



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

“Estudio del efecto de la metformina durante la infección por
Zika y Dengue *in vitro* e *in vivo*”

TESIS

QUE PRESENTA:

FARFAN MORALES CARLOS NOE

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA Y
PATOGENESIS MOLECULAR

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ROSA MARÍA DEL ÁNGEL NÚÑEZ DE CÁCERES

CDMX

MAYO, 2023

CREDITOS A LAS INSTITUCIONES

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca brindada para realizar este proyecto, el cual se desarrolló en el departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), bajo la tutoría de la Dra. Rosa María del Ángel. Este trabajo fue asesorado por la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano, el Dr. Víctor Katsutoshi Tsutsumi Fujiyoshi y el Dr. Bulmaro Cisneros Vega, todos profesores e investigadores del CINVESTAV. Además, fue asesorado por la Dra. Sofía Lizeth Alcaraz Estrada, investigadoras del Centro Médico Nacional 20 de noviembre.

TUTOR

Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres

ASESORES

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

Dr. Víctor Katsutoshi Tsutsumi Fujiyoshi.

Dr. Bulmaro Cisneros Vega

Dra. Sofía Lizeth Alcaraz Estrada

DEDICATORIAS

Apenas naces, ya tienes un destino, “morir”.

Con cada paso me acerco a mi destino, así es que entre mi primer y mi último aliento voy a reír hasta llorar, llorar hasta reír y amar hasta morir. Que no te sorprenda si llego más lejos de lo que pensaste o menos lejos de lo que soñé, mira que este no era mi camino, pero con gusto lo recorreré. Pues ya no importa ser el mejor, sino ser mejor con cada día.

Dedico este trabajo a Dios, a mi Familia y mi mejor amiga Argo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios. Por permitirme llegar hasta aquí, la verdad es que soy un desastre, pero intento ser mejor con cada día.

A mi compañera y mejor amiga Arely M. González González. Tantos recuerdos felices a tu lado han hecho que este ciclo sea una de las mejores etapas de mi vida. Gracias por ser mi compañera, por cada consejo, por cada momento. En seis años aprendí más de mí, que lo que aprendí en toda mi vida solo. Tuve suerte de tenerte a mi lado.

A mi tutora Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres. No hay palabras que describan cuan agradecido. Gracias por ser tan empática y apoyarnos en las buenas y en las malas. Además de ser mi mentora, usted se volvió un modelo a seguir tanto en lo profesional como en lo personal. Su profesionalismo y su sencillez hacen de usted una persona confiable y admirable.

A mi Familia. Gracias a **mis padres** y a toda mi familia por apoyarme, comprenderme y creer en mí en todo momento, nada de esto hubiera sido posible sin su apoyo. No fue fácil, pero seguimos en el camino.

A mi Hija. Pequeña **Isabella**, es muy probable que no estuviera aquí si no fuera por ti. Es difícil, pero intento ser un ejemplo para ti, para que un día estes orgullosa de mí. Pero recuerda que cada uno elige su propio camino.

A mi equipo de trabajo. Agradezco a mis amigos y compañeros de laboratorio con los que forme un equipo de trabajo y una familia. Donde quiera que vaya intentaré siempre apoyar, así como ustedes me enseñaron. Gracias a **Carlos Daniel Cordero-Rivera, José Manuel Reyes-Ruiz, Luis Adrián De Jesús-González, Juan Fidel Osuna-Ramos, Selvin Noé Palacios Rápalo y Arianna M. Hurtado-Monzón.** También agradezco a **Ricardo Jiménez Camacho y José De Jesús Bravo Silva**, mis primeros estudiantes y mejores amigos, gracias por confiar en mí. Gracias a **Magda Lizbeth Benítez Vega** por soportarnos a todos y poner orden en el laboratorio y a **Jonathan Hernández Castillo y Marcos Pérez García** por ser parte de esta familia. Por último, agradezco a **Jaime Zarco** por su amistad y absoluta disposición en ayudar a los estudiantes en todo momento y a **Fernando Medina** por ser todo un

personaje y apoyarnos en laboratorio a su manera, tan peculiar, pues sin él quizá nuestras vidas hubieran sido más sencillas, pero mucho más aburridas.

A mis asesores. Gracias al Dr. Víctor Katsutoshi Tsutsumi Fujiyoshi, Dr. Bulmaro Cisneros Vega y la Dra. Sofía Lizeth Alcaraz Estrada, por brindarme su conocimiento, su confianza, su apoyo, su tiempo y sus consejos.

A mi Asesora Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano. Le Agradezco de corazón por su infinita paciencia, su comprensión y su apoyo. Su confianza y su buen corazón nos hacen sentir parte de una familia, la familia CINVESTAV.

Al personal Administrativo del departamento. Le agradezco principalmente a **Clara Castellán, Martha Aguilar, Marcela Guzmán, Irma Miranda y Anabel Sandoval**, por apoyarnos y hacernos la vida mucho más fácil.

Agradezco también al Dr. Marco Antonio Meraz Ríos y a Ma. Del Pilar Figueroa Corona por brindarnos a los ratones AG129 y apoyarnos para realizar este proyecto. También Agradezco a **María Antonieta López López y a Benjamín Chávez Álvarez** por su amistad, su asesoría y su ayuda en el bioterio. Por último, agradezco a **Víctor Hugo Rosales García** por su extrovertida y extravagante amistad, y por sus consejos de citometría y de la vida.

A CONACyT. Gracias a mi país y a CONACyT por brindarme la oportunidad de realizar estudios de posgrado ya que sin su apoyo nada de esto hubiera sido posible.

“La enseñanza y el aprendizaje son las bases de la prosperidad social, la práctica de estas son el camino a ella”.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
II ANTECEDENTES	14
III JUSTIFICACIÓN	31
IV HIPÓTESIS.....	31
V OBJETIVOS.....	31
5.1 Objetivo general	31
5.2 Objetivos específicos	32
VI MÉTODOS.....	32
VII RESULTADOS	39
7.1 Células de linaje hepático (Huh-7) y neuronal (U-87), como modelos <i>in vitro</i> de infección para el ZIKV	39
7.2 Citotoxicidad de la MET en células de linaje hepático y neuronal.....	40
7.3 Calculo de la concentración citotóxica que causa el 50% de muerte celular (CC50) ..	40
7.4 La MET puede inhibir la infección del ZIKV, con mayor eficacia en células U-87 en comparación con Huh-7.....	41
7.5 La MET es menos eficaz para inhibir al ZIKV, pero no es tóxica comparada con la LOV.	43
7.6 MET reduce el porcentaje de infección y la producción de partículas virales del ZIKV en células Huh-7 y U-87.....	44
7.7 El tratamiento con MET reduce los niveles de expresión de la proteína NS3 del ZIKV en células Huh-7 y U-87.....	46
7.8 La MET no afecta la adsorción y la entrada del ZIKV en células Huh-7 y U-87.....	47
7.9 La MET inhibe eficazmente otros flavivirus en células Huh-7	48
7.10 MET inhibe la formación de los complejos de replicación de ZIKV, DENV y YFV en células Huh-7	51

7.11 El tratamiento con MET reduce las estructuras membranosas de los complejos de replicación del ZIKV, DENV y YFV en células Huh-7.	54
7.12 Signos de la enfermedad del ZIKV y DENV en el modelo de ratón AG129	61
7.13 La MET no protege a los ratones AG129 del ZIKV	69
7.14 MET retrasa la aparición de los signos de la enfermedad, incrementando el tiempo de supervivencia de los ratones AG129 infectados con DENV.	71
7.15 Efecto de la MET sobre la carga viral de ZIKV en cerebros de ratón AG129	74
VIII DISCUSIÓN	86
IX CONCLUSIONES	86
X PERSPECTIVAS	86
XI. REFERENCIAS	86

LISTA DE ABREVIATURAS

- *AMPK: Proteína quinasa activada por AMP*
- *BVD: Virus de la diarrea viral bovina*
- *CC50: Concentración citotóxica que causa el 50% de muerte celular*
- *IC50: Concentración que inhibe la infección viral al 50%*
- *CR: Complejos replicativos*
- *CDC: Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades*
- *DENV: Virus Dengue*
- *DNG: Dengue no Grave*
- *DSSA: Dengue sin signos de alarma.*
- *DG: Dengue grave*
- *DCSA: Dengue con signos de alarma.*
- *DHF: Fiebre hemorrágica del dengue*
- *DSS: síndrome de shock por dengue*
- *HCV: Virus de la hepatitis C*
- *HMGCoA reductasa: Hidroxi-metilglutaril-Coenzima A reductasa*
- *Hpi: Horas post infección (hpi)*
- *JEV: Virus de la encefalitis japonesa*
- *LD: gotas de lípidos*
- *LDL: Lipoproteínas de baja densidad*
- *LDLR: Receptor de Lipoproteínas de alta densidad*
- *LOV: Lovastatina*
- *MET: Metformina*
- *MOI: Multiplicidad de infección*
- *OMS: Organización Mundial de la Salud*
- *PFA: Paraformaldehído*
- *PE: Fosfatidiletanolamina*
- *PS: Fosfatidilserina*
- *RE: Retículo Endoplasmático*
- *RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa*
- *SI: Índice de selectividad (selectivity index)*
- *SINAVE: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica*
- *SREBPs: Proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides*
- *ssRNA (+): Cadena sencilla de RNA de polaridad positiva*
- *TA: Temperatura ambiente*
- *TBEV: Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas*
- *TEM: microscopía electrónica de transmisión*
- *VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad*
- *WNV: Virus del Nilo Occidental*
- *YFV: Virus de la fiebre amarilla*
- *ZIKV: Virus Zika*

Resumen

Aunque los flavivirus como el dengue (DENV) y el virus del zika (ZIKV) son patógenos humanos importantes, no se dispone de una vacuna o tratamiento antiviral eficaz contra ellos. Por lo tanto, la búsqueda de nuevas estrategias para controlar las infecciones por flavivirus es fundamental. Varios estudios han demostrado que el metabolismo de los lípidos del huésped podría ser un blanco antiviral. Se ha descrito que moléculas como el colesterol y otros lípidos son necesarios durante el ciclo replicativo de diferentes miembros de la familia *Flaviviridae*, por lo tanto, los fármacos con efectos hipolipemiantes aprobados por la FDA se han propuesto como posibles candidatos para tratar infecciones por flavivirus. En este estudio se evaluó el efecto anti-flavivirus de la Metformina (MET), un fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de la diabetes tipo 2, que ha mostrado un efecto anti-DENV *in vitro* al activar la AMPK y reducir la actividad de la HMGCR. Nuestros resultados demostraron que MET tiene un amplio espectro antiviral *in vitro*. MET inhibió la infección por ZIKV en diferentes líneas celulares, pero fue más eficaz para inhibir el DENV y el virus de la fiebre amarilla (YFV) en células Huh-7. MET aumentó el tiempo de supervivencia de los ratones infectados con DENV, reduciendo los signos graves de la enfermedad. Sin embargo, no protegió ni atenuó la enfermedad causada por ZIKV en ratones inmunodeficientes AG129. Juntos, estos hallazgos indican que la MET es un agente antiviral eficaz para inhibir la infección por DENV. Por otro lado, se requieren más estudios para determinar el papel de la MET durante la infección de ZIKV *in vivo*.

Abstract

Although Flaviviruses such as dengue (DENV) and zika (ZIKV) virus are important human pathogens, an effective vaccine or antiviral treatment against them is not available. Hence, the search for new strategies to control flavivirus infections is essential. Several studies have shown that the host lipid metabolism could be an antiviral target because cholesterol and other lipids are required during the replicative cycle of different Flaviviridae family members. FDA-approved drugs with hypolipidemic effects could be an alternative for treating flavivirus infections. In this sense, Metformin (MET), an FDA-approved drug used for the treatment of type 2 diabetes, has shown an anti-DENV effect *in vitro* by activating AMPK and reducing HMGCR activity. In this study, MET treatment was evaluated during *in vitro* and *in vivo* ZIKV infection and compared to MET treatment during DENV infection. Our results demonstrated that MET has a broad *in vitro* antiviral spectrum. MET inhibited ZIKV infection in different cell lines, but it was most effective in inhibiting DENV and yellow fever virus (YFV) infection in Huh-7 cells. MET increased the survival time of DENV-infected mice, reducing severe signs of disease. However, it did not protect or attenuate the disease caused by ZIKV in immunodeficient AG129 mice. However, the drug failed to protect against ZIKV infection when AG129 immunodeficient mice were used as *in vivo* model. Interestingly, MET increased DENV-infected male mice's survival time, reducing the severe signs of the disease. Together, these findings indicate that MET is an effective antiviral agent for inhibiting DENV. Moreover, further studies are required to determine the role of MET during ZIKV infection *in vivo*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Flavivirus

La reaparición de diferentes arbovirus (virus transmitidos por artrópodos) en todo el mundo ha generado una alerta sanitaria mundial. Entre estos patógenos destacan los virus que pertenecen a la familia *Flaviviridae*, que se clasifican en 3 géneros. El género *Flavivirus* que incluye al virus del Nilo Occidental (WNV), el virus del dengue (DENV) y el virus del zika (ZIKV); el género *Hepacivirus* que incluye al virus de la hepatitis C (HCV); el género *Pestivirus* que incluye al virus de la diarrea viral bovina (BVD)¹.

El género *Flavivirus* comprende un grupo de virus envueltos que causan numerosas enfermedades en animales y humanos^{2,3} y con un tamaño aproximado de 40 a 60 nanómetros de diámetro. Estos virus cuentan con una nucleocápside icosaédrica y una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva, ssRNA (+), de aproximadamente 11.000 bases como genoma. Su origen etimológico proviene de la palabra *flavus* que significa amarillo en latín y se debe al agente patógeno responsable de la fiebre amarilla, el virus de la fiebre amarilla (YFV).

Existen más de 50 especies virales diferentes dentro del género *flavivirus*, y entre estos, muchos virus de importancia médica, tal es el caso del DENV y ZIKV que pueden inducir diferentes cuadros clínicos que van desde la fiebre hasta complicaciones graves e incluso la muerte. Ambos virus han emergido en nuevas áreas geográficas debido a una amplia variedad de factores como la globalización de viajes y comercio, calentamiento global, cambios en el uso del suelo, cambios en el comportamiento y expansión de vectores de *flavivirus*, como *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*^{4,5}.

A pesar de la importancia de estos patógenos, no se dispone de terapias específicas contra el DENV y el ZIKV, y en la mayoría de los casos el tratamiento es paliativo sin efecto antiviral⁶. Actualmente, continúan los

esfuerzos de la comunidad científica para desarrollar una vacuna o un fármaco para el tratamiento de estas infecciones^{7,8}.

1.2 Transmisión

El mosquito es el animal que causa más muertes humanas al año en comparación con otros animales, debido a que puede transmitir muchas enfermedades parasitarias y virales, incluyendo a los flavivirus^{4,5}. Tanto los mosquitos hembra como los machos tienen una estructura especializada llamada probóscide, que les permite alimentarse del néctar de las flores y los jugos de las frutas. La probóscide del macho no es lo suficientemente fuerte para penetrar la piel, por lo que solo las hembras se alimentan de sangre y transmiten a los flavivirus (figura 1).



Mosquito *Aedes aegypti*.



Mosquito *Aedes albopictus*.

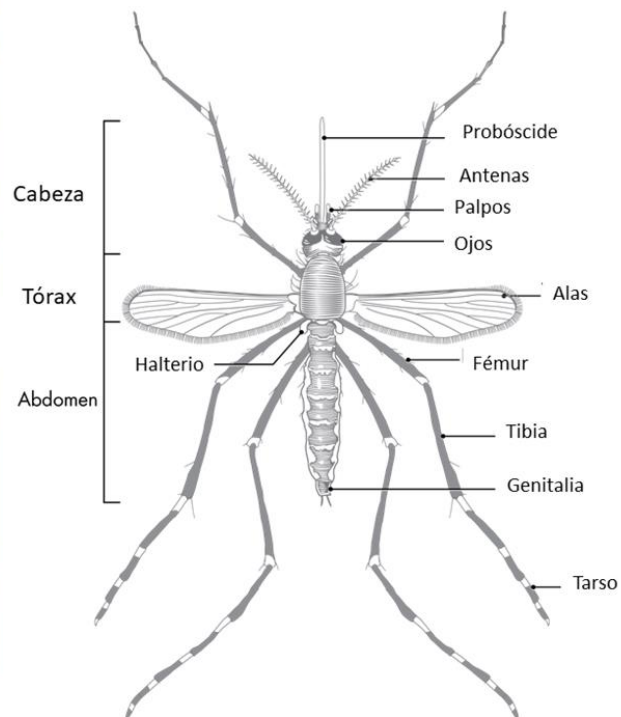


Figura 1. Anatomía de los mosquitos *Aedes*. *Aedes aegypti* y *Aedes albopictu* principales vectores de transmisión del ZIKV y DENV^{9,10}

El ZIKV y DENV son transmitidos por mosquitos infectados del género *Aedes*, específicamente *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (figura 1) ^{4,5}. A diferencia de ZIKV, el virus DENV se transmite principalmente por mosquitos *Aedes aegypti*, y a pesar de que otras especies del género *Aedes* también pueden actuar como vectores, su contribución es secundaria. La prevalencia y la incidencia del ZIKV y DENV están directamente ligadas al ciclo de vida de su vector (Figura 2.), por lo que las condiciones geográficas, climáticas y ecológicas favorables para la sobrevivencia del mosquito, definen las zonas de riesgo de contagio de ambos virus. En este sentido, los mosquitos que pueden transmitir al ZIKV y DENV por lo general habitan lugares que están por debajo de los 6500 pies de altitud, distribuyéndose geográficamente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo¹¹.

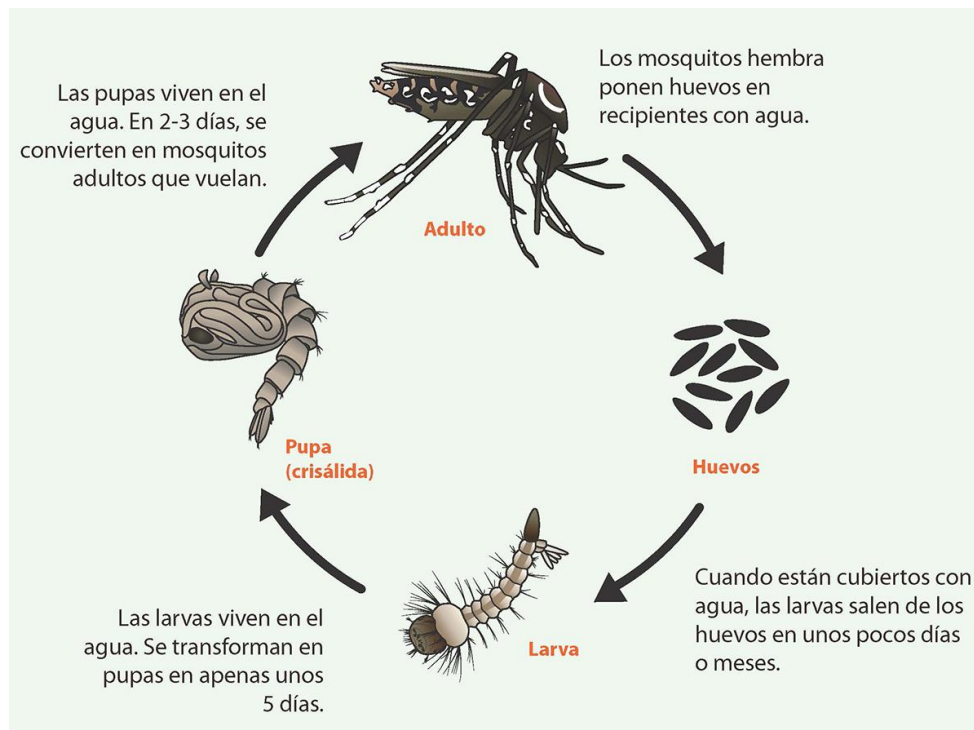


Figura 2. Ciclo de vida de los mosquitos del género *Aedes* vectores de transmisión del virus ZIKA y DENV. Los mosquitos que pueden transmitir al ZIKV y DENV por lo general habitan lugares que están por debajo de los 6500 pies de altitud, distribuyéndose geográficamente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo^{12,13}.

Otros factores ambientales y ecológicos, como la época de lluvias y la llegada de la primavera, propician la transmisión de estos virus incrementando el riesgo de brotes epidémicos, tal como ha ocurrido en las últimas décadas^{4,5}.

El ZIKV además tiene la capacidad de transmitirse sexualmente y se ha sugerido que esta vía contribuye aproximadamente con el 3% de los casos en humanos^{14,15}. La Organización Mundial de la Salud (OMS) confirmó la transmisión vertical del ZIKV considerando los casos confirmados de neonatos con anomalías congénitas de los cuales se pudo aislar el virus (figura 3)^{16,17}. Además se ha reportado que el ZIKV puede ser transmitido por transfusión de sangre y plaquetas¹⁸.

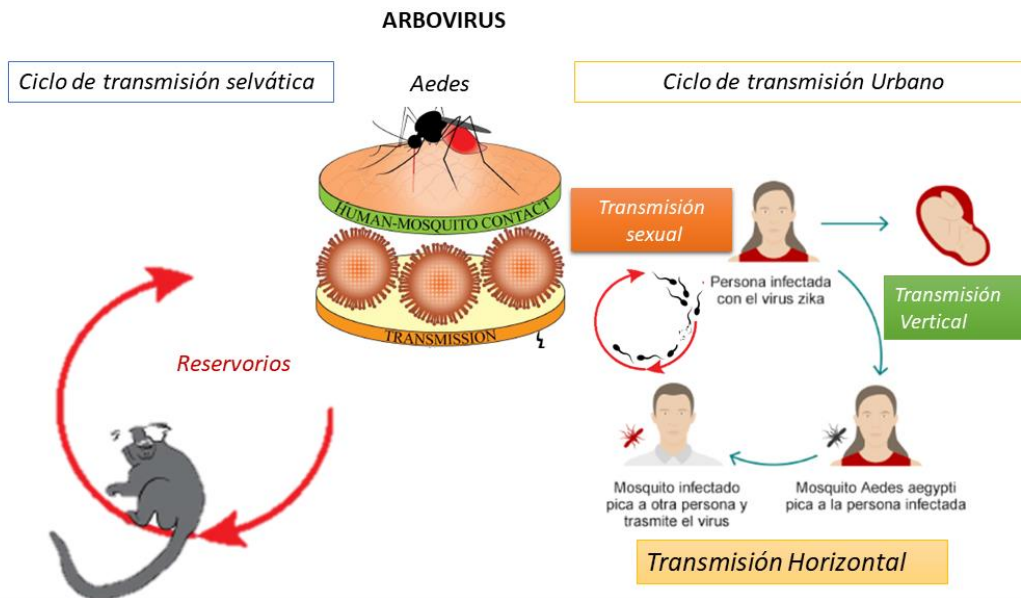


Figura 3. Ciclo de transmisión completo del ZIKV. EL ZIKV se puede transmitir horizontalmente, de persona a persona, a través del vector *Aedes* o por contacto sexual; y verticalmente, de madre a hijo. Además, existen reservorios en la naturaleza que permiten su prevalencia y propician la endemidad de esta enfermedad en ciertas zonas geográficas. Imagen modificada de Ali S, et. al. 2017 ^{5,15}

Respecto a DENV, se ha reportado la posibilidad de transmisión vertical, sin embargo, se requieren de más estudios para confirmar la transmisión materna ya que las tasas de transmisión parecen bajas y aparentemente está relacionado con el momento de la infección del dengue durante el

embarazo^{19,20}. Por último, hay que destacar que estos virus no solo infectan a humanos, sino también a otros primates y animales salvajes que fungen como reservorios virales naturales (Figura 3). Esto complica su erradicación y propicia su prevalencia y consolidación como enfermedades endémicas en ciertas zonas geográficas⁵.

