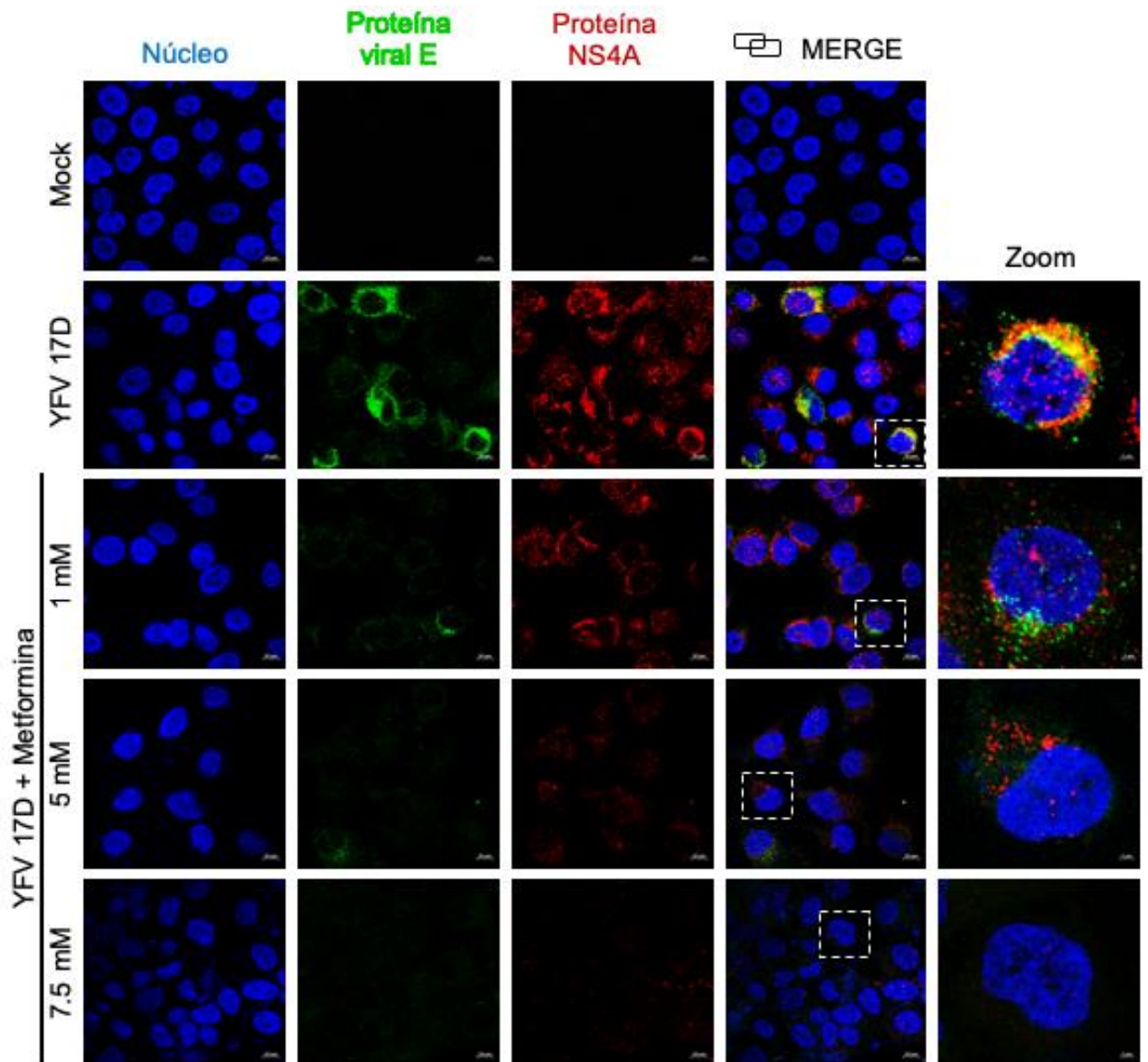


Figura 19 Disminución en los niveles de infección en células Huh-7 infectadas con YFV 17D tratadas con MET y analizado por inmunofluorescencia. Las células Huh-7 infectadas a una MOI de 1 con YFV 17D durante 24 hpi. Las distribuciones subcelulares de las proteínas virales E y NS4B de YFV 17D fueron examinadas por la inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos correspondientes. Los núcleos fueron teñidos por DAPI (azul). Se puede observar que en una infección en ausencia de tratamiento existe una colocalización entre la proteína viral E y la NS4B en lo que podrían ser los complejos de replicación y que a medida que se incrementa el tratamiento se observa una disminución de la presencia tanto de la proteína E como de la NS4A de manera dependiente a la dosis. Las imágenes provienen de 3 experimentos diferentes y se muestran las más representativas.

Estos datos nos permiten sugerir que a pesar de que la infección no induce el aumento de colesterol, el YFV 17D utiliza el colesterol durante diferentes etapas del ciclo replicativo, siendo importante para el proceso de entrada viral, y el proceso de formación de partículas virales infectivas.

Discusión

Entre los virus más relevantes dentro del sector de la salud humana se encuentran aquéllos pertenecientes a la familia *Flaviviridae*, de manera específica los virus del género *Hepacivirus* y *Flavivirus* (Neufeldt *et al.*, 2018), los cuales han ocasionado diversos brotes alrededor del mundo y que, debido a diversos factores como la globalización y el cambio climático, están resurgiendo en nuevas áreas geográficas convirtiéndose en factores de riesgo para la salud humana y animal.

Ha sido descrito, por varios autores, que uno de los virus prototipo de la familia *Flaviviridae* es el YFV, el que a pesar de haber sido descubierto hace más de 100 años (Monath, 2001) y ser el primer arbovirus identificado (Thomas *et al.*, 2014), los brotes de la enfermedad que causa aún constituyen una preocupación alrededor del mundo (WHO, s/f). Debido a que YFV es uno de los pocos flavivirus que cuenta con una vacuna eficiente desde 1937, el conocimiento sobre cuestiones biológicas básicas del virus fue omitido por mucho tiempo (Theiler & Smith, 1937; Norrby, 2007). Por ello, estudiar sobre la naturaleza y los mecanismos de patogenicidad de este virus ayudaría a completar información sobre la biología de los virus en general, y de los flavivirus en particular; sin mencionar el conocimiento generado mediante el uso de cepas virales atenuadas para el beneficio del ser humano (WHO, 2018) con la finalidad de encontrar medidas de control seguras y viables para combatir este y otros patógenos.