1.3 Síntomas y diagnóstico

El período de incubación de la enfermedad por ZIKV es variable, sin embargo un estudio estimó un período de incubación no mayor a 15.4 días con una mediana del tiempo de 6,8 días²¹. Por otro lado, se estima que el tiempo de incubación del virus DENV es de 3-10 días con una media de 5.9 días²².

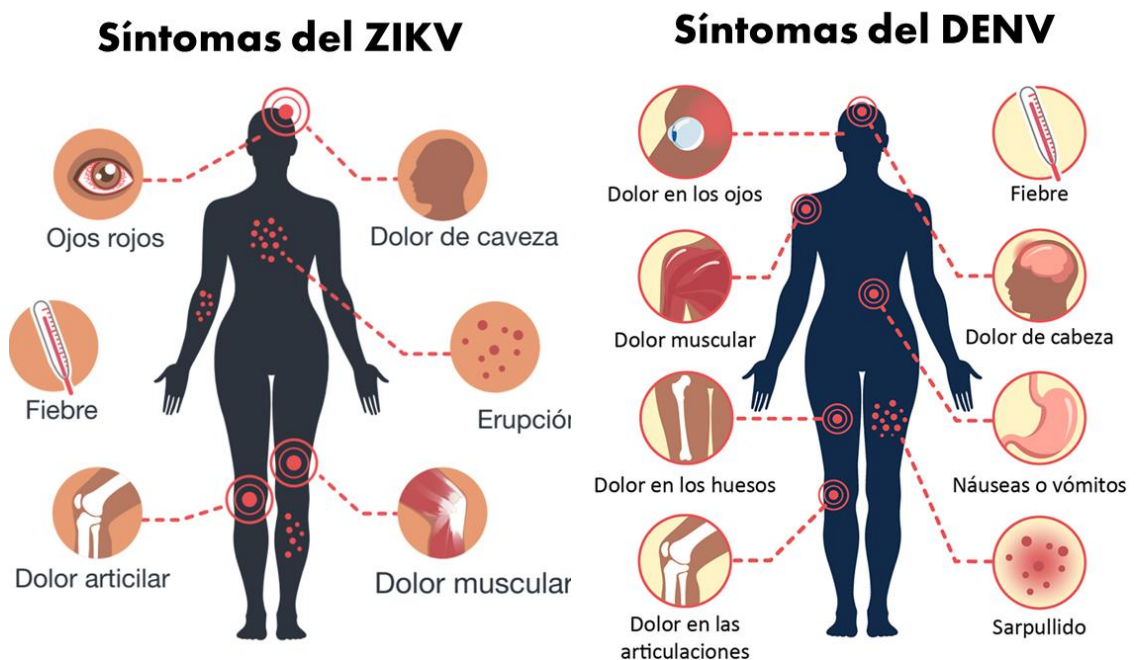


Figura 4. Síntomas del ZIKV y del DENV. Los síntomas de ambas infecciones son similares a otras infecciones por flavivirus, sin embargo, algunos síntomas como la conjuntivitis no purulenta y las erupciones cutáneas son representativos de la infección por ZIKV^{23,24}.

Los síntomas de ambas infecciones son similares a otras infecciones por flavivirus, siendo frecuente la fiebre, erupciones cutáneas, dolor muscular y articular, malestar general y dolor de cabeza. Sin embargo, algunos síntomas

como la conjuntivitis no purulenta y las erupciones cutáneas, identificadas en los primeros brotes del ZIKV en las islas Yap y Brasil, son representativos de la infección por ZIKV^{25,26}. Estos síntomas generalmente son leves y duran de 2 a 7 días (Figura 4).

La prueba de oro para el diagnóstico de infección para ambos virus se realiza mediante un ensayo de RT-PCR utilizando primers específicos para la detección del genoma de cada virus a partir del análisis de una muestra de sangre, y en el caso del ZIKV, también mediante el análisis de fluidos corporales, como orina, saliva o semen^{17,26-28}.

1.4 Características clínicas y patológicas de la infección por ZIKV y DENV

El ZIKV fue aislado por primera vez en 1947 de un mono macaco Rhesus infectado en la estación de Investigación Forestal Zika en Uganda²⁹. Posteriormente, fue aislado en humanos, provocando un cuadro clínico típico similar a la gripe o síndrome febril autolimitado, el cual se presenta en aproximadamente 20% de las personas infectadas y se resuelve en pocos días^{25,26}. Hasta ese punto el virus parecía ser inofensivo, sin embargo, en las últimas décadas, específicamente durante su resurgimiento en América del Sur, América Central y el Caribe, comenzó a asociarse con enfermedades graves en adultos y en recién nacidos, como el síndrome de Guillan-Barré, la falla multiorgánica, la trombocitopenia³⁰ y los defectos congénitos¹¹.

Las anomalías congénitas se confirmaron a partir de casos de mujeres embarazadas sintomáticas infectadas con el ZIKV en Brasil (2015), de las cuales el 42% de los fetos exhibió algún tipo de anomalía en el ultrasonido. El fenotipo clínico de la infección congénita por ZIKV fue variable e incluyó calcificaciones cerebrales, microcefalia, restricción del crecimiento intrauterino y/o muerte fetal^{16,31}. Además, mediante tomografía computarizada y resonancia magnética se identificó hipoplasia del cerebelo y del tallo cerebral, ventriculomegalia, mielinización retrasada, cisterna magna agrandada, anomalías del cuerpo calloso, calcificaciones y malformaciones

corticales, en cerebro de neonatos congénitamente infectados³². Durante este periodo el ZIKV provocó más de 4 millones de infecciones y un sorprendente aumento en el número de casos relacionados con defectos congénitos graves como microcefalia (Figura 5)¹¹. Esto llevó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a declarar a la infección por ZIKV como "una emergencia de salud pública de importancia internacional"¹¹.



Figura 5. Síndrome congénito del ZIKV. Durante los brotes en América Central y el Caribe, la infección con zika comenzó a asociarse con enfermedades graves en adultos y recién nacidos. El principal defecto congénito fue la microcefalia, una malformación en la que el niño nace con una cabeza pequeña o en la que la cabeza deja de crecer después del parto³³.

Las evaluaciones retrospectivas de los brotes de ZIKA ocurridos en la Polinesia Francesa confirmaron un mayor riesgo de microcefalia asociada con la infección por ZIKV en mujeres infectadas en el primer trimestre³⁴ y la asociación con casos de síndrome de Guillain-Barré en adultos³⁵⁻³⁸. Estudios retrospectivos de otros países confirmaron que el síndrome de Guillain-Barré se puede presentar durante la infección aguda o inmediatamente después^{36,39}.

Actualmente sabemos que el ZIKV es un virus menos neuro invasivo en adultos, a diferencia de otros flavivirus encefálicos, por lo que rara vez causa

meningitis y encefalitis. Sin embargo, ZIKV infecta y daña preferentemente a las células progenitoras neurales afectando su crecimiento y promoviendo la apoptosis^{40,41}, afectando así el desarrollo del cerebro en la etapa embrionaria y fetal.

Además, se ha reportado que el ZIKV puede infectar el ojo y causar uveítis en adultos, una enfermedad potencialmente cegadora⁴², mientras que la infección congénita se asocia a lesiones maculares y perimaculares bilaterales, así como anomalías del nervio óptico en la mayoría de los casos⁴³. También se ha reportado un único caso de infección humana por ZIKV en asociación con una lesión hepática grave y trastornos de la coagulación⁴⁴, por lo que se requiere de más estudios para confirmar o descartar alguna asociación patológica hepática.

De la misma forma que el ZIKV, en las últimas décadas se ha registrado un aumento considerable de los casos de DENV en América⁴⁵. En este sentido, se estima que el DENV causa 390 millones de infecciones al año⁴. Aunque muchas infecciones por DENV se resuelven sin complicaciones, el dengue grave es una causa importante de enfermedad y muerte en algunos países de Asia y América Latina⁴⁵, por lo que es importante el manejo adecuado de los casos y su evaluación.

Según los datos del ensayo de neutralización, se pueden distinguir cuatro serotipos del virus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) y cualquiera de estos puede producir un amplio espectro de síntomas clínicos, que van desde un síndrome pseudogripal leve, también conocido como dengue sin signos de alarma (DSSA), hasta las formas más graves de la enfermedad, dengue grave (DG), que se caracterizan por coagulopatía, aumento de la fragilidad vascular y permeabilidad (fiebre hemorrágica del dengue, DHF) que puede progresar a shock hipovolémico (síndrome de shock por dengue, DSS) y muerte (Figura 6)⁴⁶.

Dengue sin signos de alarma - DSSA	Dengue con signos de alarma - DCSA	Dengue grave - DG
<p>Persona que vive o ha viajado en los últimos 14 días a zonas con transmisión de dengue y presenta fiebre habitualmente de 2 a 7 días de evolución y 2 o más de las siguientes manifestaciones:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Náuseas / vómitos 2. Exantema 3. Cefalea / dolor retroorbitario 4. Mialgia / artralgia 5. Petequias o prueba del torniquete (+) 6. Leucopenia <p>También puede considerarse caso todo niño proveniente o residente en zona con transmisión de dengue, con cuadro febril agudo, usualmente entre 2 a 7 días y sin foco aparente.</p>	<p>Todo caso de dengue que cerca de y preferentemente a la caída de la fiebre presenta uno o más de los siguientes signos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Dolor abdominal intenso o dolor a la palpación del abdomen 2. Vómitos persistentes 3. Acumulación de líquidos (ascitis, derrame pleural, derrame pericárdico) 4. Sangrado de mucosas 5. Letargo / irritabilidad 6. Hipotensión postural (lipotimia) 7. Hepatomegalia >2 cm 8. Aumento progresivo del hematocrito 	<p>Todo caso de dengue que tiene una o más de las siguientes manifestaciones:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Choque o dificultad respiratoria debido a extravasación grave de plasma. Choque evidenciado por: pulso débil o indetectable, taquicardia, extremidades frías y llenado capilar >2 segundos, presión de pulso ≤ 20 mmHg; hipotensión en fase tardía. 2. Sangrado grave: según la evaluación del médico tratante (ejemplo: hematemesis, melena, metrorragia voluminosa, sangrado del sistema nervioso central (SNC)) 3. Compromiso grave de órganos, como daño hepático (AST o ALT ≥ 1000 UI), SNC (alteración de conciencia), corazón (miocarditis) u otros órganos
<p>Requieren observación estricta e intervención médica inmediata</p>		

Figura 6. Clasificación de la gravedad del dengue y definiciones clínica. DSSA, Dengue sin signos de alarma. DCSA, Dengue con signos de alarma. DG, Dengue grave. Organización Panamericana de la Salud. Dengue: guías para la atención de enfermos en la Región de las Américas. 2. ed. Washington, DC: OPS, 2016^{47,48}.

Un paciente puede entrar en fase crítica entre el día 3 y 7 después del inicio de la enfermedad. Durante las 24-48 horas de la fase crítica, una pequeña parte de los pacientes puede manifestar un deterioro repentino de los síntomas. Es en este momento se pueden manifestar los signos de alarma asociados con el dengue grave, una complicación potencialmente mortal debido a la fuga de plasma, la acumulación de líquido, la dificultad respiratoria, el sangrado intenso y la alteración de órganos⁴⁹.

1.5. Epidemiología

Como anteriormente se mencionó, la distribución de estos flavivirus se asocia principalmente con la distribución de su vector, mosquitos del género *Aedes* que generalmente habitan en lugares por debajo de 6.500 pies. La probabilidad de contraer una infección por picadura de mosquito en lugares que se encuentran por encima de esa altitud son muy bajas^{12,50}.

A diferencia de otros flavivirus que se restringen a una o dos especies de mosquitos, el ZIKV puede ser transmitido por una variedad de mosquitos del género *Aedes*. En la figura 7 se observan las áreas de riesgo para contraer el ZIKV reportadas por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) hasta el 4 de noviembre del 2019⁵⁰.

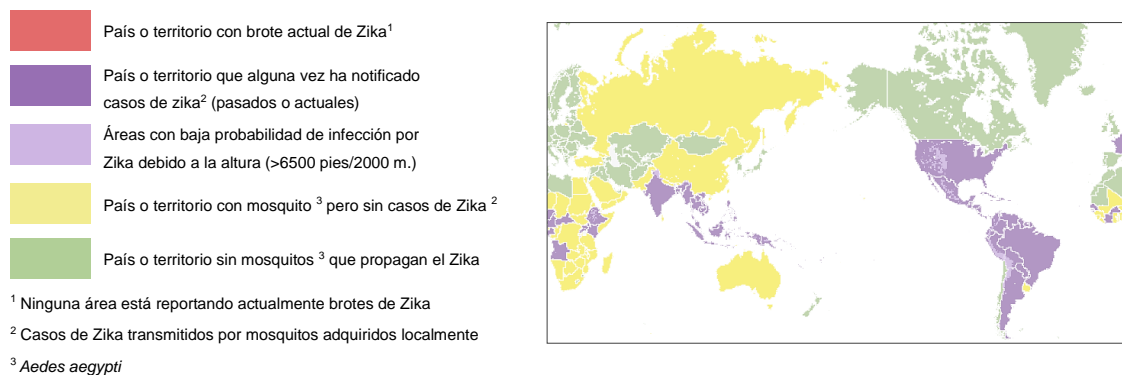


Figura 7. Áreas de riesgo de transmisión de ZIKV. El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) reporta las áreas con riesgo de transmisión de ZIKV⁵¹.

En México se han confirmado 13, 003 casos autóctonos en un periodo que va desde octubre del 2015 hasta marzo del 2023 (Tabla 1.), muestreando al 5 % de los casos probales. Estos incluyen todos los grupos de edad, principalmente en edad productiva. Entre estos, un total de 7,152 casos corresponde a Mujeres embarazadas (Tabla 1.)⁵².

El mayor número de casos confirmados se presentó durante el periodo de octubre del 2015 al cierre del 2019. Durante este periodo se confirmaron 12,935 casos de enfermedad por ZIKV distribuidos en casi toda la república mexicana, con una tendencia descendente a partir de la semana 41 del 2017

hasta el 2019⁵³. Posteriormente, el confinamiento a causa de la pandemia del virus SARS-CoV-2 impacto la transmisión de enfermedades transmitidas por mosquitos del género *Aedes* durante el periodo 2020-2023⁵². Sin embargo, no podemos descartar la posible subestimación a causa del confinamiento. Por lo anterior, México sigue siendo un país de alto riesgo de contagio por ZIKV según la CDC (Figura 7).

Entidad Federativa	Casos Confirmados 2015-2022	Casos Confirmados 2023	Total
Aguascalientes	1	0	1
Baja California	3	0	3
Baja California Sur	115	0	115
Campeche	94	0	94
Coahuila	336	0	336
Colima	297	0	297
Chiapas	823	0	823
Durango	5	0	5
Guanajuato	5	0	5
Guerrero	888	0	888
Hidalgo	285	0	285
Jalisco	682	0	682
México	49	0	49
Michoacán	70	0	70
Morelos	587	0	587
Nayarit	709	0	709
Nuevo León	950	0	950
Oaxaca	540	0	540
Puebla	225	0	225
Querétaro	17	0	17
Quintana Roo	391	0	391
San Luis Potosí	534	0	534
Sinaloa	340	0	340
Sonora	448	0	448
Tabasco	376	0	376
Tamaulipas	802	0	802
Veracruz	2,105	0	2,105
Yucatán	1,325	0	1,325
Zacatecas	1	0	1
Total	13,003	0	13,003

Entidad Federativa	Casos Confirmados 2015-2022	Casos Confirmados 2023	Total
Baja California Sur	12	0	12
Campeche	55	0	55
Coahuila	177	0	177
Colima	204	0	204
Chiapas	562	0	562
Durango	1	0	1
Guerrero	482	0	482
Hidalgo	151	0	151
Jalisco	135	0	135
México	4	0	4
Michoacán	21	0	21
Morelos	343	0	343
Nayarit	383	0	383
Nuevo León	679	0	679
Oaxaca	211	0	211
Puebla	72	0	72
Querétaro	5	0	5
Quintana Roo	335	0	335
San Luis Potosí	418	0	418
Sinaloa	80	0	80
Sonora	28	0	28
Tabasco	287	0	287
Tamaulipas	692	0	692
Veracruz	888	0	888
Yucatán	926	0	926
Zacatecas	1	0	1
Total	7,152	0	7,152

Tabla 1. Casos confirmados autóctonos de enfermedad por el ZIKV. Periodo octubre 2015 a marzo 2023. México. Fuente, SINAVE/DGE/SS: Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedad por virus zika⁵⁴.

Por su parte, el DENV al igual que ZIKV, está presente en los trópicos, con variaciones espaciales locales influenciadas por la lluvia, la temperatura y el grado de urbanización⁴. Como se mencionó anteriormente, los modelos estiman 390 millones de infecciones por el DENV al año, de las cuales 96 millones (67-136 millones) se manifiestan clínicamente (con cualquier gravedad de la enfermedad)⁴. Otro estudio sobre la prevalencia del dengue estimó que 3.900 millones de personas están en riesgo de infección⁵⁵.

Antes de 1970, solo 9 países habían experimentado epidemias graves de DENV. La enfermedad ahora es endémica en más de 100 países de África, las Américas, el Mediterráneo Oriental, el Sudeste Asiático y el Pacífico Occidental (Figura 8).

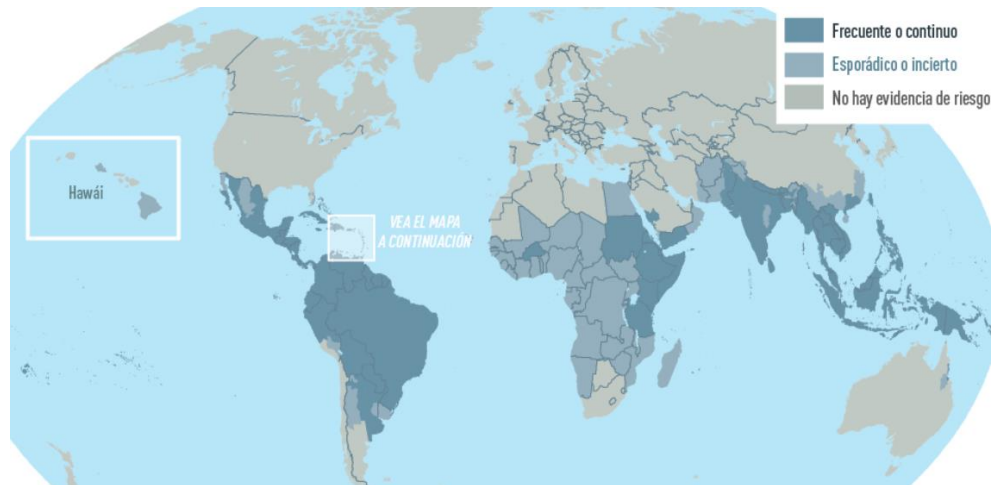


Figura 8. Áreas de riesgo de transmisión de DENV. El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) reporta a México como uno de los países con áreas de riesgo de transmisión de Dengue ⁵⁶.

La mayor cantidad de casos de dengue jamás notificados a nivel mundial fue en 2019. Solo la región americana reportó 3,1 millones de casos, con más de 25.000 clasificados como graves y se cree que el impacto combinado con el COVID-19 podría tener consecuencias devastadoras para las poblaciones en riesgo⁴⁹. México sigue siendo un país con alto riesgo de contagio, principalmente al sur de México⁵⁷. A pesar de la reducción de casos, el DENV se hizo presente en el 2022, con 12,671 casos confirmado (Tabla 2). Se prevé que los casos de dengue del 2023 superen por mucho a los reportados del 2022, como muestra la tabla 2 que compara la semana 9 de ambos años, con un incremento de hasta 5 veces en comparación con la misma semana del año 2022.

INDICADOR	2022*	2022 SEMANA	2023 SEMANA
DNG	7,200	124	656
DCSA	5,061	135	491
DG	410	18	34
DCSA + DG	5,471	153	525
TOTAL CONFIRMADOS	12,671	277	1,181
DEFUNCIONES	53	1	1
LETALIDAD&	0.97	0.65	0.19

Tabla 2. Panorama epidemiológico de Dengue en México. Dengue no Grave. (DNG). Caso probable de Dengue con Signos de Alarma (DCSA). Dengue Grave (DG). Información de casos de dengue a marzo del 2023 comparados con la semana 9 del 2022. Fuente, SINAVE/DGE/SS: Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedad por virus Dengue⁵⁸.

II ANTECEDENTES

2.1 Características moleculares de los flavivirus

El genoma de los flavivirus consta de una molécula de ssRNA (+) con un solo marco de lectura abierto que codifica para una única poliproteína que se escinde post-traduccionamente en tres proteínas estructurales, Cápside (C), proteína precursora de Membrana (prM) y proteína de envoltura (E), y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (Figura 9)².

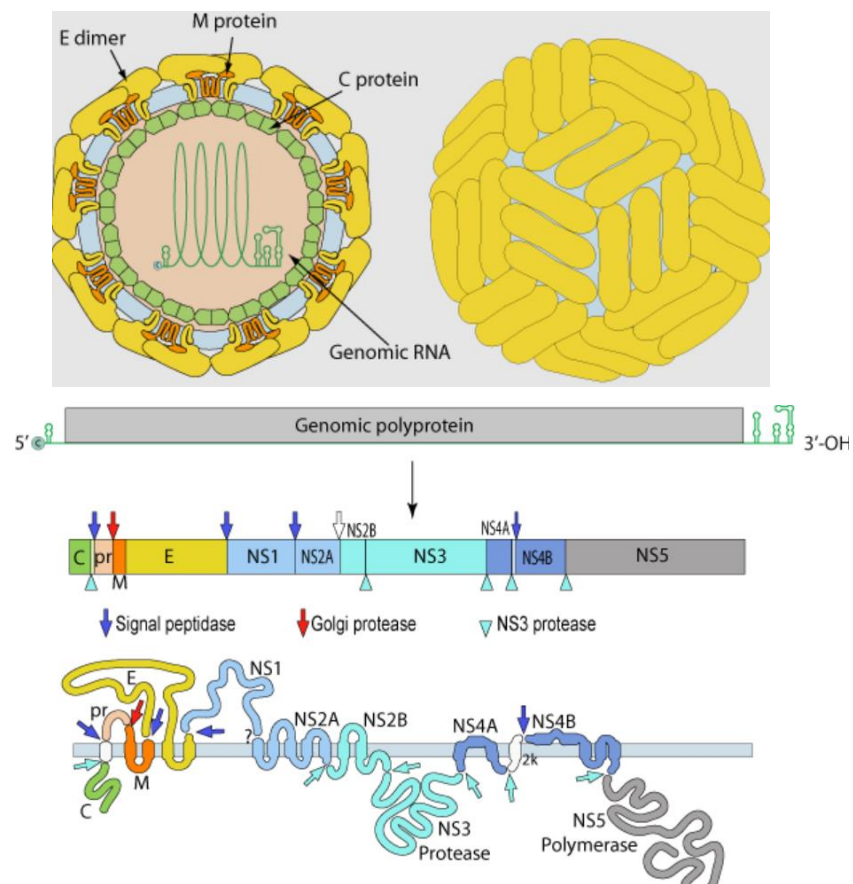


Figura 9. Partícula viral de los flavivirus. Partícula viral y sus componentes (arriba): El RNA sencillo de doble cadena, ssRNA (+), la nucleocápside constituida por la proteína C, y la membrana de lípidos que contienen a las proteínas estructurales M y E. El RNA del ZIKV (10,974 bases) se traduce en una poliproteína de 3418 residuos (barra inferior) que se procesa en tres proteínas estructurales y 7 no estructurales⁵⁹.

El virión tiene un diámetro de ~50 nm y contiene una nucleocápside que está rodeada por una bicapa lipídica que contiene las proteínas estructurales (prM/M y E), que están dispuestas con una simetría icosaédrica en la superficie cuya disposición confiere termo-estabilidad, principalmente a la partícula viral de ZIKV (Figura 9)⁶⁰⁻⁶².

2.2 Órganos y células blanco del DENV

Los receptores son los principales determinantes para la infección. Para el DENV, y en general para los flavivirus, los receptores más estudiados y caracterizados son las integrinas $\alpha\beta$, los receptores de lectina tipo C (CLR); y las familias de receptores de fosfatidilserina TIM y TAM⁶³. Sin embargo, se ha determinado que los flavivirus no utilizan solo un receptor de entrada, sino múltiples receptores de forma específica para cada tipo de célula⁶³.

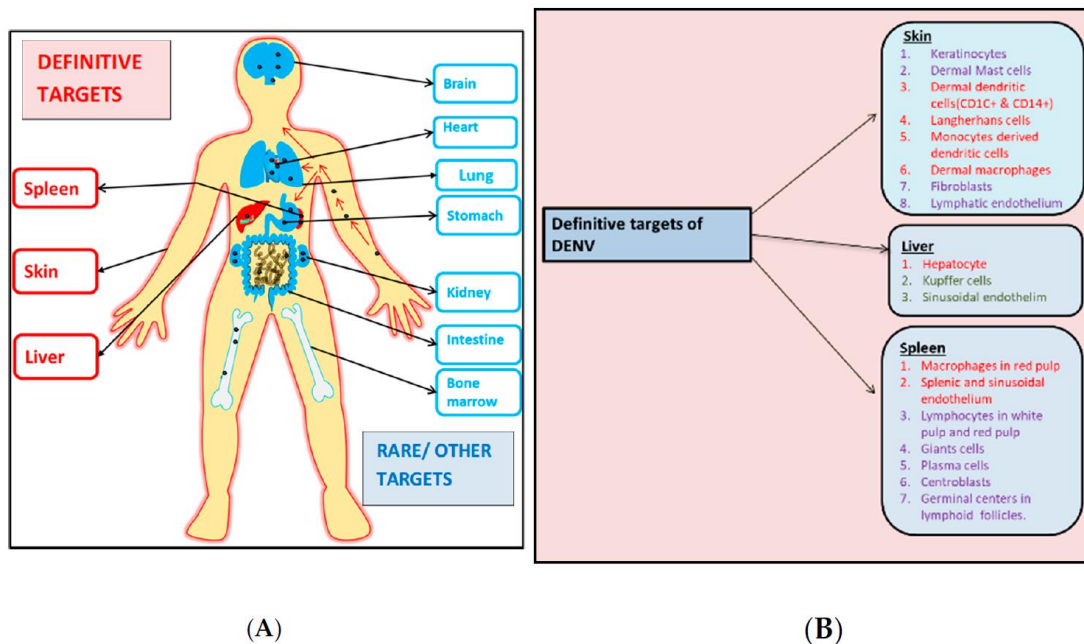


Figura 10. Órganos y células blanco del DENV. (A) Órganos blanco-definitivos (en rojo) y órganos menos frecuentes (en azul) del DENV. (B) Subconjuntos celulares específicos de los órganos definitivos infectados por el DENV. Las células marcadas en rojo han demostrado sistemáticamente estar infectadas por el DENV donde el virus también se replica. Las células marcadas en verde también han resultado ser el objetivo del DENV, aunque de forma inconsistente. Las células marcadas en púrpura han resultado ser positivas al DENV en algunos estudios de autopsia, pero no han mostrado ningún signo de replicación del DENV⁶⁴.

El DENV tiene la capacidad de replicarse en diferentes tipos celulares de diferentes órganos humanos y animales, además, algunas de estas células blanco contribuyen a la patogénesis y a la progresión de la gravedad de la enfermedad. La evidencia recolectada de autopsias humanas en conjunto con los ensayos *in vitro* e *in vivo* muestran una predilección por ciertos órganos blancos, específicamente por células del Hígado, del Bazo y células de la piel como se muestra en la figura 10, y en menor frecuencia órganos como el cerebro, corazón, intestino, etc..^{64,65}.

2.2.1 Órganos y células blanco del ZIKV

Para el caso del ZIKV se desconoce aún cual es el principal receptor que podría mediar la internalización viral y por tanto el tropismo viral. Al igual que DENV, se cree que podrían ser varias moléculas involucradas durante este proceso. El primer candidato es el receptor AXL, miembro de la familia del receptor TAM tirosina cinasa, que interacciona con las proteínas de unión a fosfatidilserina Gas6 y Proteína S (Gas6/ProS), que a su vez se unen a la superficie del virus, funcionando como moléculas puente⁶⁶⁻⁶⁸. Otro receptor candidato para ZIKV es TIM1, una glicoproteína que interactúa con la fosfatidilserina de la membrana viral, el cual se expresa ampliamente en varios tipos de células de placenta humana susceptibles a la infección por ZIKV, como Macrófagos Hofbauer, células endoteliales y citotrofoblastos⁶⁹.

La evidencia que ha permitido identificar los órganos blanco de ZIKV ha sido recolectada a partir de muestras y biopsias en las que se ha podido aislar e identificar al ZIKV. Actualmente se sabe que ZIKV infecta y se replica en una gran variedad de órganos incluyendo el tracto genital femenino y sitios inmunoprivilegiados como ojos, cerebro y testículos. Además, se ha reportado que el virus infeccioso puede persistir en varios fluidos corporales tales como semen, saliva, lágrimas y orina (Figura 11) ^{66 70}.

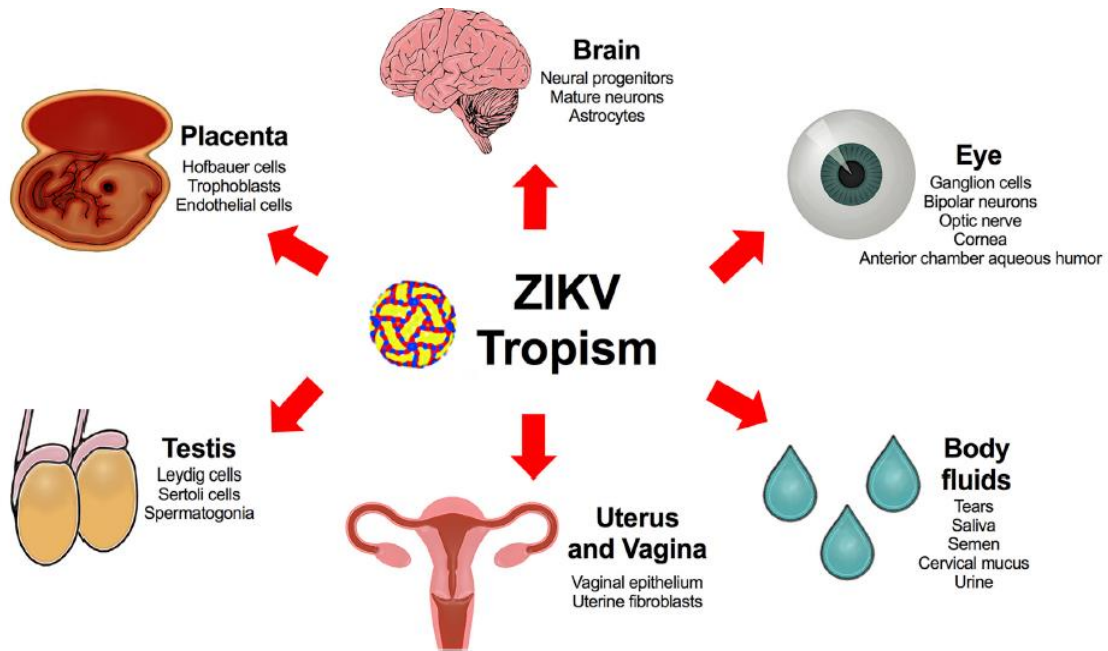


Figura 11. Órganos y tropismo de ZIKV. El ZIKV infecta y se replica en las células humanas de la piel, en fibroblastos cutáneos, queratinocitos, macrófagos, células del endotelio vascular y otros tejidos. Tiene la capacidad invasiva para poder traspasar e infectar tejidos inmunoprivilegiados como, testículos, ojos, cerebro y placenta, además de replicarse de manera eficaz en estos⁶⁶.

También tiene la capacidad de infectar tejidos maternos y fetales, ya que se ha detectado en sangre del cordón umbilical, varios tipos de células placentarias, líquido amniótico y en cerebro humano fetal y neonatal en desarrollo, así como en tejidos de abortos espontáneos del primer y segundo trimestre⁷¹. Los estudios de infección de células placentarias humanas han demostrado que ZIKV se replica en los macrófagos placentarios (células de Hofbauer), trofoblastos y células endoteliales fetales^{66,69}.

2.3 Lípidos y el ciclo viral de los flavivirus

Si bien los receptores celulares son de suma importancia para la entrada viral, existen otros factores celulares necesarios para el establecimiento de la infección en la célula blanco. Específicamente en flavivirus, se ha documentado la importancia del metabolismo de los lípidos celulares durante su ciclo viral (Figura 12).

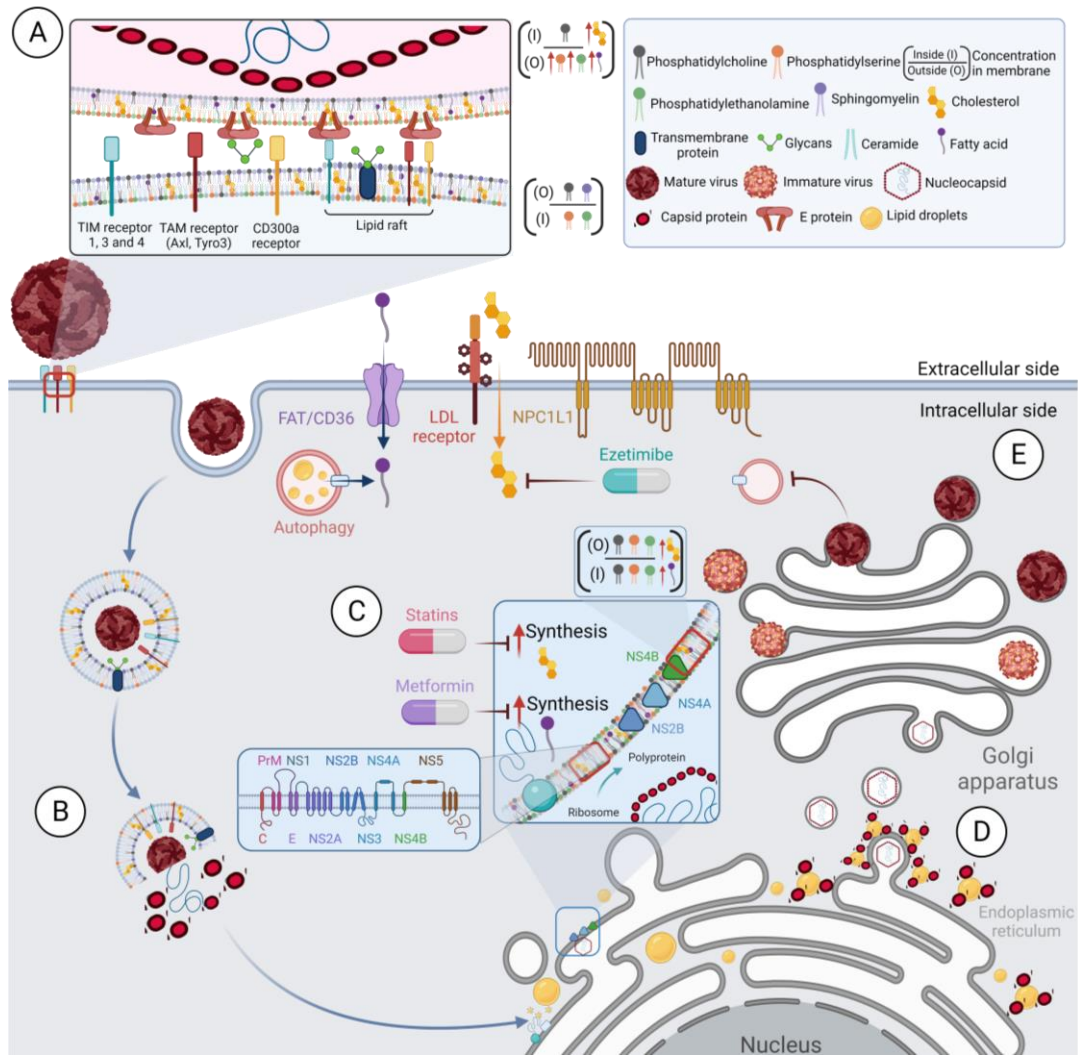


Figura 12. Lípidos y el ciclo viral de los flavivirus A) Las membranas de los flavivirus muestran una composición diferente a la de otras membranas celulares. Los estudios lipidómicos, computacionales y funcionales sugieren que las membranas de los flavivirus están enriquecidas con glicerofosfolípidos, esfingolípidos, ácidos grasos y colesterol, dándole estabilidad y robustez al virión. Lípidos como la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina participan en los procesos de unión, entrada y fusión viral. Durante la entrada viral, se requiere el contacto receptores celulares que suelen estar acoplados a balsas lipídicas enriquecidas con colesterol y otros lípidos estabilizadores de la membrana. B) La liberación del genoma viral se produce en las endosomas tardíos utilizando lípidos específicos de cada compartimento. C) El ARN viral se traduce en una poliproteína en el RE. La reprogramación metabólica inducida por la infección conduce a la acumulación de los lípidos necesarios para la replicación viral que promueve evaginaciones del RE para la formación de los CRs que funcionan como plataformas de traducción, replicación y morfogénesis viral. D) Se ha informado la participación de las gotas de lípidos (LD) durante la replicación y el ensamblaje viral del WNV, DENV, JEV y ZIKV. E) Finalmente, las partículas virales inmaduras viajan a través del aparato de Golgi para completar su proceso de maduración (Tomada de Farfan-Morales et al. 2021⁷²)

2.3.1 Entrada en flavivirus

2.3.1.1 Composición de la membrana viral

Aunque los lípidos son el componente más abundante de la partícula flaviviral, con aproximadamente ~8000 moléculas de lípidos⁷³, la composición y la bioquímica de la envoltura viral han sido poco exploradas en comparación con otros componentes. En general, las membranas de los virus con envoltura muestran una composición diferente a la de otras membranas celulares⁷⁴⁻⁷⁷. Actualmente, no existen análisis lipidómicos de la envoltura viral del ZIKV y el DENV; sin embargo, la mayor parte de las pruebas sobre la composición de la membrana de los flavivirus proviene del Virus del Nilo Occidental (VNO)⁷⁸. La envoltura del VNO presenta un aumento significativo del contenido de glicerofosfolípidos (fosfatidilcolina, plasmalógenos y lisofosfolípidos) y esfingolípidos (ceramida, dihidroceramida y esfingomielina). Además, estudios con otros virus de la misma familia, como el virus de la hepatitis C (VHC) y el virus de la diarrea viral bovina (VDVB), han reportado enriquecimiento de las membranas virales con esfingolípidos y colesterol, sugiriendo que estas moléculas podrían tener un papel relevante en la membrana viral^{77,79,80}. Considerando que los flavivirus adquieren su membrana secuestrando fragmentos del RE, dicho enriquecimiento sugiere provenir a partir de las modificaciones metabólicas de las células infectadas, tal como fue reportado por Reddy y colaboradores (2016) durante el análisis de la envoltura viral del DENV, haciendo uso de un modelo computacional a partir de datos lipidómicos de células C6/36 infectadas^{73,81}.

Este estudio reveló que los glicerofosfolípidos, los esfingolípidos y los ácidos grasos son componentes clave de la envoltura del DENV que podrían conferir estabilidad y robustez al virión⁷³. Además, se ha descrito que lípidos como fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina enriquecidos en la membrana están involucrados en los procesos de unión, entrada y fusión viral (Figura 12A,B)^{78,82,83}. Sin embargo, el papel de los esteroides en la envoltura viral no se analizó

en los estudios citados. Las pruebas de que el colesterol es un componente de la envoltura de los flavivirus provienen de ensayos funcionales⁸²⁻⁸⁴ donde se ha documentado que la cantidad de esteroides en los viriones del DENV es crítica, ya que la reducción⁸⁴ y la saturación⁸⁵ del contenido de colesterol en la membrana viral da lugar a una pérdida de infectividad, similar a lo reportado con el virus de la gripe⁸⁶.

2.3.1.2 Unión e internalización del virus

Como se describió anteriormente (Sección 2.2, receptores y tropismos de DENV y ZIKV), el primer paso en el ciclo replicativo viral es la unión del virión a la superficie celular a través de uno o más receptores que se han propuesto para los flavivirus. Algunos receptores pueden interactuar con lípidos y promover la entrada viral por diferentes mecanismos⁸⁷⁻⁹¹. Los receptores TIM (1, 3, y 4)^{82,83,90,92}, TAM (Axl y Tyro3)^{82,92,93}, y los receptores CD300a⁹⁴ podrían unirse a la fosfatidilserina (PS) y la fosfatidiletanolamina (PE) de la envoltura de los flavivirus y contribuir a la internalización viral (Figura 12A), promoviendo su entrada como cuerpos apoptóticos en un proceso conocido como mimetismo apoptótico^{82,88}.

Por otra parte, la participación del colesterol durante la entrada viral se ha relacionado con las balsas lipídicas y los microdominios (Figura 12A). Las balsas lipídicas son microdominios moleculares localizados en la membrana plasmática, que consisten en asociaciones estables entre esfingolípidos, glicolípidos y colesterol. Desempeñan un papel crucial en procesos celulares como la transducción de señales y el tráfico de proteínas de membrana⁹⁵. Estos microdominios proporcionan un entorno adecuado para agrupar los receptores de flavivirus en la célula huésped y funcionan como plataformas para la transducción de señales celulares⁹⁶⁻⁹⁹. Curiosamente, los requisitos de colesterol para la formación de balsas lipídicas y microdominios parecen depender del tipo de célula durante la infección por el DENV^{84,85,100-103}. En general, las balsas lipídicas son esenciales durante la entrada del DENV

85,96,98,103,104 y del WNV¹⁰⁵, mientras que para el ZIKV se desconoce su relevancia.

2.3.2 Fusión de la membrana viral y liberación del genoma

Tras la adhesión e internalización de la partícula, el genoma debe ser liberado al citoplasma mediante la fusión de la membrana viral con la de los endosomas tardíos, inducida por el pH bajo de los endosomas (Figura 12B)¹⁰⁶. Se ha documentado que el DENV¹⁰⁷ y otros flavivirus¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ aseguran su fusión en los endosomas tardíos utilizando lípidos específicos.

Debido a la complejidad del proceso, las membranas artificiales han sido una herramienta fundamental para estudiar la importancia de la composición lipídica durante el proceso de fusión. Por ejemplo, SW Gollins y JS Porterfield (1986) demostraron que la composición lipídica de los liposomas influye tanto en el pH óptimo para la fusión como en el grado máximo de fusión¹¹⁰. También se ha demostrado que la fusión viral puede producirse incluso con membranas artificiales libres de receptores compuestas por fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, y la eliminación de estos lípidos, incluido el colesterol, reduce la fusión viral^{78,110}.

En cuanto al papel del colesterol en la fusión de membranas, algunos autores señalan que la presencia de colesterol en la membrana diana es requerida^{111,112}, y otros sugieren que esta molécula no es relevante durante este proceso, y por el contrario, la adición de colesterol a las células puede incluso reducir la infección por flavivirus^{85,113}. Aunque se necesitan más estudios para determinar el papel del colesterol durante el proceso de fusión, está claro que la composición lipídica de las membranas virales es relevante para los procesos fusión viral.

2.3.3 Replicación de los flavivirus

2.3.3.1 Reordenamientos estructurales del RE

Una vez que el ARN viral se libera en el citoplasma de la célula huésped, actúa como un ARNm que se traduce en una poliproteína, la cual se somete a un corte proteolítico por parte de las proteasas virales y del huésped para producir diez proteínas maduras. Las proteínas recién sintetizadas se anclan al RE, que funciona como plataforma para la traducción, replicación y morfogénesis viral^{114,115}. En este punto la interacción entre las proteínas virales y los lípidos celulares es esencial para formar los CRs¹¹⁶. Sin embargo, la remodelación de las membranas se ha asociado principalmente a la expresión de NS2B, NS4A y NS4B (Figura 12C)¹¹⁷⁻¹¹⁹. En consecuencia, mientras se produce la traducción y la replicación viral, la membrana del RE se remodela y experimenta un considerable agrandamiento con la aparición de estructuras similares a organelos. Estas estructuras funcionan como fábricas de replicación viral¹²⁰⁻¹²⁴.

Algunos de estos reordenamientos de la membrana pueden cambiar entre flavivirus y entre tipos de células^{121,122,124,125}. Sin embargo, existe una notable similitud en la remodelación de las membranas intracelulares causada por los flavivirus. Las principales estructuras de los CRs son las vesículas de doble membrana inducidas por flavivirus (Ve), en donde se ha reportado la localización de las proteínas NS1, NS3, NS5 y la molécula ssRNA, sugiriendo que la replicación del ARN se produce dentro de estos compartimentos^{120,122,124}.

2.3.3.2 Alteraciones en la composición lipídica del RE

Las estructuras de membrana resultantes de la replicación viral presentan una composición lipídica específica responsable de la topología de la membrana en los CR (Figura 12C). Los análisis muestran que ciertos lípidos celulares se modifican en las células infectadas por flavivirus en comparación con las no

infectadas^{81,116,117,126,127}. Por ejemplo, la infección por el DENV altera aproximadamente el 15% de los lípidos celulares en los cultivos de células de mosquito C6/36, así como en las células del intestino medio de los mosquitos infectados por el DENV^{81,116}.