Infeción de líneas celulares con el YFV 17D

Para poder empezar el estudio de YFV se decidió montar un sistema de infección en diversas líneas celulares. Se sabe que el YFV tiene la capacidad de replicarse y propagarse en células de mamífero y de invertebrados (Guerrero & Bello, 2019); sin embargo, uno de los objetivos de este trabajo era poder determinar la capacidad infectiva de nuestra cepa viral, la cual fue otorgada de manera desinteresada por el Dr. Juan Salas Benito, de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional. De manera interesante cuando se realizaron infecciones virales en las líneas celulares de mamífero hepáticas (Huh-7), renales (VERO) y de macrófagos (DC-SIGN) (Figura 5) se observó que la eficiencia de infección fue mayor en células hepáticas, alcanzando niveles superiores al 90%, en relación con

las células renales, en donde lo máximo obtenido fue menor al 90%; y las de macrófagos, que no superaron el 20% de infección. Estos resultados se asemejan a los reportados por García et al. (2016) donde se determinó que la infección con YFV 17D, a una MOI mayor de 0.2, presenta niveles elevados de infección en células de hepatocarcinoma humano de más del 88% (HepG2) y 95% (Huh-7); mientras que Lefeuvre et al. (2006) determinaron que existe una diferencia en la capacidad de infección entre la cepa silvestre Asibi y YFV 17D, donde la cepa vacunal muestra niveles mayores de infección en todas las hpi analizadas en comparación con la cepa Asibi, alcanzando el porcentaje de infección del 80 al 100% a las 72 hpi en la línea celular HepG2. Con respecto a la infección en células renales, Palmer et al. (2007) muestran que existe replicación viral de YFV 17D a una MOI de 1 en células VERO a las 48 hpi. Por su parte, tanto Palmer et al. (2007) como García et al. (2016) analizan la capacidad de infección de YFV 17D en células de macrófago, siendo el último quien muestra un porcentaje de infección menor al 20%, corroborando una capacidad disminuida de la infección por parte de la cepa vacunal de YFV (YFV-VAX y YFV 17D, respectivamente) en células de macrófagos. Los datos anteriores confirmaron que nuestra cepa viral tiene la capacidad de infectar todas las líneas celulares utilizadas; sin embargo, las células hepáticas son las que presentan mayor índice de infección y se ha reportado que son la mejor opción, después de los hepatocitos primarios humanos, para investigar el metabolismo lipídico (Gunn et al., 2017) por lo que la línea celular Huh-7 fue utilizada para los siguientes experimentos.

La capacidad viral para multiplicarse en la célula hospedera depende de la presencia de ciertos receptores (Fedson et al., 2015; Taylor et al., 2015), vías de tráfico celular y factores celulares; y la capacidad de montar una respuesta inmune por parte de la célula huésped (McLinden et al., 2017). De manera específica, para el YFV solo se ha descrito un receptor asociado de tipo de heparán sulfato (Germi et al., 2002) y poco se ha descubierto sobre factores celulares específicos que estén involucrados en la infección por este virus (Douam & Ploss, 2018), por lo que siguen siendo objeto de estudio. Existe evidencia que muestra que las células Huh-7 tienen una capacidad deficiente para montar una respuesta inmune antiviral (Melén et al., 2000), lo que podría explicar la capacidad de YFV 17D de infectar eficientemente esta línea celular, a diferencia de la línea celular VERO y DC-SIGN.

Por otro lado, se determinó la capacidad de las tres líneas celulares de generar partículas virales mediante ensayos de placa lítica y se observó que las células Huh-7 generan un mayor número de partículas virales en comparación con las generadas en las líneas celulares VERO y DC-SIGN (datos no mostrados). Es importante mencionar que el ensayo de placa lítica ha sido reportado como la prueba “estándar de oro” para determinar la presencia de partículas virales infecciosas (Bae et al., 2003).

Cambios en el metabolismo del colesterol durante la infección por YFV 17D.

Continuando con la hipótesis de que el colesterol es un factor determinante en el establecimiento de la infección con YFV 17D, se sabe que el hígado uno de los órganos blanco para la infección de DENV, ZIKV y YFV (Douam & Ploss, 2018). Considerando estudios previos de nuestro grupo de trabajo que indican que las células Huh-7 infectadas con DENV y ZIKV muestran un incremento del colesterol en ciertos tiempos post-infección (Soto-Acosta et al., 2013; Farfan-Morales, 2018), nos enfocamos en determinar si YFV 17D podía incrementar los niveles de colesterol celular durante la infección en células hepáticas Huh-7. Como parte de la estrategia experimental se decidió trabajar con la filipina III, la cual es un agente fluorescente que tiene la capacidad de unirse al colesterol no esterificado, formando complejos estequiométricos muy específicos, permitiendo observar su distribución en membranas biológicas (Muller et al., 1983).

Los primeros resultados, mediante microscopía confocal, no mostraron cambios durante 1, 3, 6, 12, 24, 48 hpi (Figura 7). Dichos tiempos post-infección no mostraron cambios evidentes en los niveles de colesterol celular en ninguno de ellos, sugiriendo que la infección por YFV 17D no inducía cambios en los niveles de colesterol celular. Para confirmar este resultado, se realizó el análisis de la incorporación de filipina III medido citometría de flujo, lo que nos daba un valor más cuantitativo que la microscopía confocal y nuevamente no se detectó un incremento de colesterol celular en ninguno de los tiempos mencionados (Figura 8).

Debido a que la correlación del nivel de colesterol en las pruebas de intensidad por fluorescencia puede presentar errores sistemáticos debido a la presencia de otros

componentes lipídicos con afinidad a la filipina III, como las estructuras en anillo del colestanol, el latosterol y el desmosterol (Muller et al., 1983), esteroides presentes en membranas celulares, se decidió confirmar los resultados previamente obtenidos mediante el método fluorimétrico para la cuantificación del colesterol celular total (Figura 9). Este método tiene la capacidad de determinar el colesterol esterificado y no esterificado, y es un método más sensible (Mahammad & Parmryd, 2015). Sin embargo, los resultados obtenidos mediante el método fluorimétrico tampoco mostraron cambios en los niveles de colesterol posterior a la infección con YFV, confirmando que la infección por este virus no modifica los niveles de colesterol celular.

Se sabe que en las células infectadas con DENV existe una inducción de reordenamientos en el RE atribuidos principalmente a la síntesis *de novo* de proteínas virales (Perera et al., 2012) lo cual coincide con el aumento de colesterol reportado en nuestro laboratorio en etapas tempranas de la replicación de DENV. De acuerdo con esta hipótesis, estudios con otros flavivirus sugieren que las proteínas estructurales son suficientes para realizar el reclutamiento de lípidos específicos para la envoltura viral donde la morfología y la composición lipídica está determinada principalmente por el andamiaje icosaédrico de las proteínas E y M (Zhang et al., 2013). Por lo tanto, es muy probable que el inicio de la síntesis de las proteínas virales promueva el incremento de colesterol en etapas tempranas de la infección.