Estas modificaciones se concentran en las fracciones de membrana asociadas a la replicación, donde el 85% de las especies de lípidos fueron significativamente modificadas en comparación con las membranas de las células no infectadas⁸¹. Se ha descrito que los lipidómas de células C6/36¹²⁷, de células de placenta fetal¹²⁶ y de diferentes líneas celulares humanas¹¹⁷, se han alterado durante la infección por el ZIKV. Al igual que el DENV, el ZIKV perturbó el perfil de fosfolípidos e indujo un aumento de fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas y fosfatidilserinas en las células de los mosquitos^{81,127}. Dichas alteraciones también se mantuvieron en las células de la placenta, donde también aumentó el fosfatidilinositol¹²⁶. Además, se encontraron niveles elevados de esfingolípidos en células C6/36 infectadas¹²⁷ y en líneas celulares humanas¹¹⁷.

En particular, el enriquecimiento de glicerofosfolípidos y esfingolípidos persiste en DENV¹¹⁶ y WNV⁷⁸, lo que sugiere que estos cambios podrían mantenerse en las infecciones por flavivirus. Sin embargo, los análisis comparativos de las placentas infectadas por el ZIKV no revelaron alteraciones en las subespecies de ceramidas o esfingolípidos¹²⁶. Por lo tanto, los requisitos de esfingolípidos durante la infección por el ZIKV podrían ser variables dependiendo del tipo de célula.

En cuanto al colesterol, un estudio lipidómico de los intestinos de los mosquitos infectados por el DENV mostró que, de las 111 moléculas de esteroides analizados, 25 mostraban niveles diferentes de abundancia en comparación con los controles. De ellas, veintiuna moléculas aumentaron y cuatro disminuyeron durante la infección. La mayoría de los cambios (10 moléculas) se produjeron en el tercer día post-infección, durante la infección temprana, y en el séptimo día post-infección (14 moléculas), un período de alta actividad

de replicación en el intestino medio del mosquito. Solo una molécula mostró cambios significativos (disminuyó) el día 11 post-infección, un periodo en el que hay una alta actividad de replicación en las glándulas salivales y otros tejidos en comparación con el intestino medio¹¹⁶. Teniendo en cuenta que los esteroides del mosquito provienen de la dieta, sería interesante comparar el enriquecimiento de esteroides en el lipídoma de las células humanas y del mosquito en diferentes momentos de la infección por DENV.

Hasta donde sabemos, no existen otros estudios lipidómicos con el DENV y el ZIKV en los que se analice el contenido de esteroides y metabolitos relacionados. Sin embargo, se ha informado del aumento del colesterol en las células Huh-7 causado por la infección por el DENV en comparación con las células no infectadas¹⁰³. El enriquecimiento se concentró en los sitios de replicación del DENV, y también fue evidente en las primeras horas de la infección. En conjunto los ensayos *in vitro*¹⁰³ e *in vivo*¹¹⁶ (modelo de mosquito), sugieren que el colesterol es necesario durante las primeras etapas de infección y durante la replicación del DENV.

Por otra parte, el ZIKV también provoca varias adaptaciones en el metabolismo de los lípidos de la placenta, incluido el aumento de los lípidos neutros: colesterol, diacilglicéridos y triacilglicéridos. La reprogramación metabólica, en consecuencia, desencadenó la biogénesis de gotas lipídicas enriquecidas en colesterol y la reorganización de la membrana intracelular para la replicación viral¹²⁶.

En conjunto, toda esta evidencia sugieren que el enriquecimiento de colesterol y otros lípidos en las células infectadas es necesario durante las infecciones por flavivirus^{102,103,128}; sin embargo, todavía se está estudiando cómo contribuye cada lípido a la replicación viral¹²⁹.

Se cree que el enriquecimiento de esfingolípidos, como la ceramida, durante las infecciones por flavivirus, es importante para la topología de la membrana^{129,130}, la gemación viral¹³¹⁻¹³⁴, y la arquitectura del virión^{73,78}.

Los fosfolípidos podrían estar implicados en la fluidez y curvatura de la membrana^{135,136}, mientras que el colesterol junto con la ceramida podrían dar lugar a la formación de microdominios en las membranas asociadas a la replicación del RE¹³⁷⁻¹⁴⁰, funcionando como plataformas para proteínas virales¹⁰⁴.

2.3.4 Ensamblaje de los flavivirus

Los procesos de replicación y ensamblaje virales están íntimamente ligados; las partículas virales se producen por la gemación de las nucleocápsides (proteína C asociada al ARN genómico saliente) asociadas a membranas derivadas del RE que contienen proteínas prM y E. Las principales proteínas virales implicadas en el ensamblaje del virión son la NS2A y la proteína de la cápside (C)¹⁴¹⁻¹⁴⁵.

Se ha informado la participación de las gotas de lípidos (LD) durante la replicación y el ensamblaje viral (Figura 12D)¹⁴¹. Las LDs son estructuras celulares que sirven como depósito de colesterol y otros lípidos para la formación y mantenimiento de la membrana^{146,147}. Estos organelos están compuestos por un núcleo lipídico neutro rodeado por una monocapa de fosfolípidos; por lo tanto, pueden prevenir la lipotoxicidad celular convirtiendo el exceso de ácidos grasos en lípidos neutros para su almacenamiento¹⁴⁸. Recientemente han surgido otras funciones de las LD, como evitar el daño mitocondrial durante la autofagia¹⁴⁹ y su participación en las respuestas inmunitarias¹⁵⁰.

Durante la infección por flavivirus, funcionan como sitios de reclutamiento de proteínas tanto celulares como virales. Por ejemplo, se ha descrito que la proteína NS3 del DENV interactúa con la proteína Rab18, una pequeña GTPasa implicada en el tráfico de vesículas en los LDs para reclutar la enzima sintasa de ácidos grasos (FASN) a los sitios de replicación del DENV y promover la biosíntesis de ácidos grasos¹⁵¹.

También se ha descrito la co-localización e interacción de la proteína C con los LDs durante la infección por WNV, DENV, JEV y ZIKV (Figura 12D)^{141,143,152–157}. En este sentido, la disociación de la proteína C de los LDs inhibe la producción de partículas infecciosas del DENV, pero no la replicación del ARN¹⁵²; por lo tanto, se ha sugerido que los LD funcionan como andamios para la encapsulación del genoma viral¹⁴¹.

Además, los flavivirus pueden utilizar los lípidos de los LDs a través de la lipofagia¹⁵⁸ y la reabsorción de estos orgánulos¹²³. Virus como el DENV^{141,159}, el ZIKV¹²⁶ y el HCV¹⁶⁰ manipulan la biogénesis de los LDs para promover la replicación del genoma viral y la producción de viriones¹⁶¹.

En cuanto al ZIKV, hay posiciones diferentes; este virus induce grandes cantidades de LDs en las células infectadas y estas LDs están enredadas y se acumulan alrededor de los focos infectados dentro de las vellosidades placentarias infectadas para promover la replicación del genoma viral¹²⁶. Sin embargo, también se ha informado de una disminución del número y el volumen de los LDs en las células Huh-7 infectadas por el ZIKV¹⁶². Por lo tanto, el papel de los LDs durante la infección por el ZIKV debería estudiarse más a fondo.

2.4 Vías metabólicas como objetivos terapéuticos

Con todo lo anterior podemos concluir que los flavivirus requieren un microambiente lipídico favorable que aporte los recursos necesarios para crear sus plataformas de replicación y adquirir su envoltura viral con propiedades únicas. Considerando que lípidos como el colesterol y los ácidos grasos son indispensables durante su ciclo de replicación, era de esperarse que estos virus, además, puedan alterar ciertas vías metabólicas para promover un microambiente lipídico enriquecido¹⁶³.

2.4.1 Alteración de la biosíntesis de ácidos grasos por flavivirus

La biogénesis de ácidos grasos parece ser una importante diana terapéutica contra los flavivirus, ya que es necesaria para sintetizar lípidos complejos como los que se enriquecen durante las infecciones virales^{78,81,116,117,126,127}. Hay dos enzimas clave para la generación de ácidos grasos, la acetil-CoA carboxilasa (ACC), la enzima limitante en la biosíntesis de lípidos, y la sintasa de ácidos grasos (FASN). La ACC cataliza inicialmente la carboxilación del acetil Coenzima A a malonil-CoA¹⁶⁴. En pasos posteriores, FASN cataliza la síntesis de acetil-CoA palmitato y malonil-CoA en ácidos grasos saturados de cadena larga¹⁶⁵. Se ha documentado que el DENV regula positivamente la síntesis de ácidos grasos mediante la interacción de la proteína viral NS3 con la enzima FASN para redirigirla a los sitios de replicación viral y estimular su función (Figura 12C)¹⁶⁶. El ZIKV también aumenta la expresión de la FASN, la translocasa de ácidos grasos (FAT/CD36) y la diacilglicerol aciltransferasa 1 (DGAT1)¹²⁶. El transportador FAT/CD36 ayuda a la captación de ácidos grasos del entorno exógeno, y la DGAT1, residente en el RE, una enzima esencial para la biogénesis de los LDs, cataliza el último paso de la biosíntesis de triglicéridos.

Por el contrario, la inhibición de ACC¹⁶⁷ o FASN^{81,166,168,169} reduce la infección por flavivirus. Además de los ácidos grasos, la síntesis de lípidos complejos, como los esfingolípidos, también es necesaria durante las infecciones por ZIKV, DENV y WNV^{78,116,117,127,170}. El metabolismo de los esfingolípidos consiste en una compleja red de numerosas enzimas que están interconectadas y reguladas a diferentes niveles. Sin embargo, en el centro del metabolismo de los esfingolípidos residen las ceramidas sintasas (CerSs), un grupo de enzimas que catalizan la formación de ceramidas, los precursores de los esfingolípidos¹⁷¹.

Durante la infección por el ZIKV, se ha documentado un marcado aumento de los niveles de ceramida por múltiples vías, que se redistribuye a los sitios de replicación y sensibiliza a las células para la infección¹¹⁷. Por el contrario, la

reducción de la biosíntesis de ceramida mediante la inhibición de CerS, y de la enzima descendente serina palmitoiltransferasa (SPTLC), puede inhibir la infección por ZIKV y WNV^{117,172}. Sin embargo, las placentas infectadas por el ZIKV no revelaron ninguna alteración en la ceramida o en las subespecies de esfingolípidos¹²⁶, lo que podría sugerir que los requisitos de ceramida durante la infección por el ZIKV podrían variar en diferentes tipos de células.

Las ceramidas también están enriquecidas en las membranas asociadas a la replicación del DENV⁸¹. Sin embargo, se ha informado de que el DENV es insensible a la interrupción de la ceramida^{173,174}; por el contrario, la inhibición de las enzimas CerS y SPTLC aumenta la replicación del DENV¹⁷². Estas observaciones sugieren que los diferentes flavivirus tienen un requisito diferencial de ceramida para la replicación¹⁷².

El catabolismo de esfingolípidos más complejos probablemente contribuye al aumento de lípidos; sin embargo, las pruebas sugieren que las infecciones por flavivirus aumentan la biosíntesis de esfingolípidos de novo^{78,81,117}. Por lo tanto, la inhibición de la biosíntesis de ácidos grasos podría ser ventajosa frente a la inhibición de los lípidos complejos necesarios para la replicación viral, como se ha descrito en las infecciones por el WNV¹⁶⁸, ya que estos últimos también contienen ácidos grasos como parte de su estructura.

2.4.2 Alteración de la biosíntesis del colesterol por flavivirus

La biosíntesis del colesterol se produce en el RE, pero el contenido de esteroides en este orgánulo es bajo debido a la compleja regulación de la síntesis y el transporte celular¹⁷⁵. A pesar de los mecanismos de regulación, se ha documentado la biogénesis activa y la acumulación de colesterol en los CRs del DENV (Figura 12C)^{81,102,103,128}. El aumento del colesterol en las células del hígado y en el intestino medio de los mosquitos en diferentes momentos de la infección por DENV sugiere una interacción dinámica entre el metabolismo de los lípidos de las células del huésped y la replicación viral^{103,116,176}. Se ha descrito que la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa

(HMGCR), una enzima clave en la vía del mevalonato que controla la tasa de biosíntesis del colesterol, se relocaliza a las membranas asociadas a la replicación viral y se sobreactiva durante la infección por DENV y WNV^{103,128}. Además, durante la infección por el DENV se ha notificado una regulación positiva de la mevalonato difosfodecarboxilasa (MVD), una enzima que participa en los pasos intermedios de la vía del mevalonato¹⁰².

Además, la biosíntesis de este lípido no es la única fuente de esteroides; el DENV también promueve la captación de colesterol exógeno al aumentar la expresión del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL)¹⁰³ y del receptor Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1)¹⁷⁷ en la superficie de las células hepáticas infectadas. En las células de los mosquitos, el DENV modifica la expresión de la proteína LRP-1 para impedir el eflujo celular de colesterol y promover así la acumulación de colesterol intracelular¹⁷⁸. Por lo tanto, la inhibición de las enzimas implicadas en la vía del mevalonato, como la HMGCR, la MVD, la escualeno sintasa (SQS) o la 7-dehidrocolesterol reductasa (DHCR-7), puede reducir la multiplicación del flavivirus^{102,103,117,123,128,179,180}. Además, la inhibición de la importación de colesterol y del tráfico intracelular también ha demostrado ser eficaz para inhibir la infección por el DENV^{103,177}. En general, estas pruebas demuestran que la vía del mevalonato ofrece una amplia gama de posibles objetivos terapéuticos dirigidos al huésped para tratar las infecciones por flavivirus.

2.5 Fármacos hipolipemiantes como candidatos anti-flavivirus.

La falta de una vacuna o un fármaco para tratar las enfermedades por flavivirus ha llevado a la comunidad científica a una búsqueda exhaustiva de fármacos con efecto anti-flavivirus. Existen dos tipos de fármacos antivirales: los antivirales dirigidos a componentes virales; y los antivirales dirigidos al huésped que inhiben moléculas celulares clave que contribuyen al ciclo replicativo de los virus¹⁸¹⁻¹⁸³. Los fármacos que interfieren en diferentes vías metabólicas para la síntesis de lípidos pertenecen a este último grupo e

inhiben eficazmente las infecciones por flavivirus. Por ejemplo, los fármacos que inhiben la enzima que cataliza la conversión de esfingomielina en ceramida, como GW4869, pueden inhibir la infección por ZIKV ¹⁸⁴; los inhibidores de moléculas pequeñas de ACC (PF-05175157, PF-05206574 y PF-06256254) pueden contrarrestar la infección por ZIKV, DENV y WNV ¹⁸⁵; y los inhibidores de la síntesis, captación y transporte de colesterol también tienen un efecto anti-flavivirus¹⁶³. Curiosamente, en este último grupo se encuentran fármacos aprobados por la FDA como la imipramina (IMI), la ezetimiba (EZE) y las estatinas (STA). La imipramina, un antidepresivo, inhibe el ZIKV, el DENV y el WNV al interferir con el transporte intracelular de colesterol¹⁸⁶; el EZE inhibe la infección por el DENV al bloquear el transportador de colesterol NPC1L1¹⁷⁷, y las STA han demostrado tener un amplio espectro anti-flavivirus al inhibir directamente la enzima HMGCR responsable de la síntesis de colesterol de Novo ^{176,180}.

Otro grupo de fármacos son aquellos que pueden interferir tanto la síntesis de ácidos grasos como la síntesis de colesterol, los cuales han demostrado una fuerte actividad anti-flavivirus. Un claro ejemplo son los inhibidores de SREBP, como el ácido nordihidroguayarático (ANDG) y su derivado ácido tetra-O-metil nordihidroguayarático, que pueden inhibir al DENV, al ZIKV y al WNV, además del VHC, sugiriendo que la vía de SREBP es un blanco terapéutico¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Asimismo, los activadores de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), como PF-06409577, AICAR, y la Metformina (MET), han mostrado ser eficaces contra el DENV, el ZIKV y el WNV en ensayos *in vitro* ^{176,190,191}. Dentro de este último grupo, la MET es otro fármaco aprobado por la FDA con un amplio y prometedor espectro antiviral ⁷².

III JUSTIFICACIÓN

A falta de una vacuna eficaz para combatir infecciones causadas por el ZIKV y el DENV, la búsqueda de nuevas estrategias que ayuden a combatir dichas infecciones es imprescindible. Debido a que el ciclo viral de los flavivirus está estrechamente ligado al metabolismo de lípidos celular, investigadores han propuesto el uso de fármacos hipolipemiantes con efecto antiviral para tratar dichas enfermedades. La metformina, un fármaco aprobado por la FDA utilizado para tratar la diabetes tipo II, ha mostrado tener propiedades antivirales. Estudios *in vitro* realizados en nuestro laboratorio han reportado el efecto anti-DENV de la metformina, sin embargo, poco se sabe de su eficacia en modelos *in vivo* y de su efecto sobre otros flavivirus. Solo un estudio retrospectivo ha sugerido menor riesgo de adquirir DENV grave en pacientes diabéticos que controlan su enfermedad con metformina. Por lo tanto, éste trabajo tiene por objetivo estudiar la eficacia antiviral de la metformina sobre las infecciones causada por el ZIKV y el DENV en modelos *in vitro* e *in vivo*.

IV HIPÓTESIS

La metformina es capaz de reducir eficazmente las infecciones causadas por el ZIKV y el DENV *in vitro* e *in vivo*, indicando que este medicamento es seguro para tratar infecciones causadas por flavivirus.

V OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Estudiar el efecto del tratamiento de la metformina durante la infección con ZIKV y DENV *in vitro* e *in vivo*.

5.2 Objetivos específicos

- Estudiar la eficacia anti-ZIKV de la Metformina en dos modelos *in vitro*, células de linaje neuronal y hepático.
- Evaluar la eficacia anti-flaviviral de la Metformina *in vitro*.
- Caracterizar la enfermedad del ZIKV y DENV en el modelo animal “AG129”, ratones inmunodeficientes en IFN- α/β y - γ .
- Evaluar el efecto antiviral del tratamiento con metformina en ratones AG129 infectados con ZIKV y DENV.

VI MÉTODOS

6.1 Cultivos celulares

Para evaluar el efecto anti-ZIKV de la Metformina, se utilizaron dos diferentes líneas celulares susceptibles a la infección por ZIKV:

6.1.1 Células Huh-7 (Hepatocarcinoma humano)

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

6.1.2 Células U-87 (Glioblastoma humano)

Células U-87 se cultivaron en placas de 12 pozos con medio DMEM Advanced (SIGMA) suplementado con glutamina al 2 mM, SFB al 10%, penicilina (104 U/ml) y estreptomycin (50 μ g/ml), 1 mL/L de anfotericina B (Fungizona) a 37 °C con 5% de CO₂ atmosférico.

6.2 Virus

La propagación del ZIKV (MEX_CIENI551, amablemente facilitado por el Dr. Jesús Torres, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional) y del DENV2 (cepa del serotipo 2 de Nueva Guinea) se realizó en cerebros de ratones lactantes CD1 facilitados por la Unidad de Producción y experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL). La propagación del YFV 17D (vacuna viva atenuada) se realizó en células C6/36 de *Aedes albopictus* adaptadas para crecer a 35 °C¹⁹².

Los títulos del DENV y del ZIKV se determinaron mediante el ensayo de unidades formadoras de focos (FFU) en células Huh-7 (sección 6.8), mientras que los títulos del YFV se realizaron con ensayos de unidades formadoras de placas (PFU)¹⁹³. Los cerebros de ratones CD1 recién nacidos sin infectar o el medio completo para las células C6/36, fueron utilizados como control (Mock).

6.3 Fármacos:

MET y LOV se obtuvieron de Abcam Biochemicals (número de catálogo ab120847 y ab120614, respectivamente). MET se disolvió en agua para preparar una solución madre a 100mM. LOV se disolvió en DMSO para preparar una solución madre a 50µM.

6.4 Ensayos de citotoxicidad

Para evaluar la citotoxicidad de la MET y calcular la concentración citotóxica que causa el 50% de muerte celular (CC50), las células huh-7 y U-87 fueron tratadas con vehículo o con concentraciones crecientes de MET (0, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 12 5, 15, 20 y 25 mM) por 24 horas. Al término de este tiempo la citotoxicidad se midió a través de un ensayo colorimétrico (ROCHE 11 465 007 001) basado en el método MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difenil tetrazolio), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (BioTek ELx800) midiendo la absorbancia a 540 nm. La misma metodología se utilizó para calcular la CC50 de la LOV utilizando las siguientes concentraciones: CC50= 15, 25, 35, 75, 100, 150, 200 y 400 µM. Los resultados fueron analizados y graficados

utilizando el software Graph Pad Prism (versión 6.0), estimando el valor de la CC50 mediante un análisis de regresión lineal.

6.5 Infección y tratamiento con MET

Las líneas celulares se sembraron en formato de placa de 12 pocillos ($5,68 \times 10^5$ Células) o de 24 pocillos ($2,72 \times 10^4$ Células) al 70-80% de confluencia. Se infectaron con el ZIKV, o el YFV, o el DENV a una multiplicidad de infección (MOI) de 5, en medio suplementado con 1% de SFB durante dos horas a 37 °C. Esto para permitir la adsorción y la entrada viral. Posteriormente, las células se lavaron tres veces con HANKS (Gibco) y se trataron con el fármaco. El fármaco se diluyó en medio completo para obtener la concentración deseada. Las células infectadas se incubaron con el fármaco durante 24 horas a 37 °C. Agua estéril y DMSO fueron utilizados en los controles de infección como vehículo de la MET y la LOV, respectivamente. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado para cada ensayo.

6.6 Concentración de inhibición viral al 50% (IC50)

Células infectadas con el ZIKV o el DENV fueron tratadas con vehículo o con concentraciones crecientes de MET por un periodo de 24 horas: 0, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20 y 25 mM. Para el cálculo de la IC50 de la LOV se utilizaron las siguientes concentraciones: 1, 6, 12, 18, 25, 35, 50, 75, 100, 150, 200 μ M. Posteriormente, las células fueron analizadas por citometría de flujo y los resultados fueron graficados con el software Graph Pad Prism (versión 6.0) para estimar el valor de la IC50 mediante un análisis de regresión lineal.

6.7 Citometría de flujo

El porcentaje de infección para cada línea celular se determinó mediante citometría de Flujo. Al término de cada ensayo, las células cultivadas en placas de 12 pozos fueron recuperadas en tubos eppendorf de 1.5 mL y lavadas con PBS. Este último paso se realizó consecutivamente al término de cada procedimiento. Las células fueron fijadas con Paraformaldehído al 2% por 20

minutos y posteriormente fueron bloqueadas con solución permeabilizadora (saponina al 0.2% y 1% SFB) durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA). Para marcar la infección se utilizó el anticuerpo primario 4G2 (ratón) (Millipore) diluido 1:200 en solución permeabilizadora, incubando toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se retiró el exceso de 4G2 y se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488 anti-ratón (Life technologies) diluido 1:1000 en solución permeabilizadora durante 2 horas a TA. El conteo celular se realizó en el citómetro de flujo CytoFLEX con el filtro (B525-FITC) considerando diez mil eventos para cada muestra. El análisis del porcentaje de infección se realizó en el programa FlowJo (vX 0.7).

6.8 Ensayo de focos

El rendimiento viral se cuantificó por medio de ensayos de focos. Brevemente, se realizaron diluciones seriadas con 135 µL de medio Hanks y 15 µL del sobrenadante problema. Células Huh-7, en placas de 96 pozos, se infectaron con 50 µL de cada dilución por duplicado, incubando por 2 hrs a 37 °C. Posteriormente, se colocó 150 µL de medio completo por un periodo de incubación de 48 horas a 37 °C. Al término de este tiempo, las células se lavaron con PBS y se fijaron con PFA al 2 % por 20 minutos a TA. Las células se permeabilizaron y bloquearon con 50 µL de solución permeabilizadora (saponina al 0.2 % y 1 % SFB) durante 20 minutos a TA. El anticuerpo primario 4G2-raton (1:200) y el anticuerpo secundario anti-ratón Alexa 488 (1:1000), se utilizaron para revelar los focos en un microscopio de Epifluorescencia.

6.9 Microscopía confocal

Las células infectadas no tratadas y tratadas se crecieron en cubreobjetos en placas de 24 pozos. Al término de cada ensayo fueron lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído al 2% (PFA) durante 20 minutos a 4°C. Los lavados con PBS se realizaron al término de cada procedimiento. Se bloquearon con solución permeabilizadora (saponina al 0.02 % y 1 % SFB) durante 20 minutos a TA. Para detectar la infección se incubó con el anticuerpo

primario 4G2-ratón (1:200) toda la noche. El anticuerpo policlonal de conejo antiNS4A (GENETEX) fue utilizado para determinar la colocalización de las proteínas virales en los complejos de replicación. Posteriormente, se incubaron por 2 horas con el anticuerpo secundario anti-ratón Alexa 488 (1:1000) y un anti-conejo de cabra Alexa Flour 555 (1:1000) (Life Technologies) diluidos en solución permeabilizadora. Los núcleos se contratiñeron con Hoechst 33342 (Life Technologies). Después de 5 lavados con PBS los cubre objetos se montaron sobre portaobjetos con 4 μ L de Vectashield. Las células infectadas se observaron en un microscopio confocal láser Zeiss LSM700 para determinar los ratios de colocalización entre las proteínas virales, y las imágenes se analizaron con el software ZEN (v 2.3) 2010. Tres experimentos independientes por duplicados fueron analizados.

6.10 Western Blot

Las células se infectaron con ZIKV o DENV a una MOI de 5 y se trataron con MET (0, 1, 7,5 y 15 mM) durante 24 h. Posteriormente, se obtuvieron lisados celulares con tampón RIPA y se utilizaron 35 μ g de extracto proteico para los ensayos de Western blot siguiendo la metodología previamente reportada por De Jesús-González et al. (2020)¹⁹⁴. Se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo anti-NS3 (GTX124252) para detectar la infección por el ZIKV y el DENV, y como anticuerpo secundario se utilizó el anti-conejo HRP (Cell Signaling). Los anticuerpos anti-GAPDH de conejo y anti-Tubulina (Cell Signaling) se utilizaron como control de carga. Las proteínas se detectaron utilizando el sustrato quimioluminiscente Super Signal West Femto (Thermo Scientific). Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado. El análisis densitométrico se realizó con el software myImageAnalysis (Thermo Fisher Scientific, Illinois, EE.UU.), y los resultados se representaron con el software Graph Pad Prism versión 6.0.

6.11 Microscopía electrónica de transmisión

Las células Huh-7 no infectadas, infectadas sin tratar y tratadas con MET se incubaron durante 48 horas y se procesaron utilizando la metodología previamente comunicada por Reyes Ruiz et al. (2019)¹⁹⁵. La misma metodología fue utilizada para corroborar la presencia de los complejos replicativos en los tejidos de ratones AG129 infectados con DENV o ZIKV. Secciones delgadas (70 nm) se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se visualizaron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1011. Se realizaron dos experimentos independientes por duplicado.

6.12 Detección viral por RT-PCR

El RNA Total de ≈ 100 mg de tejido se extrajo utilizando Trizol (Invitrogen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El RNA se resuspendió en agua con DEPC con inhibidor de RNAsas. Posteriormente, el RNA fue tratado con DNAasa (New England BioLabs) utilizando 0.2 unidades por $1\mu\text{g}$ de RNA total, incubando a 37°C por 10 minutos e inactivando con EDTA $5\mu\text{M}$ a 70°C por 10 minutos. La síntesis de cDNA se realizó con $1\mu\text{g}$ de RNA total utilizando la enzima Improm II (Promega) y Random Primers, durante 1 ciclo de amplificación en las siguientes condiciones: 25°C durante 5 min, 42°C durante 60 min y 70°C durante 15 min (Veriti Thermal Cycler, Applied Biosystems). Finalmente, la amplificación por PCR en tiempo real se realizó mediante SYBR Fast universal (Kapa) utilizando el equipo Eco Illumina System a partir de $2\mu\text{l}$ (200ng) de cDNA para una reacción de 20 microlitros totales siguiendo las instrucciones del fabricante. Los primers para el virus ZIKV²⁷ y DENV¹⁹⁶ fueron los siguientes: ZFW CCGCTGCCCAACACAAG y ZRV CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT; D2F CAATATGCTGAAACGCGAGA y D2R TGCTGTTGGTGGGATTGTTA. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 2 min a 50°C , 2 Min a 95°C , 40 ciclos de 5 segundos a 95°C y 30 segundos a 55°C para DENV o 60°C para ZIKV. Para confirmar la ausencia de dímeros de cebadores, se realizó una

curva de disociación calentando los productos desde 55°C a 95°C. Para realizar la qRT-PCR de ZIKV se realizaron diluciones seriadas 1×10^{10} copias del un producto de PCR Punto final. Los resultados se expresaron en copias/ μg de RNA.

6.13 Ensayos de supervivencia en ratones AG129

Los ratones AG129 de 6 a 8 semanas de edad (Puestos a disposición amablemente por el Dr. Marco Antonio Meraz Ríos y la Auxiliar Ma. del Pilar Figueroa Corona del departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN-México), proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación Animal de Laboratorio (UPEAL) con el No de protocolo, 0305-19 fueron infectados con 2×10^7 FFU de ZIKV o 4×10^6 FFU de DENV por ratón. Los virus se inocularon por vía intraperitoneal en un volumen de 100 μL de agua inyectable. El grupo tratado con MET recibió 50mg/kg/día del fármaco, según la bibliografía¹⁹⁷, mediante una sonda oral. Los tratamientos comenzaron a partir del cuarto día post-infección durante diez días. El peso de los ratones y los signos de la enfermedad se observaron diariamente hasta el día de la eutanasia. Los signos de la enfermedad se basaron en un puntaje clínico reportado por Orozco et al. (2012)¹⁹⁸, el cual se modificó para ratones AG129 infectados por el ZIKV (Tabla 5). Se realizaron ensayos independientes de 4 ratones cada uno, sin equidad de género. Se excluyeron los ratones que murieron por causas distintas a la infección. Los resultados de supervivencia, la puntuación clínica y el peso de los ratones se trazaron y analizaron utilizando el software Graph Pad Prism versión 6.0.

6.13 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, los datos numéricos se expresaron con medias y desviaciones estándar (SD). Los resultados se normalizaron y se presentaron en porcentajes considerando el 100% de las células infectadas sin tratar. Para comparar las células tratadas y no tratadas, se realizó un análisis de la

varianza (ANOVA) utilizando las pruebas de comparaciones múltiples de Dunnett; para comparar los tratamientos entre ambos tipos de células, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) utilizando las pruebas de comparaciones múltiples de Sidak. Para comparar los grupos tratados y no tratados en microscopía confocal y electrónica se utilizó la prueba t de student. Para los ensayos *in vivo*, se trazaron las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, y se utilizó la prueba de Wilcoxon y la prueba de Mantel-Cox para comparar la supervivencia entre los grupos tratados y no tratados. Por último, para comparar las tasas medias de supervivencia entre los grupos tratados y no tratados, se utilizó la prueba ANOVA-LSD. En todos los casos, una $p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativa.

VII RESULTADOS

7.1 Células de linaje hepático (Huh-7) y neuronal (U-87), como modelos *in vitro* de infección para el ZIKV

Para determinar la eficacia infectiva del ZIKV en células Huh-7 (hepatocarcinoma) y en células U-87 (glioblastoma), ambas líneas celulares fueron infectadas a una multiplicidad de infección (MOI) de 1 y 5, bajo las mismas condiciones. Los resultados mostraron altos porcentajes de infección $\geq 50\%$ en ambas líneas celulares a una MOI de 5, y por un periodo de 24 horas (Figura 13). No hubo diferencias significativas de la eficacia infectiva del ZIKV entre líneas celulares infectadas con el mismo inóculo. Por consiguiente, todos los ensayos fueron realizados bajo estas mismas condiciones de infección, incluyendo el cálculo del índice de selectividad (IS) de MET y análisis de la eficacia de MET entre tipos celulares.

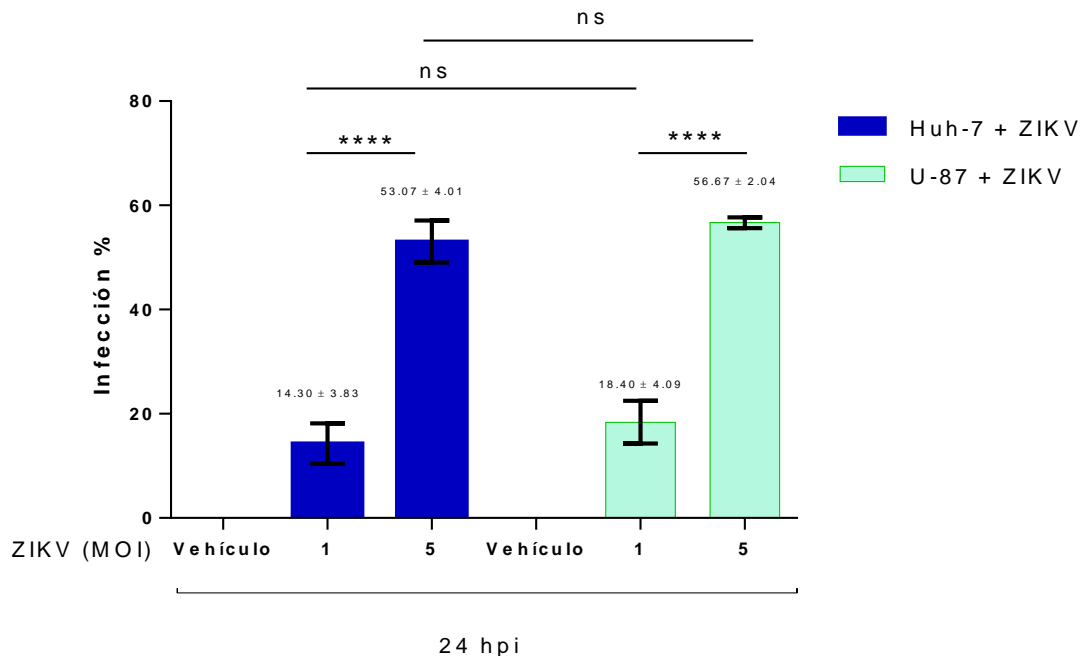


Figura 13. Eficacia infectiva del ZIKV *in vitro*. Porcentaje de células de hepatocarcinoma, Huh-7, y células de glioblastoma, U-87, infectadas con ZIKV a una MOI de 1 y 5 por 24 hrs. ****p < 0,0001.

7.2 Citotoxicidad de la MET en células de linaje hepático y neuronal

Para conocer las concentraciones citotóxicas de la MET, se evaluó la viabilidad de las células Huh-7 (Figura 14A) y U-87 (Figura 14C) tratadas con concentraciones crecientes de MET, mediante la técnica de MTT y según la norma internacional para pruebas de citotoxicidad *in vitro* (ISO 10993-5), que indica que la reducción de la viabilidad celular en más de un 30% se considera un efecto citotóxico¹⁹⁹. La concentración límite de MET fue de 35 mM y 20mM en células Huh-7 y U-87, respectivamente. Por encima de estas concentraciones la MET es altamente tóxica. Las concentraciones utilizadas en este trabajo fueron seleccionadas por debajo de la línea roja, que indica una viabilidad mayor al 80% (Figura 14A y C).

7.3 Calculo de la concentración citotóxica que causa el 50% de muerte celular (CC50)

Para determinar la eficacia de la MET para inhibir al ZIKV fue necesario calcular el índice de selectividad (SI, por sus siglas en ingles selectivity index) en un contexto de infección con el ZIKV. El SI es un valor que indica la relación entre la citotoxicidad de un fármaco y su eficacia para realizar su efecto biológico, en este caso su efecto anti-ZIKV. Para calcular el SI es necesario determinar la concentración citotóxica que causa el 50% de muerte celular (CC50) y la concentración que inhibe la infección viral al 50% (IC50).

La CC50 se calculó utilizaron concentraciones crecientes de MET en células Huh-7 y U-87. Como podemos ver en la Figura 14, el análisis de regresión lineal de las concentraciones crecientes de MET indica una toxicidad dosis dependiente. La CC50 de la MET fue similar en ambas líneas celulares, 32.9 mM en células Huh-7 (Figura 14B) y 33.43 en células U-87 (Figura 14D).

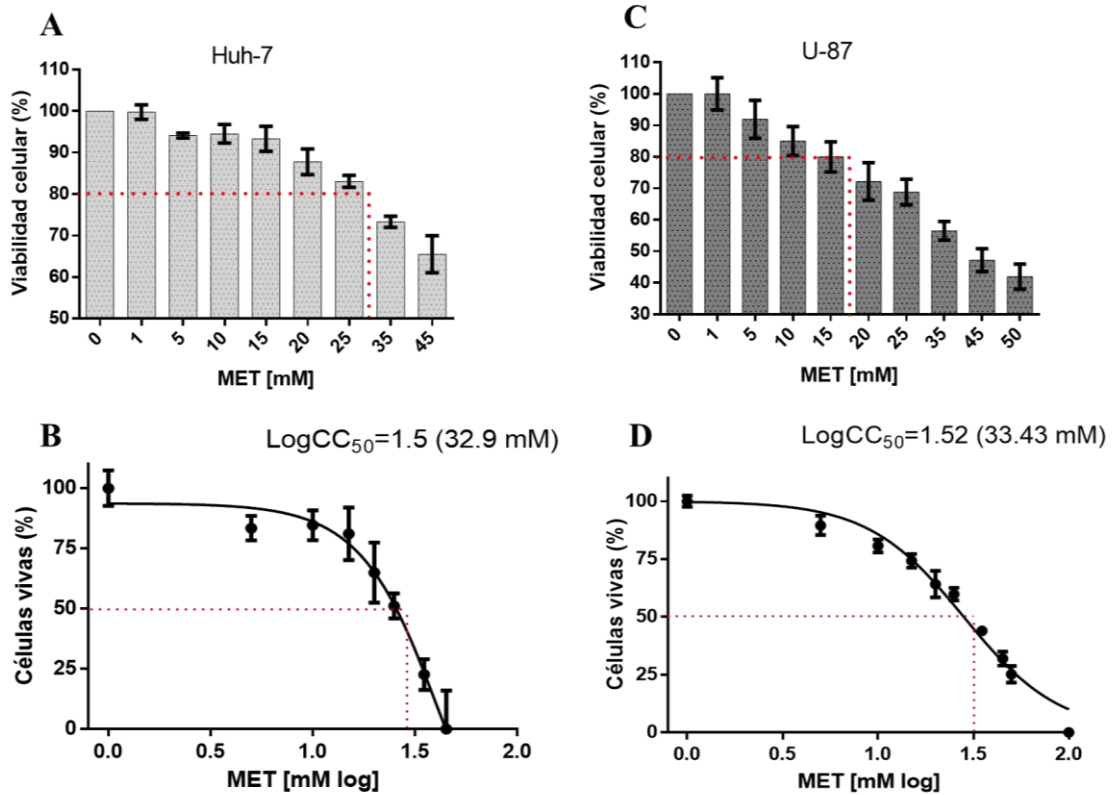


Figura 14. Citotoxicidad de la MET en células Huh-7 y U-87. Viabilidad de las células Huh-7 (A) y U-87 (C) tratadas con MET. Por debajo de la línea roja (80%) las concentraciones de MET no comprometen la viabilidad celular. (B) CC₅₀ de MET en células Huh-7 y (D) en células U-87. Utilizando como vehículo (H₂O) o concentraciones crecientes de MET (1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20 y 25 mM), la citotoxicidad se evaluó mediante la técnica de MTT a las 24 hrs. El valor de la CC₅₀ se estimó realizando un análisis de regresión lineal y los resultados se representaron con el software Graph Pad Prism versión 6.0.

7.4 La MET puede inhibir la infección del ZIKV, con mayor eficacia en células U-87 en comparación con Huh-7.

Posteriormente, se calculó la concentración de MET que inhibe la infección viral del ZIKV al 50% (IC₅₀) en ambas líneas celulares. Células Huh-7 y U-87 infectadas con ZIKV fueron tratadas con concentraciones creciente de MET (0, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 12 5, 15, 20 y 25 mM) por 24 horas. El porcentaje de células infectadas fue calculado por citometría de flujo. Los resultados muestran que la MET inhibió la infección por ZIKV en ambas líneas celulares de forma dependiente de la dosis con una IC₅₀ de 9,0 mM (IC del 95 %= 7,36 a 11,25

mM) en células Huh-7, y una IC₅₀ de 5,84 (IC del 95 % = 4,96 a 6,87 mM) en células U-87 (Figura 15A y B).

Esto indica que se requiere una menor concentración para alcanzar la IC₅₀ en las células U-87. El índice de selectividad (SI), basado en la relación de los CC₅₀/IC₅₀, citotoxicidad/efecto-antiviral, fue calculado para corroborar la eficacia antiviral de la MET en ambas líneas celulares. Los valores del SI calculados para la MET fueron 4.68 y 3.65, en células Huh-7 y U-87, respectivamente (Tabla 3). Los resultados confirmaron mayor eficacia anti-ZIKV de la MET en células de linaje neuronal.

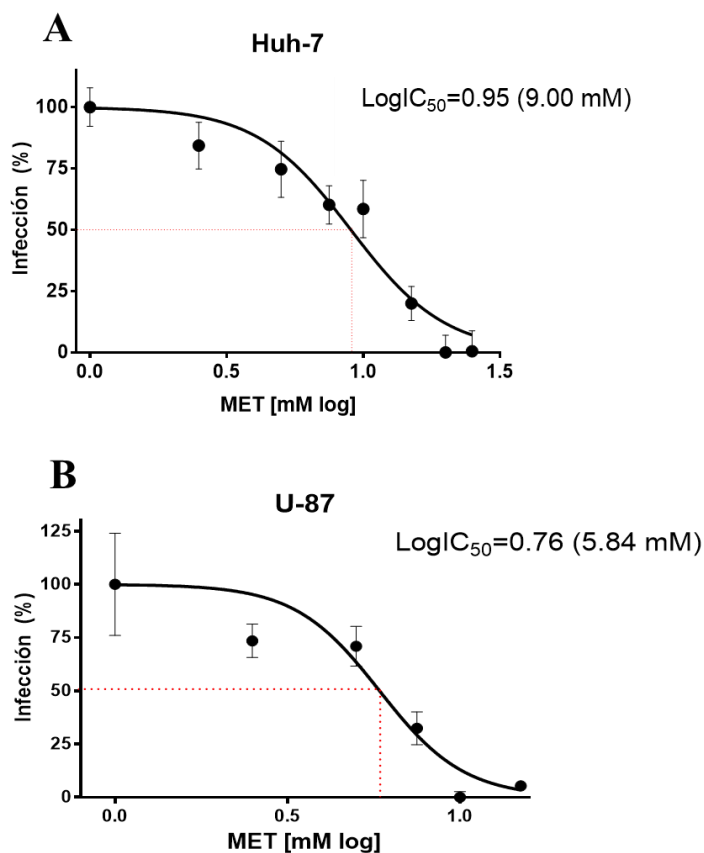


Figura 15. Concentración de MET que inhibe la infección del ZIKV al 50% (IC₅₀). Se calculó la IC₅₀ para MET en células Huh-7 (A) y U-87 (B) infectados con ZIKV. Ambas líneas celulares se trataron con MET (1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20 y 25 mM) o vehículo (H₂O) durante 24 h. La reducción de la infección por MET se evaluó por citometría de flujo y la IC₅₀ se estimó por análisis de regresión lineal. Los resultados se representaron con el software Graph Pad Prism versión 6.0.

7.5 La MET es menos eficaz para inhibir al ZIKV, pero no es tóxica comparada con la LOV.

Para comparar el efecto de la MET con otro fármaco hipolipemiante se calculó el SI de una de la Lovastatina (LOV), un fármaco aprobado por la FDA capaz de inhibir al ZIKV en células Vero¹⁸⁰. Los valores de la CC₅₀ y la IC₅₀ calculados en células Huh-7 fueron de 231.9 μ M y 20.78 μ M, respectivamente, con un SI de 11.15 μ M (Figura 16).

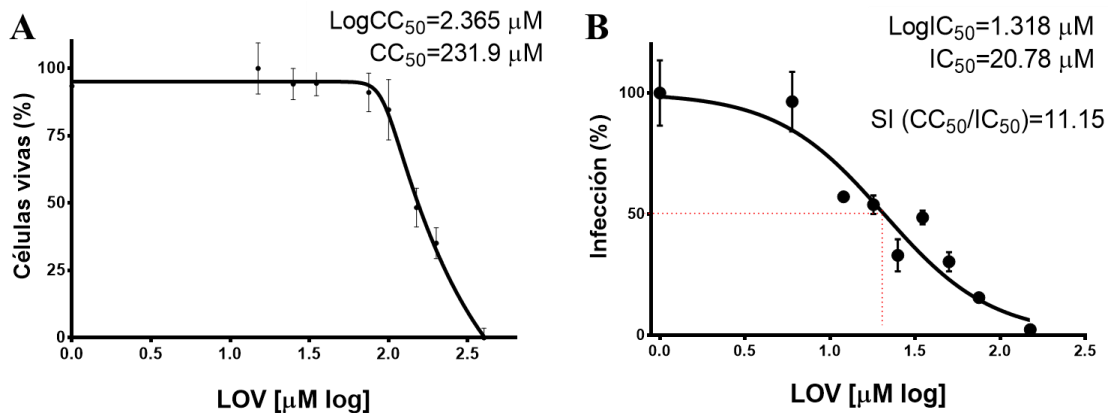


Figura 16. CC₅₀ y IC₅₀ de LOV. Se calculó la CC₅₀ y la IC₅₀ de LOV en células Huh-7. Para los ensayos de toxicidad y de inhibición concentraciones crecientes de LOV fueron incubadas durante 24 h. La reducción de la viabilidad y la infección se evaluó por MTT y citometría de flujo, respectivamente. Ambos valores se estimaron por análisis de regresión lineal.

La CC₅₀ de la LOV en las células U-87 no pudo calcularse debido a su alta toxicidad a concentraciones bajas. En la tabla 3 se resumen los SI calculados durante la infección del ZIKV. Los resultados sugieren que a pesar de que la MET es menos eficaz para inhibir al ZIKV en células Huh-7, en comparación con la LOV, puede ser utilizada de manera segura debido a su baja toxicidad y eficacia antiviral en células de linaje neuronal (Tabla 3).