Nuestros datos nos indican que, a diferencia de otros flavivirus, como DENV y ZIKV (Farfan 2018; Soto et al., 2013), YFV 17D no induce un incremento en los niveles de colesterol en células Huh-7 y esto puede ser debido a que la multiplicación viral es menos eficiente y por tanto no requiere de mucho colesterol o bien que el colesterol celular ya presente en la célula es suficiente para cubrir los requerimientos de formación de CRs y de nuevas partículas virales. En este sentido, tal vez sería interesante analizar si en las células infectadas con YFV existe una relocalización del colesterol hacia los CR posterior a la entrada viral. Otra posibilidad es que YFV 17D es una cepa vacunal y presenta más de 67 mutaciones a lo largo de su genoma en comparación con la cepa Asibi (Douam & Ploss, 2018), siendo la proteína E de

YFV 17D, la proteína viral que cuenta con mayor número de mutaciones, con un total de 17 mutaciones (Beck et al 2013). Este hecho podría sugerir que la cepa 17D pudiera replicarse con menor intensidad, aunque el título viral obtenido no refleja esta posibilidad.

Durante el proceso, de replicación de los flavivirus, el RE se expande masivamente generándose nuevas membranas (Welsch et al., 2009; Reid et al., 2015), además de la alteración de sus composiciones lipídicas, incluido el colesterol (Mackenzie et al., 2007; Soto et al., 2013). Uno de los posibles factores de la ausencia de alteraciones en los niveles de colesterol en la infección por YFV 17D también puede deberse a las mutaciones presentes en proteínas virales como la NS3 o NS4B (5 mutaciones en cada gen que codifica para dichas proteínas) (Douam & Ploss, 2018). Estas proteínas, involucradas en el proceso de replicación viral presentan funciones primordiales ya que la primera es una serina proteasa viral y la segunda puede funcionar como cofactor para la activación de la primera (Wu et al., 2017). Por otro lado, se sabe que la NS3 recluta en los CRs a la sintetasa de ácidos grasos, permitiendo la incorporación de los ácidos grasos en los CRs aumentando la infección viral (Heaton et al., 2010). Por su parte, la proteína NS4B tiene la capacidad de incorporar lípidos que inducen la curvatura de las membranas en los CRs (Heaton et al., 2010). Las mutaciones en ambas proteínas podrían hacernos pensar que esta capacidad de modular lípidos o colesterol pudiera verse modificada. Estudios futuros nos permitirán conocer las causas de porque YFV 17D no induce aumento en los niveles de colesterol celular.

Otro elemento que aportaría información relevante sobre las diferencias en la acumulación de colesterol y el efecto en la formación de los CRs es la microscopía electrónica de transmisión. Es posible que los CRs formados en respuesta a la infección con YFV 17D podrían ser más discretos en comparación con los generados con DENV y ZIKV, en donde al menos el 85% de los lípidos detectados en fracciones de membrana asociadas a los CR generados por DENV son significativamente diferentes en comparación con fracciones similares de células no infectadas (Perera et al., 2012). De ser así, nos permitiría suponer que no todos los flavivirus tienen que hacer cambios muy drásticos en los niveles de colesterol celular para la biogénesis viral.

Los mecanismos mediante los cuales los virus pueden manipular la maquinaria celular siguen siendo estudiados, pero existe evidencia de que el incremento en los niveles de colesterol provocado por DENV se correlaciona con un incremento en la captación de esta biomolécula mediante el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLr) (Soto et al., 2013). Por si fuera poco, la infección con DENV provoca la relocalización de enzimas como la HMGCoA reductasa a los CR (Soto et al., 2017), enzima limitante del metabolismo lipídico celular, induciendo una modulación positiva mediante la inhibición de una cinasa dependiente del regulador global del metabolismo celular: adenosina monofosfato (AMP). Esta cinasa se ha denominado proteína adenosina monofostato cinasa activa (AMPK) (Burg & Espenshade, 2011).

La AMPK es una proteína cuya modulación depende de los niveles energéticos celulares. Su actividad está influenciada por la relación que existe entre AMP y adenosina trifosfato (ATP) en el citoplasma. Al incrementar los niveles de AMP, la proteína activa promueve los procesos catabólicos inhibiendo los procesos anabólicos para la síntesis de colesterol. (Raman et al., 2007). Se desconoce como DENV puede inhibir la actividad de la AMPK pero es muy probable que se deba, de manera indirecta, a las vías de señalización que se modulan en la infección causada por el virus ya que se ha visto que las vías catabólicas reguladas positivamente en células infectadas por flavivirus es la autofagia mediante la cual se reciclan proteínas, orgánulos y lípidos (Blázquez et al., 2014). DENV, mediante la regulación positiva de la autofagia, puede aumentar la degradación de las gotas de lípidos celulares y de los triglicéridos para liberar ácidos grasos libres, dando como resultado un aumento en la β -oxidación celular, y por consiguiente la generación de ATP. Estos procesos son necesarios para una replicación eficiente de DENV (Heaton & Randall, 2010). De tal forma que, a través de los procesos catabólicos, los virus no sólo obtienen lípidos, sino que también energía en forma de ATP, lo que se podría correlacionar con la modulación positiva de la HMGCoA mediante un efecto inhibitorio sobre la AMPK, con un aumento en los niveles de colesterol disponibles para los CR y demás procesos en el ciclo replicativo. Sin embargo, se desconoce si estos eventos estén relacionados o su aparición es independiente durante la infección viral.

En conclusión, nuestros resultados muestran que el virus YFV 17D no modifica el metabolismo del colesterol.

Es importante destacar que el efecto de la infección por YFV 17D deberá ser evaluada en otras líneas celulares para confirmar lo observado en células Huh-7.

Importancia del colesterol durante el proceso de entrada del YFV 17D

El siguiente objetivo del estudio fue confirmar la importancia del colesterol durante la entrada y el ciclo replicativo de YFV 17D, mediante la utilización de fármacos que pudieran modificar los niveles de colesterol, de manera directa o indirecta.

El agotamiento del colesterol celular puede lograrse de varias maneras, ya sea mediante el tratamiento con inhibidores metabólicos, crecimiento de células en un medio deficiente en lipoproteínas o mediante el uso de productos químicos para inmovilizar o extraer el colesterol (Zidovetzki & Levitan, 2007). Ejemplos de estos métodos son la inhibición de la biosíntesis del colesterol por las estatinas (Parihar et al., 2019), el cultivo de células en ausencia de colesterol exógeno (Gunn et al., 2017) y el uso de agentes aglutinantes del colesterol como la filipina y la saponina (Muller et al., 1984). Dentro de los métodos más utilizados para lograr la disminución de colesterol celular es el uso de la M β CD debido a que no se degrada fácilmente y puede ser utilizado en células vivas, en comparación a los otros métodos mencionados. Su ventaja principal es que sólo actúa sobre la membrana celular; sin embargo, no presenta afinidad específica por el colesterol (Leventis & Silvius, 2001). Se ha reportado que las balsas lipídicas desempeñan un papel importante en las etapas de entrada de DENV (Carro & Damonte, 2013), WNV (Medigeshi et al., 2008) y JEV (Lee et al., 2008) al proporcionar un entorno adecuado para concentrar los receptores virales en la membrana de la célula huésped, permitiendo la creación de una plataforma de transducción de señales celulares, donde se lleva a cabo la interacción y señalización célula-virus en procesos que finalizan en la internalización de la partícula viral a la célula huésped (Leier et al., 2018). Debido a la alta concentración de colesterol, las balsas lipídicas pueden disgregarse mediante fármacos que secuestren el colesterol de la membrana como la M β CD, un fármaco

experimental que tiene la capacidad de retirar el colesterol de las membranas celulares (Mahammad & Parmryd, 2015).

Los ensayos de viabilidad mostraron que las células Huh-7 no presentan afectación en todas las concentraciones utilizadas de M β CD (Figura 11); sin embargo, se decidió trabajar hasta la CL de 6.5mM. El pretratamiento con M β CD generó una reducción en el porcentaje de infección de manera dependiente de la dosis en el que se observa una reducción significativa de hasta el 48% de infección en la CL máxima de 6.5mM en comparación con las células no tratadas (Figura 17) y una reducción significativa en la producción de progenie viral la cual disminuyó más del 96% con la CL máxima. Estos datos sugieren que al igual que con DENV (Carro & Damonte, 2013), WNV (Medigeshi et al., 2008), JEV (Lee et al., 2008) y ZIKV (Farfan-Morales, 2018), la alteración de las balsas lipídicas celulares tiene un efecto antiviral en YFV 17D.

Importancia del colesterol en el ciclo replicativo de YFV 17D

Para evaluar el papel del colesterol durante el ciclo replicativo de YFV 17D, se utilizaron fármacos capaces de reducir la síntesis *de novo* del colesterol, de manera directa o indirecta.

La MET, fármaco aprobado por la administración de alimentos y medicamentos (FDA), es uno de los medicamentos de primera línea para el tratamiento de la diabetes tipo 2, recomendado debido a la ausencia de aumento de peso, bajo riesgo de hipoglucemia y su modo de acción para contrarrestar la resistencia a la insulina con efectos anti-ateroescleróticos y cardioprotectores confirmados (Scarpello & Howlett, 2008). Como se mencionó anteriormente, este fármaco además de disminuir los niveles de glucosa en sangre al inducir la glucólisis, tiene la capacidad de reducir la síntesis del colesterol celular a través de la activación de la proteína AMPK, la cual en su forma activa puede reducir la actividad de la enzima HMGCoA reductasa. Por lo anterior, este fármaco ha mostrado ser capaz de reducir la infección *in vitro* de DENV en células Huh-7 (Soto et al., 2017) y ayudar, posiblemente, atenuando la gravedad de la enfermedad en individuos con diabetes mellitus infectados con DENV (Htun et al., 2018).

Los resultados de viabilidad mostraron que las células Huh-7 pueden tolerar la CL máxima de 15mM, mostrando niveles de más del 80% de sobrevivencia (Figura 11). El tratamiento con MET mostró una reducción en el porcentaje de infección de manera dependiente a la dosis, en el que se observa una reducción significativa de más del 70% de infección en la CL máxima de 15mM en comparación con las células no tratadas (Figura 13) y una reducción significativa en la producción de progenie viral la cual disminuye de 4.08×10^7 a 2.00×10^5 (2 logaritmos) con la CL máxima (Figura 14).

Para corroborar nuestros resultados se utilizó un tercer fármaco el cual ha mostrado la capacidad de interferir en el sitio catalítico de la HMGC_oA reductasa. La LOV, y en general las estatinas, tienen la capacidad de reducir la infección de diferentes agentes como las bacterias, hongos y parásitos, en específico los virus (Parihar et al., 2019). En cuanto a los flavivirus, el uso de estatinas inhibe la infección con DENV (Marrugo et al., 2016; Soto et al., 2017), Hepatitis C (Lyn et al., 2009) y ZIKV (Farfan-Morales, 2018).

Los resultados de viabilidad, utilizando la LOV, mostraron que las células Huh-7 pueden tolerar la CL máxima de 100 μ M, mostrando niveles de más del 95% de sobrevivencia (Figura 11); sin embargo, para los tratamientos se utilizó hasta la concentración de 50 μ M. El tratamiento con LOV mostró una disminución en el porcentaje de infección de manera dependiente de la dosis en el que se observa una reducción significativa de más del 37% de infección en la CL máxima de 50 μ M en comparación con las células no tratadas (Figura 15) y una reducción significativa en la producción de progenie viral la cual disminuyó de 2.08×10^7 a 1.25×10^5 (2 logaritmos) con la CL máxima (Figura 16). Estas concentraciones inducen un efecto antiviral en YFV 17D.

En general ambos tratamientos redujeron la infección por YFV 17D. Se ha descrito que, tanto la MET como la LOV, pueden interrumpir la formación de los CRs en DENV, por lo que disminuyen la producción viral al disminuir el ensamblaje de los viriones (Villareal et al., 2015) pero mantienen la presencia de material genético viral de tipo RNA y proteínas virales en cantidades reducidas (Gutierrez et al., 2011).

Además de reducir la producción de partículas virales, también existe una disminución en la capacidad de infectar debido a que se sabe que DENV contiene ~ 8000 moléculas de lípidos, siendo el componente más abundante de la partícula viral. Por lo tanto, la composición lipídica de la envoltura es importante para las propiedades físicas de los viriones. Considerando que la envoltura del virus proviene principalmente de membranas modificadas derivadas del RE enriquecidas en colesterol, al reducir esta molécula es muy probable que cambien las propiedades de las membranas virales (Villareal et al., 2015) ya que se ha demostrado que el grosor de la misma es conferido principalmente por lípidos y no por proteínas por lo que esta robustez biofísica de la envoltura puede conferir resiliencia a las perturbaciones ambientales.