Tabla 3. índice de selectividad de la MET y LOV

Flavivirus	Fármaco	Células	CC ₅₀	IC ₅₀	SI (CC ₅₀ /IC ₅₀)
ZIKV	MET	U-87	33.43	5.84	5.72
		Huh-7	32.9	9	3.65
	LOV	U-87	Altamente tóxica		
		Huh-7	231.9 μm	20.78μm	11.15

Citotoxicidad (CC₅₀), Anti-ZIKV (IC₅₀), índice de selectividad (SI).

7.6 MET reduce el porcentaje de infección y la producción de partículas virales del ZIKV en células Huh-7 y U-87.

Para evaluar el efecto anti-ZIKV de la MET, se analizaron algunos de los pasos importantes del ciclo replicativo viral. Ensayos independientes al cálculo de la IC₅₀ fueron realizados para evaluar el porcentaje de infección, la producción de partículas virales y la síntesis de proteínas virales del ZIKV. Para esto, se seleccionaron tres concentraciones que no comprometieran la viabilidad celular de las células Huh-7 y U-87 (Figura 14A, C), para así poder comparar el efecto antiviral de la MET entre ambas líneas celulares: 1 mM (baja), 7,5 (media) y 15 mM (alta).

Células Huh-7 y U-87 fueron infectadas y tratadas con MET. Al final de los tratamientos, los sobrenadantes se recolectaron para determinar el rendimiento viral mediante el ensayo de unidades formadoras de focos (FFU), mientras que el porcentaje de células infectadas se analizó mediante citometría de flujo.

El tratamiento con MET redujo el porcentaje de infección (-29,43% a 7.5 mM y -42.59% a 15 mM) y el rendimiento viral (-38% a 7.5 mM y -74,00% a 15 mM) de forma dependiente de la dosis en células Huh-7 (Figura 17). De manera similar, en las células U-87, MET redujo el porcentaje de células infectadas (-30,36% a 7,5 mM y -67,59% a 15 mM) y el rendimiento viral (-47,69% a 7,5 mM y -91,13% a 15 mM) (Figura 17) de manera dosis dependiente.

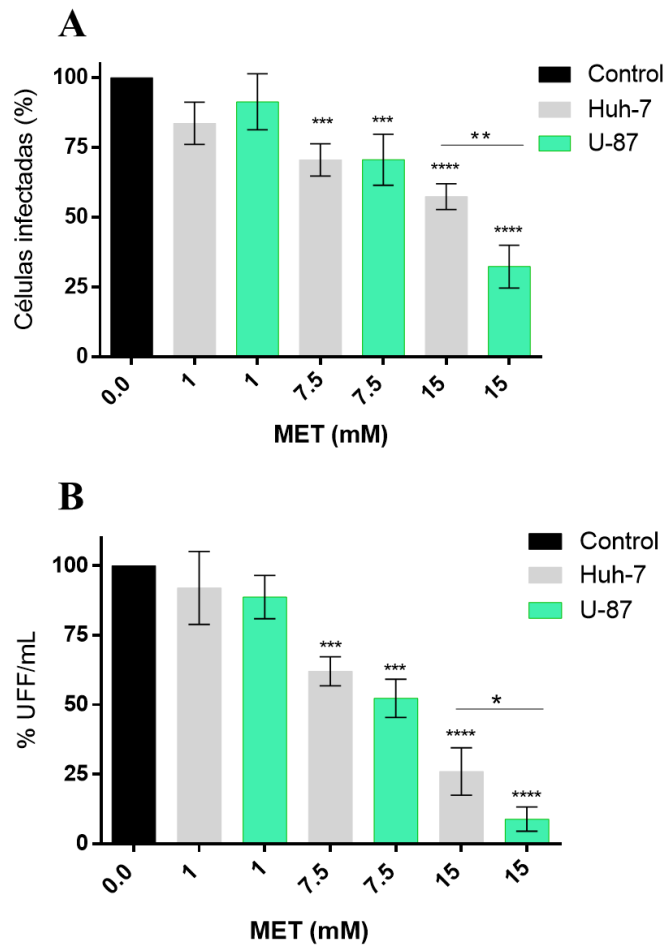


Figura 17. MET reduce el número de células infectadas y el rendimiento viral de ZIKV. Las células Huh-7 y U-87 infectadas con ZIKV se trataron con MET (1, 7.5 y 15 mM) durante 24 hrs. (A) Porcentaje de células infectadas. (B) Títulos virales de los sobrenadantes recolectados post-tratamiento. Los resultados se presentan en porcentajes considerando como 100% las células infectadas sin tratar (Control). Los gráficos representan las medias \pm SD de n = 3 experimentos independientes realizados por duplicado. *p = 0,0332, **p = 0,0021, ***p = 0,0002 ****p < 0,0001.

El análisis de la varianza (ANOVA) para comparar los tratamientos entre ambos tipos celulares demostró una diferencia significativa en el porcentaje de infección y los títulos virales de ZIKV a la concentración más alta de MET.

7.7 El tratamiento con MET reduce los niveles de expresión de la proteína NS3 del ZIKV en células Huh-7 y U-87.

La síntesis de proteínas virales se evaluó mediante la cuantificación de los niveles de proteína NS3 por Western Blot (Figura 18).

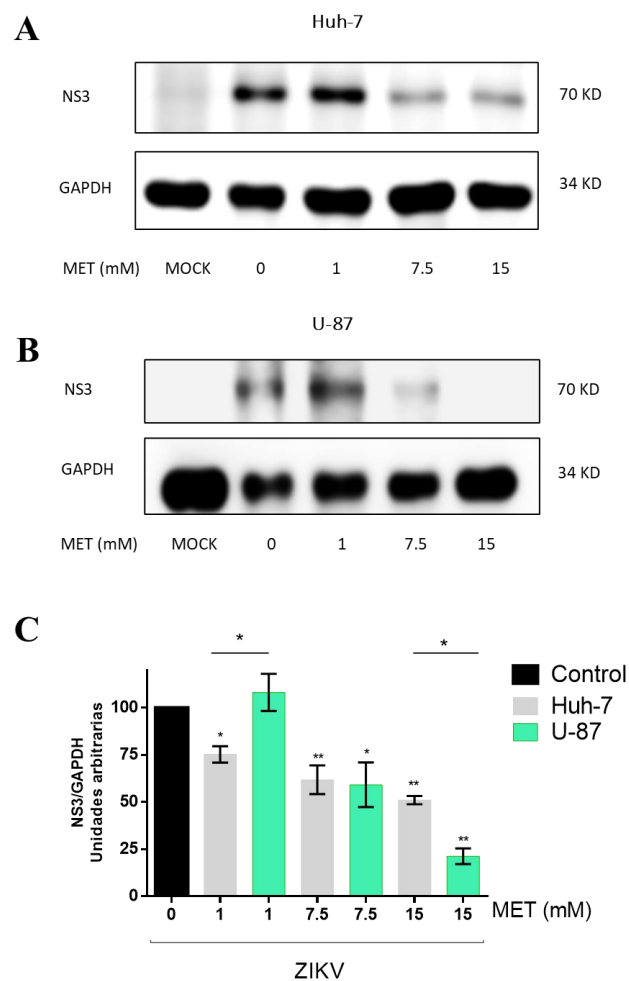


Figura 18. MET reduce la proteína NS3 del ZIKV. La proteína NS3-ZIKV en (A) células Huh-7 y (B) células U-87; (c) el análisis densitométrico de ambas células. Se considera como 100% las células infectadas sin tratar (Control). Los gráficos representan las medias \pm SD de n=3 experimentos independientes realizados por duplicado. *p = 0,0332, **p = 0,0021.

Durante los tratamientos con MET los niveles de expresión de la proteína NS3 se redujeron (-24 %, -38,15 % y -48,95) con todas las concentraciones en células Huh-7 al igual que en células U-87 (-40,80 % a 7,5 mM y -78,70 % a 15 mM) (Figura 18A y B). El análisis estadístico entre ambos tipos de células mostró mayor efecto antiviral en células U87 a la concentración más alta de MET (Figura 18C).

7.8 La MET no afecta la adsorción y la entrada del ZIKV en células Huh-7 y U-87

Para evaluar la capacidad de la MET para inhibir las primeras etapas de la infección del ZIKV, se realizaron dos tratamientos distintos: 1) una hora previo a la adsorción y, 2) durante la adsorción y entrada viral. En cualquiera de los casos el fármaco se retiró, seguido de dos lavados, para continuar el proceso de infección. Pasadas 24 horas se recolectó el sobrenadante y se evaluó la producción de partículas virales. Ninguno de los tratamientos provocó una reducción significativa de los títulos virales, en comparación con el control sin tratamiento (Figura 19).

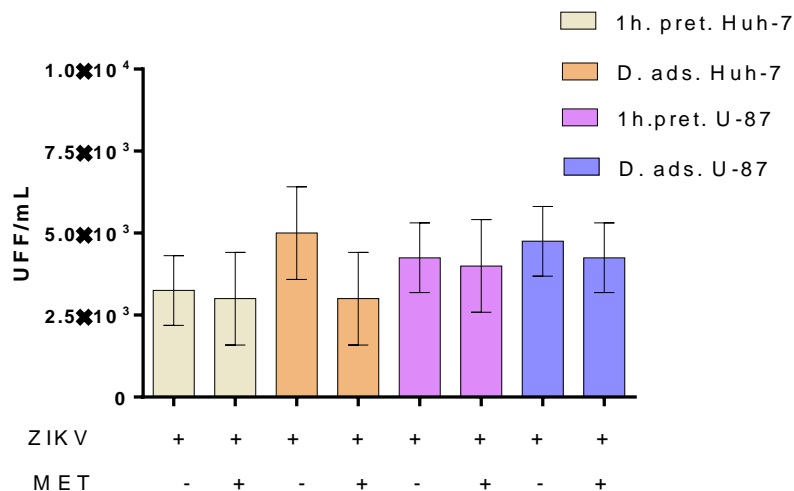


Figura 19. Efecto de MET sobre la adsorción y entrada del ZIKV. El tratamiento con MET una hora antes (1h pret) y durante la adsorción (Ads) viral, no afectó la producción de partículas virales en células Huh-7 y U-87 comparado con las células no tratados.

7.9 La MET inhibe eficazmente otros flavivirus en células Huh-7

7.9.1 Infectividad de DENV y YFV en células Huh-7

Para probar el efecto anti-flavivirus de la MET, utilizamos como modelo de estudio las células Huh-7, que también son susceptibles a DENV y YFV. Previo a los ensayos se comparó la infectividad de DENV y YFV en células Huh-7 a una MOI de 1 y 5 (Figura 20). No hubo diferencias significativas en el porcentaje de infección entre DENV y ZIKV, pero si entre ambos virus y YFV. Se utilizó una MOI de 5 para realizar los ensayos con el DENV y el YFV, debido a que no fue posible incrementar la MOI de YFV por el título del stock viral. Por lo tanto, el DENV fue utilizado para comparar la eficacia anti-flavivirus de la MET.

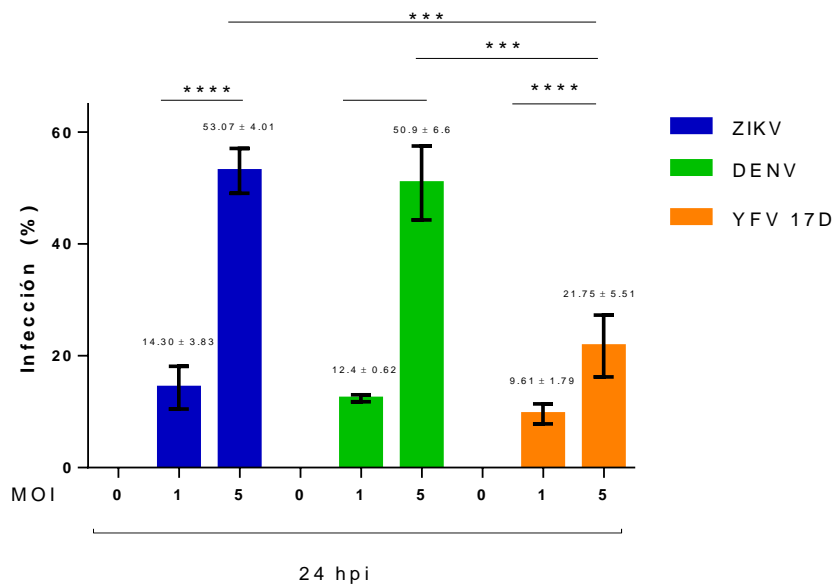


Figura 20. Eficacia de infección de los flavivirus. Células Huh-7, infectadas a una MOI de 1 y 5 con ZIKV o DENV o YFV por 24 hrs. Los gráficos representan las medias \pm SD de $n = 3$ experimentos independientes. * $p = 0,0332$, ** $p = 0,0021$, *** $p = 0,0002$ **** $p < 0,0001$.

7.9.2 La MET inhibe la replicación del DENV con mayor eficacia que la de ZIKV, en células Huh-7

Se calculó la IC50 y el SI de la MET para DENV y se comparó con ZIKV. MET inhibió la infección de DENV de forma dosis-dependiente, con una IC50 de 3,82 (IC del 95 % = 3,350 a 4,362) (Figura 21A) y un SI de 8.61 (Tabla 4).

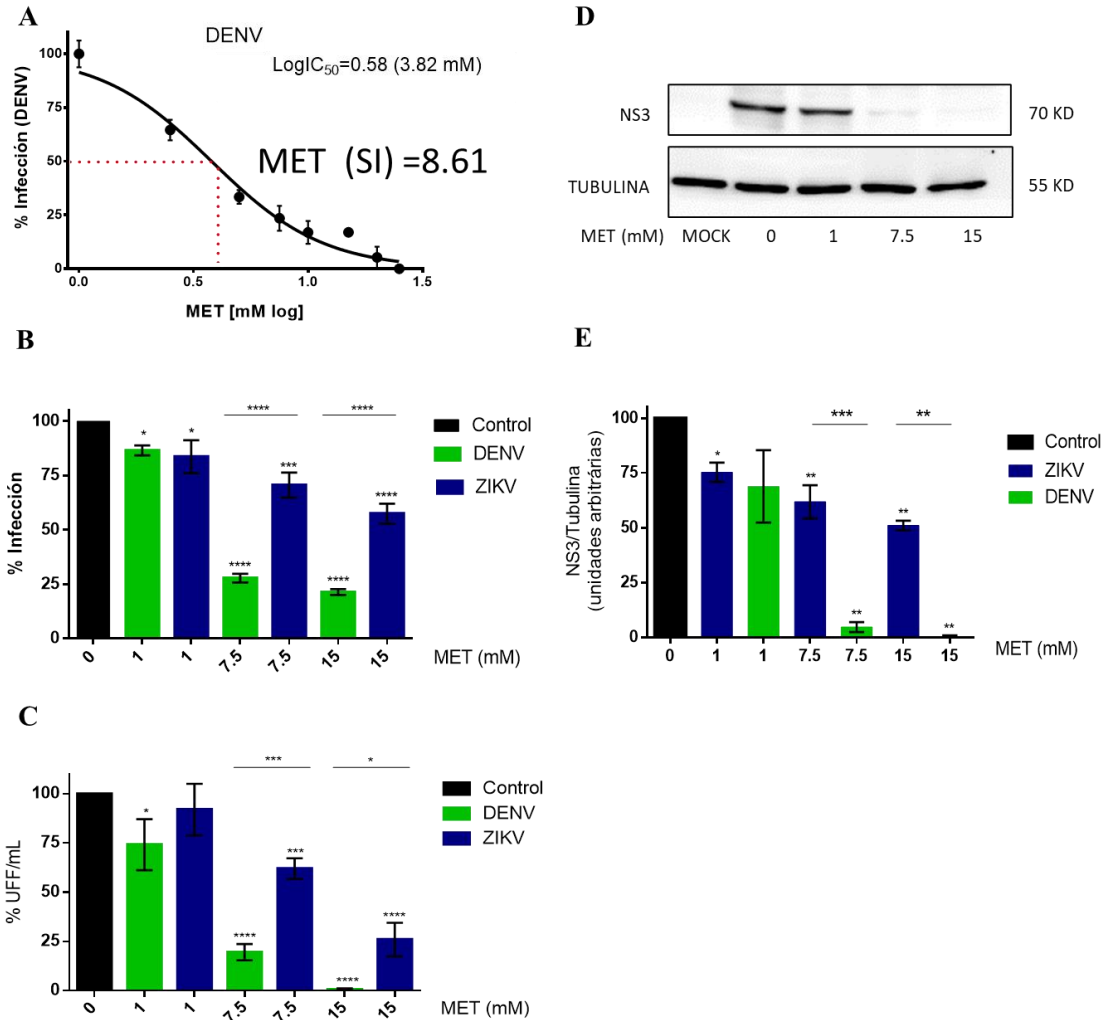


Figura 21. Efecto de MET en la infección por DENV. (A) La IC₅₀ y el SI de MET fue calculado para DENV en células Huh-7. (B) Porcentaje de infección, (C) rendimiento viral, y (D) los niveles de proteína NS3 de DENV fueron evaluados y comparados con los de ZIKV bajo el mismo tratamiento con MET (1,7,5,15 mM durante 24 h). (E) Muestra el análisis densitométrico que compara los niveles de proteína NS3 de DENV y ZIKV después del tratamiento con MET. Los resultados se presentan en porcentajes considerando como 100% las células infectadas no tratadas (Control). Los resultados se representaron con el software Graph Pad Prism versión 6.0. Los gráficos representan las medias \pm SD de n = 3 experimentos independientes realizados por duplicado. *p = 0,0332, **p = 0,0021, ***p = 0,0002 ****p < 0,0001.

Posteriormente, utilizando las concentraciones descritas anteriormente (1, 7,5 y 15 mM), se evaluó el efecto de MET sobre la infección de DENV y se comparó con el de ZIKV. El tratamiento con MET redujo el porcentaje de infección (- 13,46 %, - 72,24 % y - 78,65 %), las partículas virales (- 25,84 %,

- 80,42 % y - 99,38 %) y la proteína no estructural NS3 del DENV (-32,23%, - 95.31% y 99.65%) de forma dosis-dependiente (Figura 21B-D). El análisis estadístico también mostró que MET inhibió con mayor eficacia al DENV en comparación con el ZIKV, cuando fueron tratadas a 7,5 y 15 mM (Figura 21B, C, E).

7.9.3 La MET inhibe la replicación del YFV en células Huh-7

Para determinar el efecto anti-Flavivirus de la MET, se calculó también la IC50 y el SI de la MET en células huh-7 infectadas con el YFV. Al igual que con los otros flavivirus, MET inhibió la infección del YFV de forma dosis-dependiente, con una IC50 de 5,36 (IC del 95 % = 4,892 a 5,893) en células Huh-7 (Figura 22A).

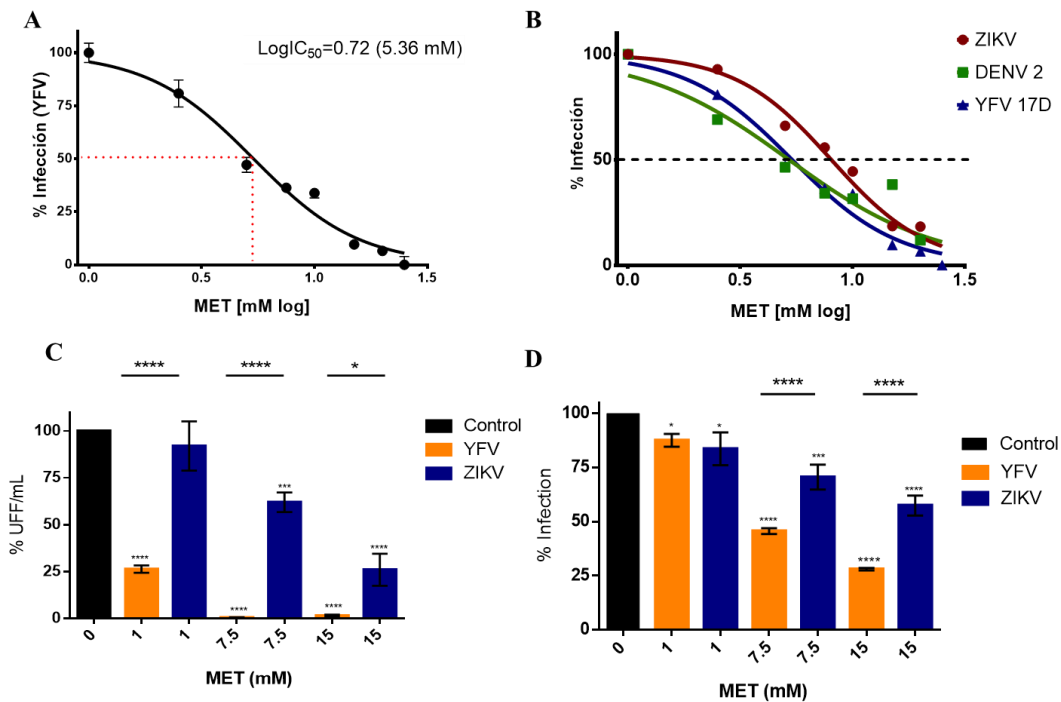


Figura 22. Efecto anti-YFV de MET. (A) IC50 de MET para el YFV en células Huh-7. (B) Comparación del IC50 de ZIKV, DENV y YFV. (C) Porcentaje de infección y (D) rendimiento viral de YFV de MET (1,7,5,15 mM) durante 24 h. Los resultados se presentan en porcentajes considerando como 100% las células infectadas no tratadas (Control). Los gráficos representan las medias \pm SD de n = 3 experimentos independientes realizados por duplicado. *p = 0,0332, **p = 0,0021, ***p = 0,0002 ****p < 0,0001.

La Figura 22B muestra la sobreposición de las curvas de inhibición de MET, con un decaimiento de la infección y una IC50 similar en los tres flavivirus. El valor SI calculado para YFV fue de 6.13 (Tabla 4). El tratamiento con MET redujo el porcentaje de infección (-12,47%, -54,41% y -71,98%) y el rendimiento viral de YFV (-25,84%, -80,42% y -99,38%) (Figura 22C, D). El análisis estadístico entre flavivirus mostro diferencias significativas sugiriendo una mayor eficacia por parte de la MET para inhibir al YFV en comparación con ZIKV, sin embargo, esta aseveración no es concluyente debido a la eficiencia de infección del YFV (Figura 20). El resumen de resultados de la eficacia anti-flavivirus de MET se encuentra en la tabla 4.

Tabla 4. Índice de selectividad (SI) de MET en flavivirus

Flavivirus	Celulas	CC ₅₀	IC ₅₀	SI (CC ₅₀ /IC ₅₀)
ZIKV	U-87	33.43	5.84	5.72
ZIKV	Huh-7	32.9	9	3.65
DENV	Huh-7	32.9	3.82	8.61
YFV	Huh-7	32.9	5.36	6.13

Citotoxicidad (CC50), Actividad anti-flavivirus (IC50), Índice de selectividad (SI).