Otro mecanismo que podría contribuir al efecto antiviral de estos fármacos es la reducción de las gotas de lípidos, los cuales son orgánulos celulares ricos en lípidos relacionados con el RE que regulan el almacenamiento y la hidrólisis de lípidos neutros, además de funcionar como reservorio de colesterol para la formación y el mantenimiento de la membrana. Estudios realizados con DENV han descrito que estos organelos son importantes en la morfogénesis viral, al proporcionar un andamio para la encapsidación del genoma (Reddy & Sansom, 2016). También se ha descrito que la disociación de la proteína C de las gotas de lípidos inhibe la producción de virus infecciosos (Martínez-Gutierrez et al., 2011), lo que respalda el papel de estas estructuras en la morfogénesis de DENV.

Por último, se ha reportado que la disminución en el metabolismo de colesterol, induce de manera específica una respuesta inmune mediada por interferón (INF) en ciertas líneas celulares (O'Neill, 2015). Esto es interesante porque el efecto antiviral que presentan dichos fármacos no sólo se basa en el hecho de disminuir la capacidad del virus de replicarse sino también de activar la respuesta inmune antiviral. Ambos elementos pueden generar una respuesta antiviral efectiva.

Reprimir la vía biosintética del colesterol a través de inhibidores de la HMGCoA reductasa es un tratamiento común para las enfermedades cardiovasculares, cuyo éxito clínico para los trastornos humanos proporciona un fuerte apoyo para que la selección del metabolismo de los lípidos pueda ser efectiva para la terapia humana. Aclarar las alteraciones específicas que se producen en las infecciones víricas

permitiría que surgieran nuevos enfoques terapéuticos a través de la inhibición selectiva de dichas vías metabólicas (Pombo & Sanyal, 2018).

De manera específica, poco se ha investigado sobre fármacos que presenten un papel inhibitorio en las infecciones con YFV. En la revisión realizada por Julander (2013), se discute la diferencia entre el descubrimiento de fármacos tanto *in vivo* como *in vitro*, además de los avances en la identificación de posibles drogas dirigidas principalmente contra las proteínas E (dominio III), NS3 y NS5; sin embargo, falta realizar estudios que permitan evaluar su relevancia en el tratamiento de la infección en humanos.

Entre los fármacos ya utilizados para inhibir la infección por flavivirus esta la ivermectina, fármaco antihelmíntico ampliamente utilizado, que inhibe de manera específica a YFV en comparación con DENV, y JEV. Esto lo realiza mediante la inhibición de la proteína NS3 (Mastrangelo et al., 2012) y se observa una disminución del porcentaje de infección de manera dependiente de la dosis, la cual aumenta con el tiempo. Recientemente, de Freitas et al. (2019) demostraron que el sofosbuvir, un fármaco aprobado por la FDA, reduce de manera dependiente a la dosis, la producción de partículas virales infectivas en células Huh-7 infectadas con YFV 17D. Por su parte, mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal se pudo comprobar una inhibición en la síntesis del genoma viral. Además, en ratones neonatos Swiss, se incrementó la supervivencia y se disminuyen los daños ocasionados por la infección en un sistema de pretratamiento. Estos resultados resultan muy prometedores para realizar estudios preclínicos en humanos.

Conclusiones

A pesar de que los flavivirus son patógenos bien conocidos desde hace mucho tiempo, el escenario eco-epidemiológico actual pone de relieve la necesidad de medidas de control seguras y viables para combatir estos patógenos, que deberían considerar tanto el control de los vectores como el desarrollo de vacunas y medicamentos antivirales específicos.

En conjunto nuestros resultados muestran que YFV 17D no necesita modificar los niveles de colesterol celular para obtener niveles de infección aceptables; sin embargo, este lípido es necesario debido a que su disminución en la membrana celular y la reducción de la síntesis de *novo* afecta la entrada, la replicación y muy probablemente la morfogénesis viral de YFV 17D. Los principales mecanismos que podrían estar involucrados para la inhibición de la entrada viral son la reducción del número de balsas lipídicas y la fusión deficiente de membranas para la liberación de la nucleocápside, mientras que el ciclo viral podría verse afectado en el proceso de replicación y morfogénesis debido a el agotamiento de colesterol en el RE y por la reducción de las gotas lipídicas.

Los resultados de los tratamientos anti-colesterol en células Huh-7 infectadas con YFV 17D mostraron una reducción significativa sobre el porcentaje de infección y la progenie viral de una manera dependiente de la dosis, tal como se reportó para DENV (Soto et al., 2013), ZIKV (Farfan-Morales, 2018), JEV (Lee et al., 2008), WNV (Medigeshi et al., 2008), corroborando que el metabolismo del colesterol es importante para el ciclo de replicación de los flavivirus.

Para controlar los virus emergentes en general, y los virus transmitidos por artrópodos en particular, es necesario ampliar la investigación básica y aplicada que ayudará a formular estrategias coordinadas para anticipar, detectar, controlar y prevenir la aparición o resurgimiento de enfermedades virales; y la investigación básica y aplicada sobre el virus, el proceso infeccioso y la respuesta del huésped a la infección, que será útil para el desarrollo de vacunas y medicamentos antivirales.

Hasta la fecha, no se ha identificado ningún tratamiento antiviral efectivo específico para la YFV. La complejidad y la falta de comprensión de muchas áreas de la tanto del ciclo replicativo como de la respuesta inmune a la infección, causada por el YFV 17D, hacen que esta sea una perspectiva atractiva. Por lo tanto, existe una clara necesidad de medicamentos seguros y eficaces para tratar a los pacientes en cada paso de la progresión de la enfermedad causada por flavivirus.

Perspectivas

1. Identificar el papel de las proteínas virales, de YFV 17D o de diferentes flavivirus en las vías de síntesis, modulación y transporte de biomoléculas lipídicas en células de mamífero.
2. Realizar reversiones de mutaciones en las proteínas YFV 17D para determinar aminoácidos o dominios específicos involucrados en la modificación de los niveles de colesterol.
3. Realizar ensayos de microscopía electrónica de transmisión, tanto *in vitro* como *in vivo*, para determinar la morfología de los complejos de replicación generados durante la infección con YFV 17D.
4. Determinar la actividad de las proteínas HMGCoA reductasa y de las proteínas involucradas en las vías metabólicas y de transporte de colesterol celular durante la infección con YFV 17D.
5. Analizar la importancia de diferentes biomoléculas, principalmente lípidos, en el ciclo replicativo de YFV 17D.
6. Analizar el efecto de MET y LOV en el modelo *in vivo* de ratón infectado con YFV 17D.

Bibliografía

1. Bae, H.-G., Nitsche, A., Teichmann, A., Biel, S. S., & Niedrig, M. (2003). Detection of yellow fever virus: A comparison of quantitative real-time PCR and plaque assay. *Journal of Virological Methods*, *110*(2), 185–191. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(03\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(03)00129-0)
2. Barrett, A. D. T. (2017). Yellow fever live attenuated vaccine: A very successful live attenuated vaccine but still we have problems controlling the disease. *Vaccine*, *35*(44), 5951–5955. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.03.032>
3. Beck, A., Tesh, R. B., Wood, T. G., Widen, S. G., Ryman, K. D., & Barrett, A. D. (2013). Comparison of the live attenuated yellow fever vaccine 17D-204 strain to its virulent parental strain Asibi by deep sequencing. *The Journal of infectious diseases*, *209*(3), 334–344.
4. Blázquez, A.-B., Escribano-Romero, E., Merino-Ramos, T., Saiz, J.-C., & Martín-Acebes, M. A. (2014). Stress responses in flavivirus-infected cells: Activation of unfolded protein response and autophagy. *Frontiers in Microbiology*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00266>
5. Bryan-Marrugo, O. L., Arellanos-Soto, D., Rojas-Martinez, A., Barrera-Saldaña, H., Ramos-Jimenez, J., Vidaltamayo, R., & Rivas-Estilla, A. M. (2016). The anti-dengue virus properties of statins may be associated with alterations in the cellular antiviral profile expression. *Molecular Medicine Reports*, *14*(3), 2155–2163. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5519>
6. Burg, J. S., & Espenshade, P. J. (2011). Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. *Progress in Lipid Research*, *50*(4), 403–410. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.07.002>

7. Carro, A. C., & Damonte, E. B. (2013). Requirement of cholesterol in the viral envelope for dengue virus infection. *Virus Research*, 174(1–2), 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.03.005>
8. Cortes, V. (2014). Physiological and pathological implications of cholesterol. *Frontiers in Bioscience*, 19(3), 416. <https://doi.org/10.2741/4216>
9. de Freitas, C. S., Higa, L. M., Sacramento, C. Q., Ferreira, A. C., Reis, P. A., Delvecchio, R., ... Souza, T. M. L. (2019). Yellow fever virus is susceptible to sofosbuvir both in vitro and in vivo. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007072>
10. de Menezes Martins, R., da Luz Fernandes Leal, M., & Homma, A. (2015). Serious adverse events associated with yellow fever vaccine. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 11(9), 2183–2187. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1022700>
11. de Meyer, F., & Smit, B. (2009). Effect of cholesterol on the structure of a phospholipid bilayer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(10), 3654–3658. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809959106>
12. Direct imaging of the disruption of hepatitis C virus replication complexes by inhibitors of lipid metabolism. (2009). *Virology*, 394(1), 130–142. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.08.022>
13. Douam, F., Hrebikova, G., Albrecht, Y. E. S., Sellau, J., Sharon, Y., Ding, Q., & Ploss, A. (2017). Single-cell tracking of flavivirus RNA uncovers species-specific interactions with the immune system dictating disease outcome. *Nature Communications*, 8, 14781. <https://doi.org/10.1038/ncomms14781>

14. Douam, F., & Ploss, A. (2018). Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe. *Trends in Microbiology*.
15. Farfan-Morales, C. N. (2018). *Papel del colesterol en la infección por el virus ZIKA en células de linaje hepático, neural y placentario* (Virología). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional.
16. Fedson, D. S., Jacobson, J. R., Rordam, O. M., & Opal, S. M. (2015). Treating the Host Response to Ebola Virus Disease with Generic Statins and Angiotensin Receptor Blockers. *MBio*, 6(3), e00716-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.00716-15>
17. Fernandez-Garcia, M. D., Meertens, L., Chazal, M., Hafirassou, M. L., Dejarnac, O., Zamborlini, A., ... Amara, A. (2016). Vaccine and Wild-Type Strains of Yellow Fever Virus Engage Distinct Entry Mechanisms and Differentially Stimulate Antiviral Immune Responses. *MBio*, 7(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.01956-15>
18. Fernandez-Garcia, M.-D., Mazzon, M., Jacobs, M., & Amara, A. (2009). Pathogenesis of flavivirus infections: Using and abusing the host cell. *Cell host & microbe*, 5(4), 318–328.
19. Germe, R., Crance, J.-M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R. W. H., ... Drouet, E. (2002). Heparan Sulfate-Mediated Binding of Infectious Dengue Virus Type 2 and Yellow Fever Virus. *Virology*, 292(1), 162–168. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1232>
20. Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 343(6257), 425–430. <https://doi.org/10.1038/343425a0>

21. Goldstein, Joseph L., DeBose-Boyd, R. A., & Brown, M. S. (2006). Protein Sensors for Membrane Sterols. *Cell*, 124(1), 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.022>
22. Guerrero, N. A. S., & Bello, F. J. (2019). Comparative assessment of the replication efficiency of dengue, yellow fever, and chikungunya arboviruses in some insect and mammalian cell lines. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 52(0). <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0511-2018>
23. Gunn, P. J., Green, C. J., Pramfalk, C., & Hodson, L. (2017). In vitro cellular models of human hepatic fatty acid metabolism: Differences between Huh7 and HepG2 cell lines in human and fetal bovine culturing serum. *Physiological Reports*, 5(24). <https://doi.org/10.14814/phy2.13532>
24. Heaton, N. S., Perera, R., Berger, K. L., Khadka, S., LaCount, D. J., Kuhn, R. J., & Randall, G. (2010). Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(40), 17345–17350. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010811107>
25. Heaton, N. S., & Randall, G. (2010). Dengue virus induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell host & microbe*, 8(5), 422–432. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.10.006>
26. Heinz, F. X., & Stiasny, K. (2012). Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine*, 30(29), 4301–4306. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.114>
27. Htun, H. L., Yeo, T. W., Tam, C. C., Pang, J., Leo, Y. S., & Lye, D. C. (2018). Metformin Use and Severe Dengue in Diabetic Adults. *Scientific Reports*, 8(1), 3344. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21612-6>