7.10 MET inhibe la formación de los complejos de replicación de ZIKV, DENV y YFV en células Huh-7

Posteriormente, se evaluaron los complejos replicativos (CR) del ZIKV mediante microscopía confocal, utilizando la IC50 de MET. La integridad de los CR se evaluó mediante la presencia y colocalización de la proteína viral E (verde) y NS4A (roja) (Figura 23A). El tratamiento con MET redujo la fluorescencia de ambas proteínas (E y NS4A) en la región perinuclear de las células Huh-7 infectadas con ZIKV (Figura 23A, B).

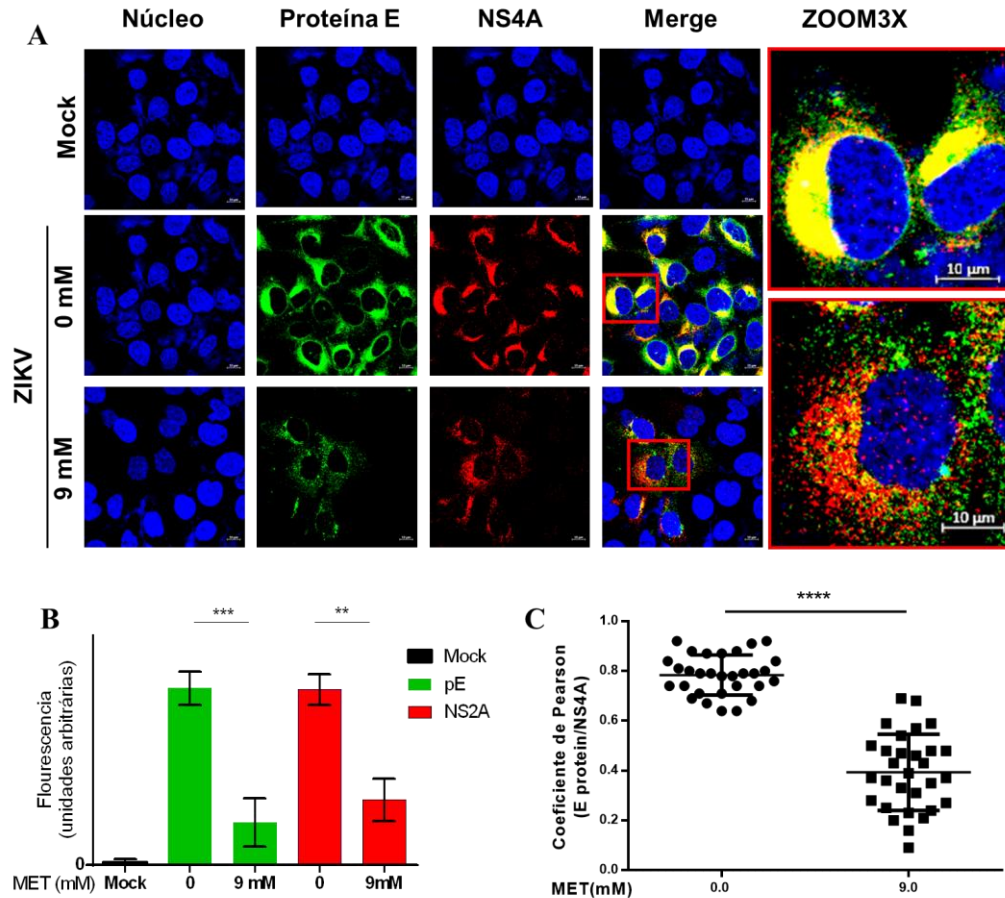
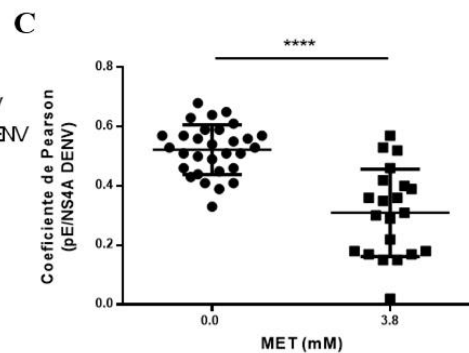
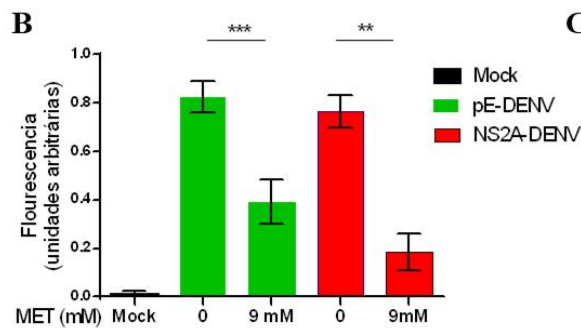
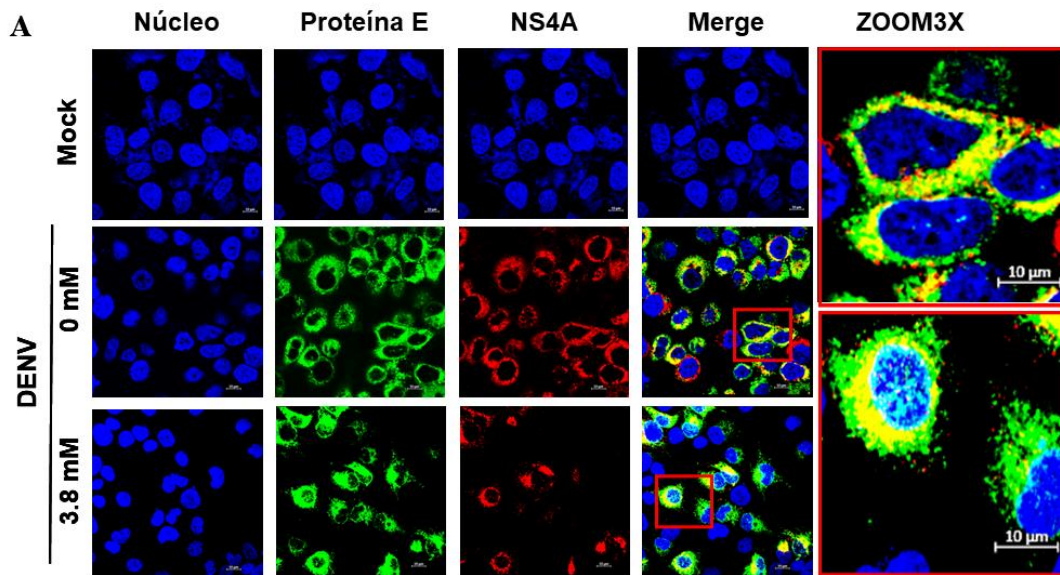


Figura 23. Efecto de la MET sobre los complejos replicativos del ZIKV. (A) Distribución de las proteínas virales, E (verde) y NS4A (roja), en células Huh7 tratadas con MET e infectadas (MOI 5) con ZIKV por 24 hrs. Los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul). Los cuadros rojos representan el área de zoom. Barra de escala 10 μ m. (B) Análisis semicuantitativo de la fluorescencia de E y NS4A. (C) Correlación de Pearson de E/NS4A de células tratadas y no tratadas; los gráficos indican valores de colocalización E/NS4A para la región de interés (ROI) de 30 células infectadas de tres imágenes independientes expresadas como media \pm DE. **p = 0,0021, ***p = 0,0002 ****p < 0,0001.

El análisis semicuantitativo de ambas proteínas mostró una diferencia estadísticamente significativa en las células tratadas en comparación con las no tratadas, corroborando la reducción de proteínas virales (Figura 23B).

Además, el tratamiento modificó la localización de las proteínas virales, de un área perinuclear definida a un área dispersa ($p < 0,0001$), mostrando diferencias significativas en el análisis semicuantitativo del coeficiente de correlación de Pearson entre células tratadas y no tratadas (Figura 23C).

Se analizaron también los complejos replicativos de DENV y YFV utilizando la IC50 para cada virus. Los complejos replicativos fueron analizados mediante microscopía confocal. Al igual que ZIKV, el tratamiento con MET redujo de manera significativa la fluorescencia de las proteínas virales E y NS4A en células tratadas en comparación con las células no tratadas (Figura 24A, B, D, E). El tratamiento también modificó la localización de ambas proteínas dispersándolas de la región perinuclear, provocando así su deslocalización ($p < 0,0001$) (Figura 24C, F). En conjunto estos resultados sugieren que la MET afecta directamente la formación de complejos replicativos de los flavivirus.



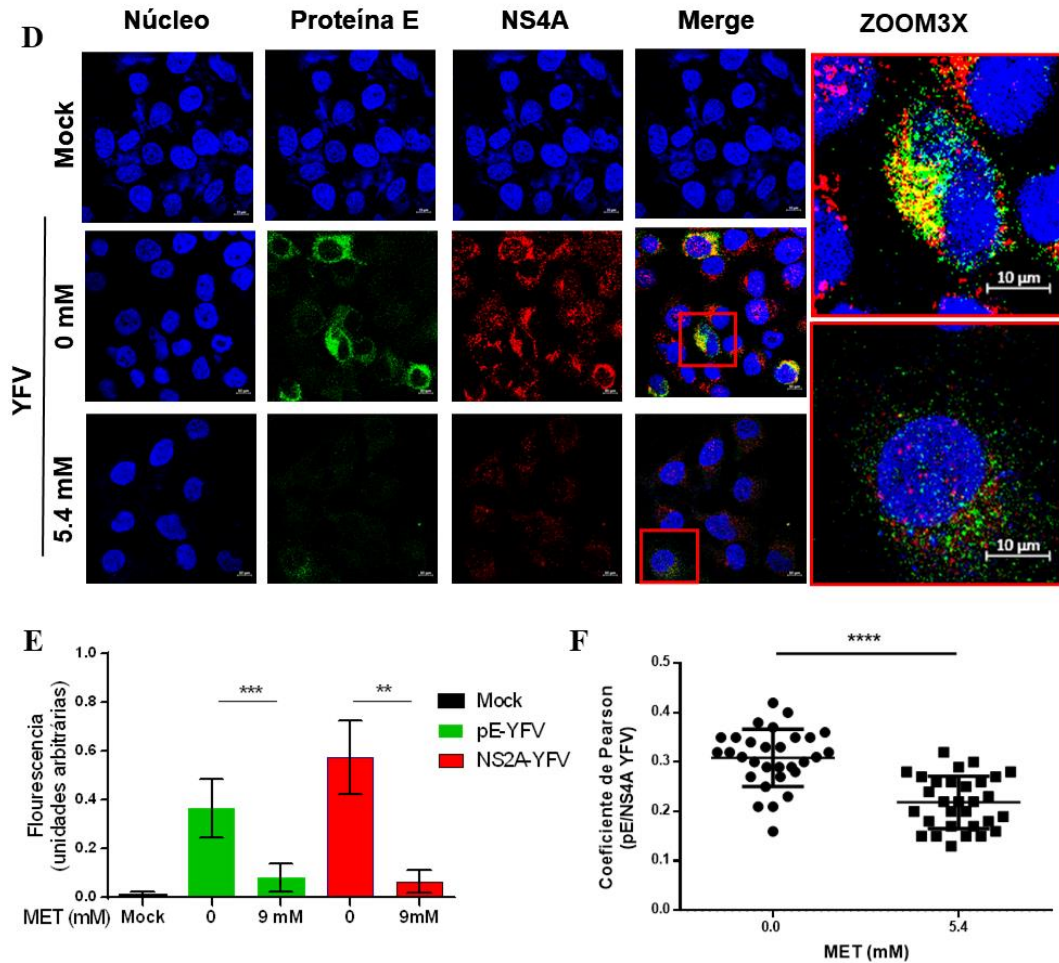


Figura 24. Efecto de la MET sobre los complejos replicativos de los flavivirus. (A) Infección por DENV en células Huh7 tratadas y no tratadas con MET por 24 hrs. (B) Análisis semicuantitativo de la fluorescencia de la proteína E y NS4A del DENV. (C) Correlación de Pearson de E/NS4A del DENV. (D) Infección por YFV en células Huh7 tratadas y no tratadas con MET por 24 hrs. (E) Análisis semicuantitativo de la fluorescencia de la proteína E y NS4A del YFV. (F) Correlación de Pearson E/NS4A del YFV. Los gráficos indican valores de colocalización E/NS4A para la región de interés (ROI) de 30 células infectadas de tres imágenes independientes expresadas como media \pm DE. ** $p = 0,0021$, *** $p = 0,0002$ **** $p < 0,0001$.

7.11 El tratamiento con MET reduce las estructuras membranosas de los complejos de replicación del ZIKV, DENV y YFV en células Huh-7.

La ultraestructura de los complejos replicativos de ZIKV fue analizada en células Huh-7 durante los tratamientos con MET utilizando microscopía electrónica de transmisión (TEM).

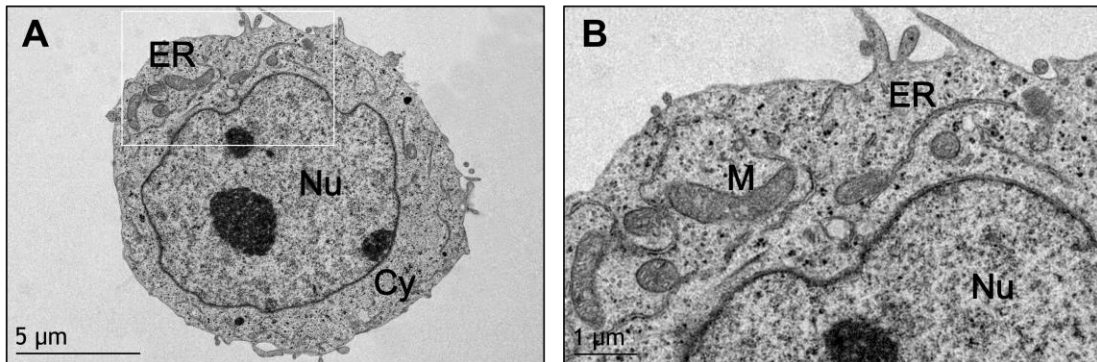
Como era de esperar, las células no tratadas perdieron la estructura del retículo endoplásmico (ER) debido a la formación de complejos replicativos de ZIKV, caracterizados por numerosas invaginaciones y estructuras membranosas (Figura 25 C, D; 25.1D). Además, se observó el crecimiento y la expansión del RE, lo que consecuentemente alteró la localización y la morfología del núcleo a causa del ZIKV.

En contraste, el tratamiento con MET redujo las vesículas inducidas por virus (Ve), principales estructuras membranosas que forman a los complejos replicativos, en células Huh-7 infectadas con ZIKV (Figura 25 E, F; 25.1F). No se detectaron partículas similares a virus (Vi) durante los tratamientos con MET. Además, las alteraciones morfológicas provocadas por la infección del ZIKV se revirtieron en células tratadas. Por último, el análisis semicuantitativo de las Ve corroboró una reducción significativa de los CR en células tratadas con MET en comparación con células no tratadas ($p < 0,0001$) (Figura 27).

La ultraestructura de los complejos replicativos de DENV y YFV en células Huh-7 durante los tratamientos con MET también fueron evaluados mediante TEM. Los resultados fueron similares a los obtenidos con ZIKV (Figura 26, 26.1, 26.2). Las alteraciones morfológicas y estructurales del RE causadas por ambos virus (Figura 26 G, H, K, L; 26.1 H; 26.2 L) fueron revertidas por la MET (Figura 26 I, J, M, N; 26.1 J; 26.2 N).

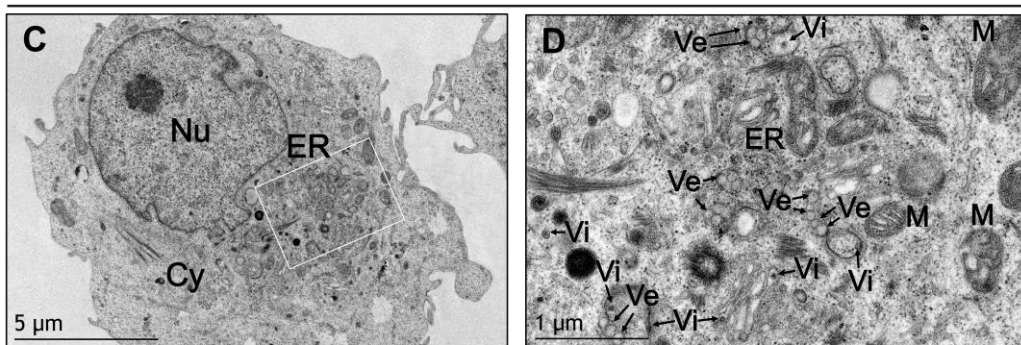
De la misma forma, no se detectaron partículas similares a virus (Vi) durante los tratamientos y el análisis estadístico de las estructuras membranosas (Ve) inducidas por ambos virus mostró una reducción significativa ($p < 0,0001$) (Figura 27). En conjunto estos resultados sugieren que el tratamiento con MET inhibe la formación de las estructuras membranosas que forman a los complejos de replicación de ZIKV, DENV y YFV.

MOCK



ZIKV

MET 0 mM



MET 9.0 mM

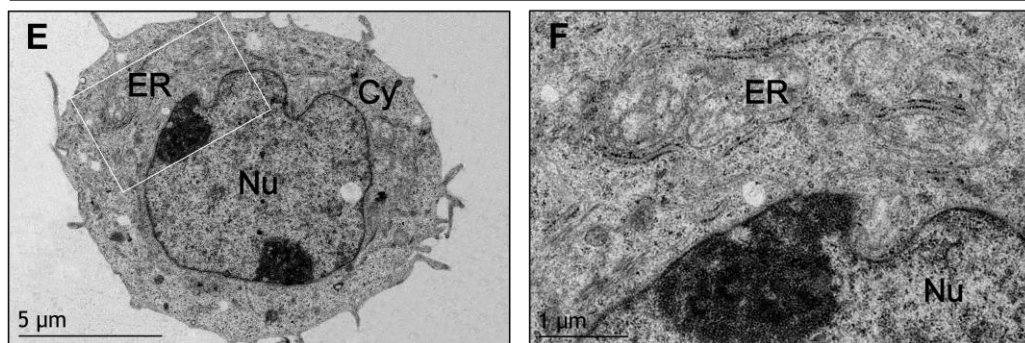
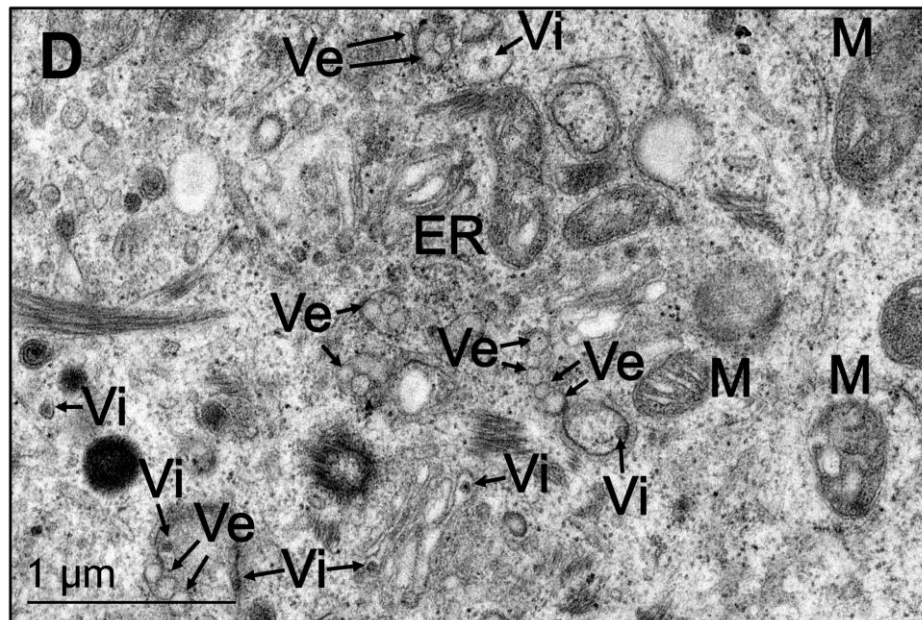


Figura 25. Reducción de estructuras asociadas a los complejos de replicación de ZIKV durante los tratamientos con MET. Microscopía electrónica de transmisión de células Huh-7 infectadas con Mock (A, B), infectadas con ZIKV (C, D) y tratadas con MET (E, F). Núcleo (Nu), citoplasma (Cy), retículo endoplásmico (ER), mitocondrias (M), vesículas inducidas por virus (Ve), partículas similares a virus (Vi).

ZIKV

MET 0 mM



MET 9.0 mM

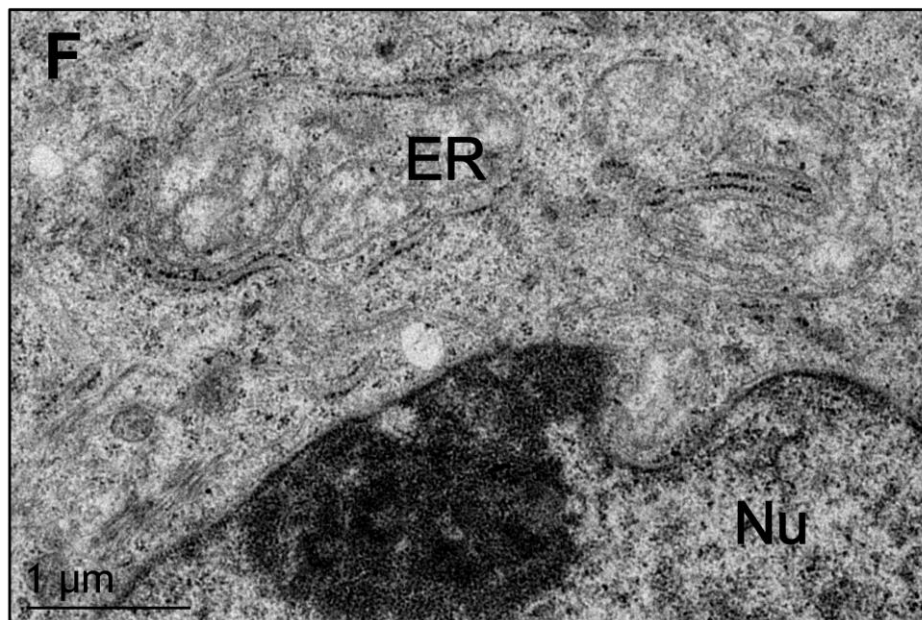


Figura 25.1. Ampliación de los complejos replicativos: figura D (infectados con ZIKV) y F (infectados y tratados con MET).