28. Ikonen, E. (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), 125–138. <https://doi.org/10.1038/nrm2336>
29. Ishikawa, T., Yamanaka, A., & Konishi, E. (2014). A review of successful flavivirus vaccines and the problems with those flaviviruses for which vaccines are not yet available. *Vaccine*, 32(12), 1326–1337. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.01.040>
30. Istvan, E. S. (2001). Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. *Science*, 292(5519), 1160–1164. <https://doi.org/10.1126/science.1059344>
31. Julander, J. G. (2013). Experimental therapies for yellow fever. *Antiviral research*, 97(2), 169–179. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.12.002>
32. Kaufmann, B., & Rossmann, M. G. (2011). Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.09.005>
33. Kok, W. M. (2016). New developments in flavivirus drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 11(5), 433–445. <https://doi.org/10.1517/17460441.2016.1160887>
34. 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.
35. Lee, E., & Lobigs, M. (2008). E Protein Domain III Determinants of Yellow Fever Virus 17D Vaccine Strain Enhance Binding to Glycosaminoglycans, Impede Virus Spread, and Attenuate Virulence. *Journal of Virology*, 82(12), 6024–6033. <https://doi.org/10.1128/JVI.02509-07>

36. Lefevre, A., Contamin, H., Decelle, T., Fournier, C., Lang, J., Deubel, V., & Marianneau, P. (2006). Host-cell interaction of attenuated and wild-type strains of yellow fever virus can be differentiated at early stages of hepatocyte infection. *Microbes and Infection*, 8(6), 1530–1538. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.01.013>
37. Leier, H. C., Messer, W. B., & Tafesse, F. G. (2018). Lipids and pathogenic flaviviruses: An intimate union. *PLoS Pathogens*, 14(5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006952>
38. Leventis, R., & Silvius, J. R. (2001). Use of cyclodextrins to monitor transbilayer movement and differential lipid affinities of cholesterol. *Biophysical Journal*, 81(4), 2257–2267.
39. Mackenzie, J. M., Khromykh, A. A., & Parton, R. G. (2007). Cholesterol Manipulation by West Nile Virus Perturbs the Cellular Immune Response. *Cell Host & Microbe*, 2(4), 229–239. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.09.003>
40. Mahammad, S., & Parmryd, I. (2015). Cholesterol Depletion Using Methyl- β -cyclodextrin. En D. M. Owen (Ed.), *Methods in Membrane Lipids* (pp. 91–102). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1752-5_8
41. Martínez-Gutierrez, M., Castellanos, J. E., & Gallego-Gómez, J. C. (2011). Statins Reduce Dengue Virus Production via Decreased Virion Assembly. *Intervirology*, 54(4), 202–216. <https://doi.org/10.1159/000321892>
42. Mastrangelo, E., Pezzullo, M., De Burghgraeve, T., Kaptein, S., Pastorino, B., Dallmeier, K., ... Milani, M. (2012). Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: New prospects for an

old drug. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(8), 1884–1894.
<https://doi.org/10.1093/jac/dks147>

43. McLinden, J. H., Bhattarai, N., Stapleton, J. T., Chang, Q., Kaufman, T. M., Cassel, S. L., ... Xiang, J. (2017). Yellow Fever Virus, but Not Zika Virus or Dengue Virus, Inhibits T-Cell Receptor–Mediated T-Cell Function by an RNA-Based Mechanism. *The Journal of Infectious Diseases*, 216(9), 1164–1175.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jix462>
44. Medigeschi, G. R., Hirsch, A. J., Streblow, D. N., Nikolich-Zugich, J., & Nelson, J. A. (2008). West Nile Virus Entry Requires Cholesterol-Rich Membrane Microdomains and Is Independent of $\alpha\beta 3$ Integrin. *Journal of Virology*, 82(11), 5212–5219. <https://doi.org/10.1128/JVI.00008-08>
45. Melén, K., Keskinen, P., Lehtonen, A., & Julkunen, I. (2000). Interferon-induced gene expression and signaling in human hepatoma cell lines. *Journal of Hepatology*, 33(5), 764–772. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(00\)80308-6](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(00)80308-6)
46. Monath, T. P. (2001). Yellow fever: An update. *Infectious Diseases*, Vol 1(August). Recuperado de [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(01\)00016-0/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(01)00016-0/fulltext)
47. Monath, T. P., & Barrett, A. D. T. (2003). Pathogenesis and Pathophysiology of Yellow Fever | Request PDF. *ADVANCES IN VIRUS RESEARCH*, VOL 60. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/8946680_Pathogenesis_and_Pathophysiology_of_Yellow_Fever

48. Morens, D. M., Halstead, S. B., Repik, P. M., Putvatana, R., & Raybourne, N. (1985). Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: Comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(2), 250–254.
49. Mulatu, E., & Feyisa, A. F. (2018). *Review: Yellow Fever*.
50. Muller, C. P., Stephany, D. A., Winkler, D. F., Hoeg, J. M., Demosky, S. J., & Wunderlich, J. R. (1984). Filipin as a flow microfluorometry probe for cellular cholesterol. *Cytometry*, 5(1), 42–54. <https://doi.org/10.1002/cyto.990050108>
51. Neufeldt, C. J., Cortese, M., Acosta, E. G., & Bartenschlager, R. (2018). Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nature Reviews Microbiology*, 16(3), 125.
52. Norrby, E. (2007). Yellow fever and Max Theiler: The only Nobel Prize for a virus vaccine. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(12), 2779–2784. <https://doi.org/10.1084/jem.20072290>
53. O'Neill, L. A. J. (2015). How Low Cholesterol Is Good for Anti-viral Immunity. *Cell*, 163(7), 1572–1574. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.004>
54. Osuna-Ramos, J. F., Reyes-Ruiz, J. M., Bautista-Carbajal, P., Farfan-Morales, N., Cervantes-Salazar, M., & del Angel, R. M. (2018). *Ezetimibe inhibits Dengue virus infection in Huh 7 cells by blocking the cholesterol transporter Niemann–Pick C1–like 1 receptor*. <https://doi.org/10.1101/382747>
55. Palmer, D. R., Fernandez, S., Bisbing, J., Peachman, K. K., Rao, M., Barvir, D., ... Sun, W. (2007). Restricted replication and lysosomal trafficking of yellow

- fever 17D vaccine virus in human dendritic cells. *Journal of General Virology*, 88(1), 148–156. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82272-0>
56. Parihar, S. P., Guler, R., & Brombacher, F. (2019). Statins: A viable candidate for host-directed therapy against infectious diseases. *Nature Reviews Immunology*, 19(2), 104–117. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0094-3>
57. Perera, R., Riley, C., Isaac, G., Hopf-Jannasch, A. S., Moore, R. J., Weitz, K. W., ... Kuhn, R. J. (2012). Dengue Virus Infection Perturbs Lipid Homeostasis in Infected Mosquito Cells. *PLoS Pathogens*, 8(3), e1002584. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002584>
58. Pombo, J. P., & Sanyal, S. (2018). Perturbation of Intracellular Cholesterol and Fatty Acid Homeostasis During Flavivirus Infections. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01276>
59. Porudominsky, R., & Gotuzzo, E. H. (2018). Yellow fever vaccine and risk of developing serious adverse events: A systematic review. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 42. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2018.75>
60. Puerta-Guardo, H., Mosso, C., Medina, F., Liprandi, F., Ludert, J. E., & del Angel, R. M. (2010). Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in U937 cells requires cholesterol-rich membrane microdomains. *Journal of General Virology*, 91(2), 394–403. <https://doi.org/10.1099/vir.0.015420-0>
61. Raman, M., Chen, W., & Cobb, M. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, 26(22), 3100.

62. Reddy, T., & Sansom, M. S. P. (2016). The Role of the Membrane in the Structure and Biophysical Robustness of the Dengue Virion Envelope. *Structure*, 24(3), 375–382. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.12.011>
63. Reed, W., Carroll, J., Agramonte, A., & Lazear, J. W. (1900). The Etiology of Yellow Fever—A Preliminary Note. *Public Health Papers and Reports*, 26, 37–53.
64. Reid, C. R., Airo, A. M., & Hobman, T. C. (2015). The Virus-Host Interplay: Biogenesis of +RNA Replication Complexes. *Viruses*, 7(8), 4385–4413. <https://doi.org/10.3390/v7082825>
65. Scarpello, J. H., & Howlett, H. C. (2008). Terapia con metformina y usos clínicos. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 5(3), 157–167. <https://doi.org/10.3132/dvdr.2008.027>
66. Soto-Acosta, R., Bautista-Carbajal, P., Cervantes-Salazar, M., Angel-Ambrocio, A. H., & del Angel, R. M. (2017). DENV up-regulates the HMG-CoA reductase activity through the impairment of AMPK phosphorylation: A potential antiviral target. *PLOS Pathogens*, 13(4), e1006257. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006257>
67. Soto-Acosta, R., Mosso, C., Cervantes-Salazar, M., Puerta-Guardo, H., Medina, F., Favari, L., ... del Angel, R. M. (2013). 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*, 442(2), 132–147. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.003>
68. Stokes, A., Bauer, J. H., & Hudson, N. P. (1928). THE TRANSMISSION OF YELLOW FEVER TO MACACUS RHESUS: PRELIMINARY NOTE. *Journal*

of the American Medical Association, 90(4), 253.
<https://doi.org/10.1001/jama.1928.02690310005002>

69. Tabas, I. (2002). Consequences of cellular cholesterol accumulation: Basic concepts and physiological implications. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(7), 905–911. <https://doi.org/10.1172/JCI16452>
70. Taylor, A., Foo, S.-S., Bruzzone, R., Vu Dinh, L., King, N. J. C., & Mahalingam, S. (2015). Fc receptors in antibody-dependent enhancement of viral infections. *Immunological Reviews*, 268(1), 340–364. <https://doi.org/10.1111/imr.12367>
71. Theiler, M. (1930). Studies on the Action of Yellow Fever Virus in Mice. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 24(2), 249–272. <https://doi.org/10.1080/00034983.1930.11684639>
72. Theiler, M., & Smith, H. H. (1937). The effect of prolonged cultivation in vitro upon the pathogenicity of Yellow Fever Virus. *The Journal of Experimental Medicine*, 65(6), 767–786.
73. Thomas, S. J., Martinez, L. J., & Endy, T. P. (2014). Flaviviruses: Yellow Fever, Japanese B, West Nile, and Others. En R. A. Kaslow, L. R. Stanberry, & J. W. Le Duc (Eds.), *Viral Infections of Humans* (pp. 383–415). https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7448-8_16
74. Umashankar, M., Sanchez-San Martin, C., Liao, M., Reilly, B., Guo, A., Taylor, G., & Kielian, M. (2008). Differential Cholesterol Binding by Class II Fusion Proteins Determines Membrane Fusion Properties. *Journal of Virology*, 82(18), 9245–9253. <https://doi.org/10.1128/JVI.00975-08>

75. Valderrama, A., Díaz, Y., & López-Vergès, S. (2017). Interaction of Flavivirus with their mosquito vectors and their impact on the human health in the Americas. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 492(4), 541–547. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.050>
76. Valente-Acosta, B., & García-Acosta, J. (2018). Fiebre amarilla: Revisión concisa ante el actual escenario epidemiológico. *Medicina Interna de México*, 33(5), 648–654.
77. Villareal, V. A., Rodgers, M. A., Costello, D. A., & Yang, P. L. (2015). Targeting host lipid synthesis and metabolism to inhibit dengue and hepatitis C viruses. *Antiviral research*, 124, 110–121. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.10.013>
78. Vratskikh, O., Stiasny, K., Zlatkovic, J., Tsouchnikas, G., Jarmer, J., Karrer, U., ... Heinz, F. X. (2013). Dissection of Antibody Specificities Induced by Yellow Fever Vaccination. *PLOS Pathogens*, 9(6), e1003458. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003458>
79. Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K. E., Walther, P., ... Bartenschlager, R. (2009). Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host & Microbe*, 5(4), 365–375. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.007>
80. Wen, J., & Shresta, S. (2019). Antigenic cross-reactivity between Zika and dengue viruses: Is it time to develop a universal vaccine? *Current Opinion in Immunology*, 59, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.02.001>
81. WHO. (2018). WHO vaccine pipeline tracker. Recuperado el 8 de mayo de 2019, de WHO website:

http://www.who.int/immunization/research/vaccine_pipeline_tracker_spreadsheets/en/

82. WHO. (s/f). Fiebre amarilla. Recuperado el 18 de septiembre de 2018, de World Health Organization website: <http://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/yellow-fever>
83. Woodson, S. E., & Holbrook, M. R. (2011). Infection of hepatocytes with 17-D vaccine-strain yellow fever virus induces a strong pro-inflammatory host response. *Journal of General Virology*, 92(10), 2262–2271. <https://doi.org/10.1099/vir.0.031617-0>
84. Woodson, Sara E., Freiberg, A. N., & Holbrook, M. R. (2011). Differential cytokine responses from primary human Kupffer cells following infection with wild-type or vaccine strain yellow fever virus. *Virology*, 412(1), 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.012>
85. Wu, Y., Liu, Q., Zhou, J., Xie, W., Chen, C., Wang, Z., ... Cui, J. (2017). Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins in vitro. *Cell Discovery*, 3, 17006. <https://doi.org/10.1038/celldisc.2017.6>
86. Zhang, W., Kaufmann, B., Chipman, P. R., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2013). Membrane Curvature in Flaviviruses. *Journal of structural biology*, 183(1), 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.04.005>
87. Zidovetzki, R., & Levitan, I. (2007). Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(6), 1311–1324. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.03.026>