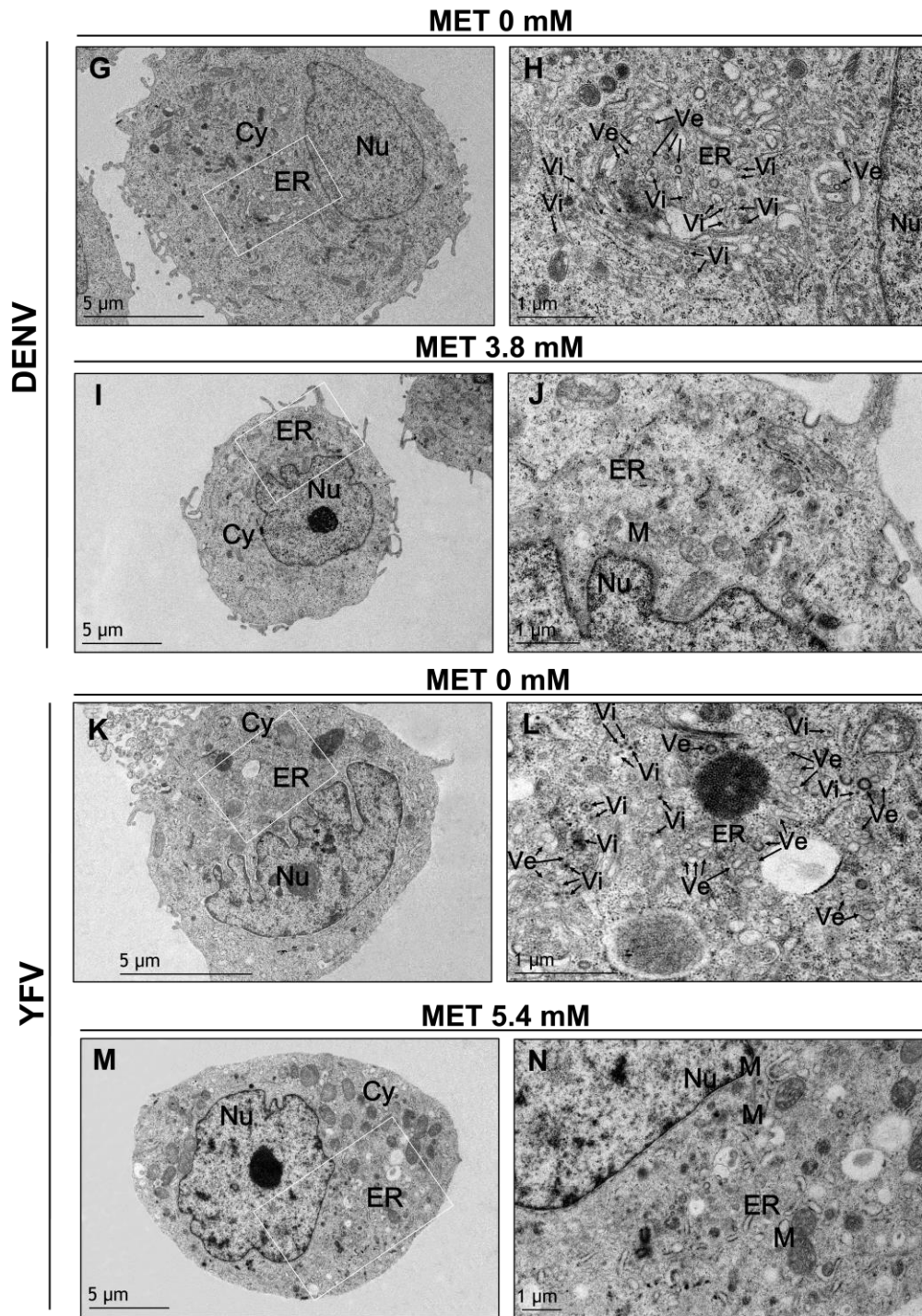
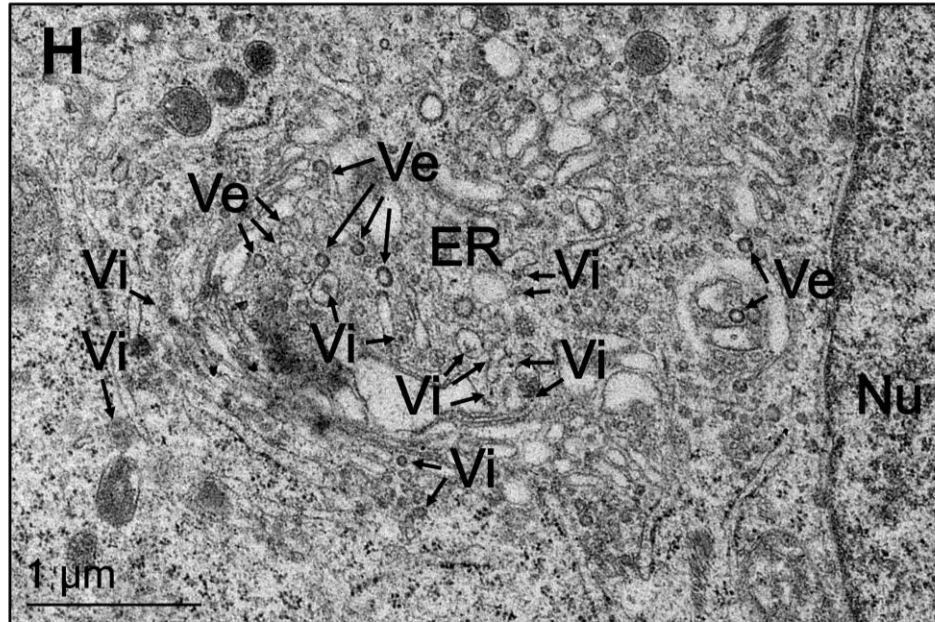


Figura 26. Inhibición de la formación de los complejos de replicación de DENV y YFV por MET. Células Huh-7 infectadas con DENV: no tratadas (G y H) y, tratadas con MET (I y J). Células infectadas con YFV: No tratadas (K y L) y, tratadas con MET (M. y N). Núcleo (Nu), citoplasma (Cy), retículo endoplásmico (ER), mitocondrias (M), vesículas inducidas por virus (Ve), partículas similares a virus (Vi).

DENV

MET 0 mM



MET 3.8 mM

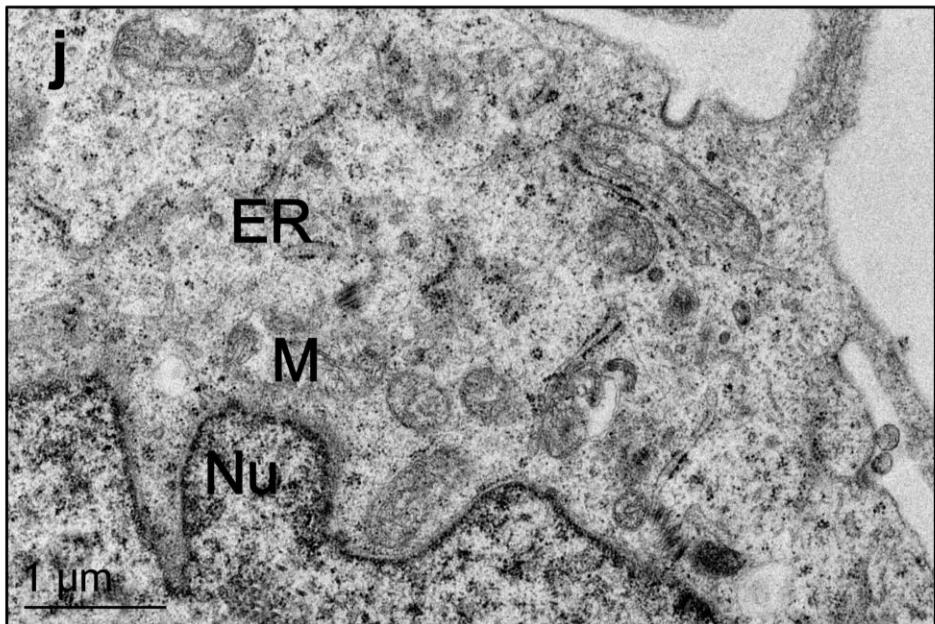
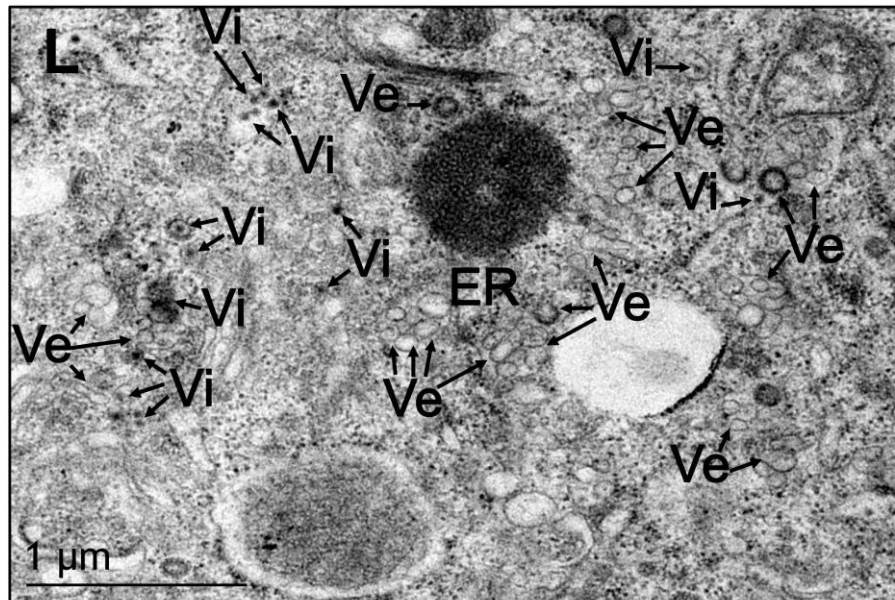


Figura 26.1. Ampliación de los complejos replicativos: figura H (infectados con DENV) y J (infectados y tratados con MET).

YFV

MET 0 mM



MET 5.4 mM

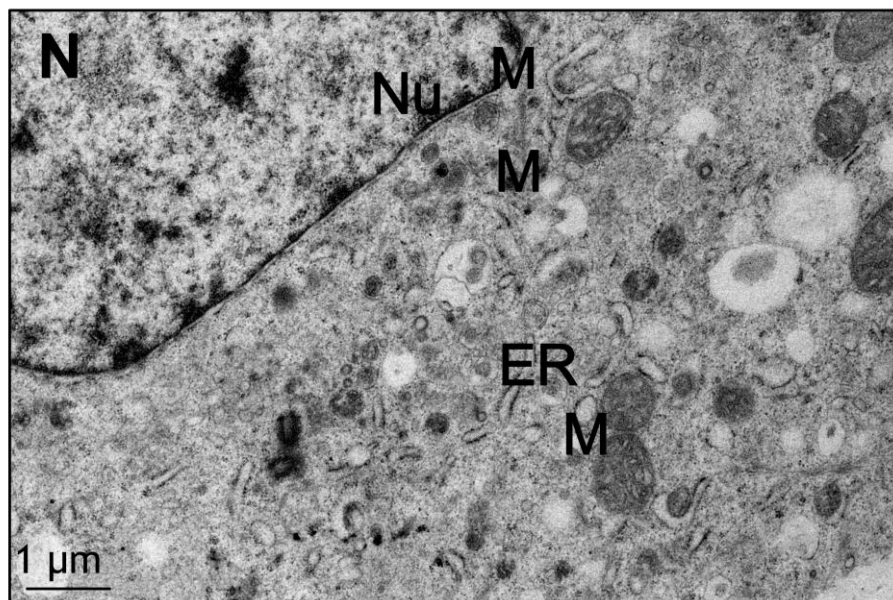


Figura 26.2. Ampliación de los complejos replicativos: figura L (infectados con YFV) y N (infectados y tratados con MET).

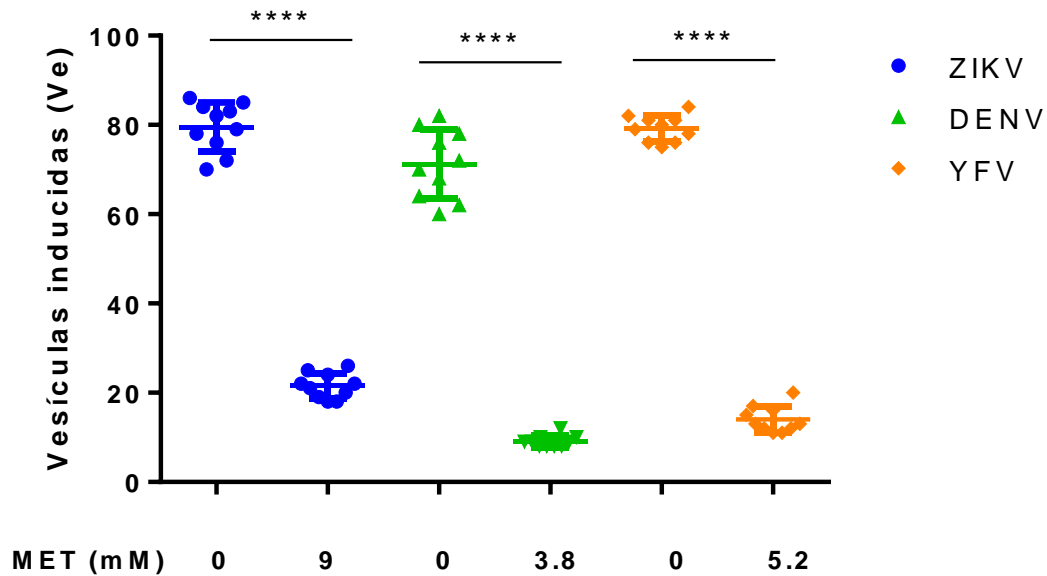


Figura 27. MET reduce las vesículas inducidas por flavivirus en células Huh-7. El gráfico representa el recuento de Ve de las células tratadas en comparación con las células no tratadas, expresado como la media \pm DE. n = 10 células por grupo. **** p < 0,0001.

7.12 Signos de la enfermedad del ZIKV y DENV en el modelo de ratón AG129

Con el objetivo de evaluar el efecto anti-ZIKV de la MET en un modelo *in vivo*, estudiamos las manifestaciones clínicas y el desarrollo de la enfermedad del ZIKV en el modelo animal AG129. El ratón AG129 es un ratón transgénico triple knock-out para interferón alfa (INF- α), beta (INF- β) y el receptor del interferón gamma (INFr- γ), lo cual lo hace susceptible a la infección por flavivirus, cuya enfermedad es letal. Por lo tanto, la supervivencia es ampliamente utilizada como un parámetro para evaluar la eficacia de vacunas y fármacos antivirales^{200,201}. Los ratones inmunodeficientes ofrecen la ventaja de mostrar signos clínicos de la enfermedad, los cuales pueden ser evaluados¹⁹⁸.

La enfermedad causada por DENV2 en ratones AG129, recientemente fue caracterizada en nuestro laboratorio para la evaluación de fármacos

hipolipemiantes en monoterapia y combinación, porque fue utilizado como un parámetro de comparación. Además utilizamos como referencia la escala de morbilidad reportado por Orozco et al. (2012)¹⁹⁸, basada en un puntaje clínico para monitorear la morbilidad promedio de los ratones infectados por el DENV en una escala de 1 a 5, donde "1" representa ratones sanos y "5" moribundos (Tabla 5).

Tabla 5. Escala de signos causadas por la enfermedad de DENV y ZIKV en ratones AG129

Score	Signos de la enfermedad por DENV Reportado por Orozco et al. (2012) (Modificado y adaptado a AG129)	Signos de la enfermedad por ZIKV Reportado por Farfan-Morales CN et. al. 2021.
1	Saludable	Saludable
2	Pelo erizado o signos leves de letargo	Pelo erizado
3	Pelo erizado y letargo con postura encorvada.	Pelo erizado y postura encorvada con irritabilidad (signos de estrés)
4	Características anteriores más debilidad muscular y movilidad reducida. Escasa respuesta a los estímulos	Características anteriores más letargo, acompañado de debilidad muscular y movilidad reducida. Frecuentemente parálisis en extremidades y/o irritabilidad exacerbada (signos de estrés).
5	Moribundo: Incapaz de ponerse de pie, sin movilidad y sin respuesta a estímulos. Algunos presentan parálisis de extremidades.	Moribundo: Incapaz de levantarse, con o sin movilidad ante estímulos. En su mayoría parálisis de extremidades.

Los signos exacerbados pueden aparecer durante la enfermedad de ambos virus y se caracterizan por ser signos neurológicos

Se presentan con más frecuencia en infecciones por ZIKV

*Parálisis de una extremidad

**Parálisis de dos o más extremidades

*** Parálisis de una o más extremidades con temblores o ataxia.

Los ratones AG129 fueron infectados con 3 inóculos de ZIKV, 2×10^7 , 4×10^6 y 2×10^6 UFF, dentro de lo reportado en la literatura ²⁰²⁻²⁰⁴; el grupo control fue inoculado con 4×10^6 FFU de DENV (previamente utilizado en nuestro laboratorio). Los ratones infectados con DENV o ZIKV fueron monitoreados diariamente y alimentados ad libitum.

Los resultados mostraron similitudes, pero también diferencias en el curso de la enfermedad entre el DENV y ZIKV. Los criterios descritos por Orozco et. al Orozco et. al. (2012)¹⁹⁸, se cumplieron en ratones AG129 infectados con DENV, mientras que para el ZIKV se adecuaron nuevos criterios. La descripción de ambas enfermedades se muestra en la tabla 5.

Los signos del DENV aparecieron entre el día 3-6 (Figura 28B), y se fueron agravando según lo reportado (tabla 5). El peso de los ratones se vio afectado a partir del día 8, con una caída notable a partir del día 10 y hasta el día de la eutanasia (Figura 28D). Los ratones mostraron un tiempo de sobrevivencia entre 13 y 15 días con una mediana de sobrevivencia de 13 días (Figura 28F).

Para el ZIKV, la aparición de los signos fue dependiente de las dosis: entre el día 3 y 6 con la dosis más alta; entre el día 6 y 9 con la dosis intermedia; y entre el día 8 y 10 con la dosis más baja (Figura 28A). Posterior a la aparición de los signos, la enfermedad siguió un curso similar a la causada por DENV. Sin embargo, la parálisis de patas traseras (y/o extremidades) y los temblores (ataxias) fueron signos más recurrentes en la enfermedad por ZIKV en distintas etapas de la enfermedad (tabla 5). El peso de los ratones decayó drásticamente a partir del día 10, 13 y 15, de forma dosis-dependiente (Figura 28C). La enfermedad se agravó hasta el evento de letalidad o eutanasia. El tiempo de sobrevivencia fue de 15, 17 y 20 días, dosis-dependiente (Figura 28E).

Para homogenizar los tiempos de tratamientos entre ZIKV y DENV, el inóculo seleccionado para probar el efecto anti-ZIKV de la MET fue de 2×10^7 , ya que el curso de la enfermedad causada por ambos virus fue similar.

El genoma viral y los complejos replicativos (CRs) del ZIKV y DENV se analizaron por qRT-PCR y TEM, a partir de órganos infectados extraídos al día 8 post infección. El hígado, fue analizado para DENV y ZIKV; los testículos y el cerebro para ZIKV. Los órganos positivos por RT-PCR durante la infección

del ZIKV o el DENV, se muestran en la tabla 6. Cerebro y testículos fueron positivos al ZIKV, mientras que en hígado no se pudo detectar el genoma de ambos virus. Sin embargo, el análisis por TEM reveló la presencia de CRs de ZIKV y DENV en hígado (Figura 29) y los complejos del ZIKV en testículo. En cerebro no se detectaron complejos probablemente por el procesamiento de la muestra (Figura 30).

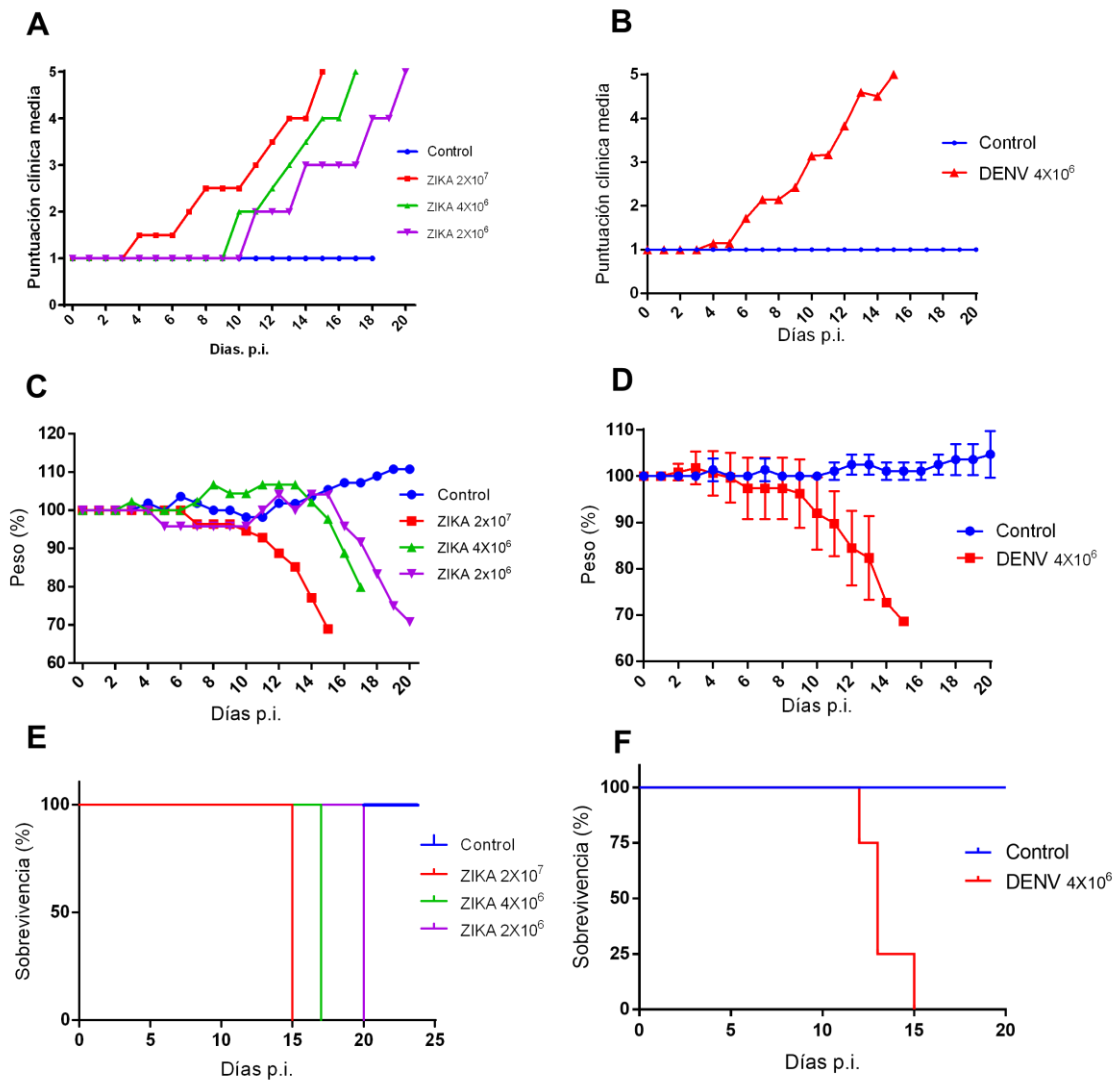


Figura 28. Caracterización de la enfermedad causada por ZIKV y DENV en ratones AG129. A B y C infección por ZIKV y B, D y E infección por DENV. A y B Indican la aparición y puntuación de los signos, C y D, representan el decaimiento del Peso de los animales, y E y F representan el tiempo de sobrevivida.

Hígado

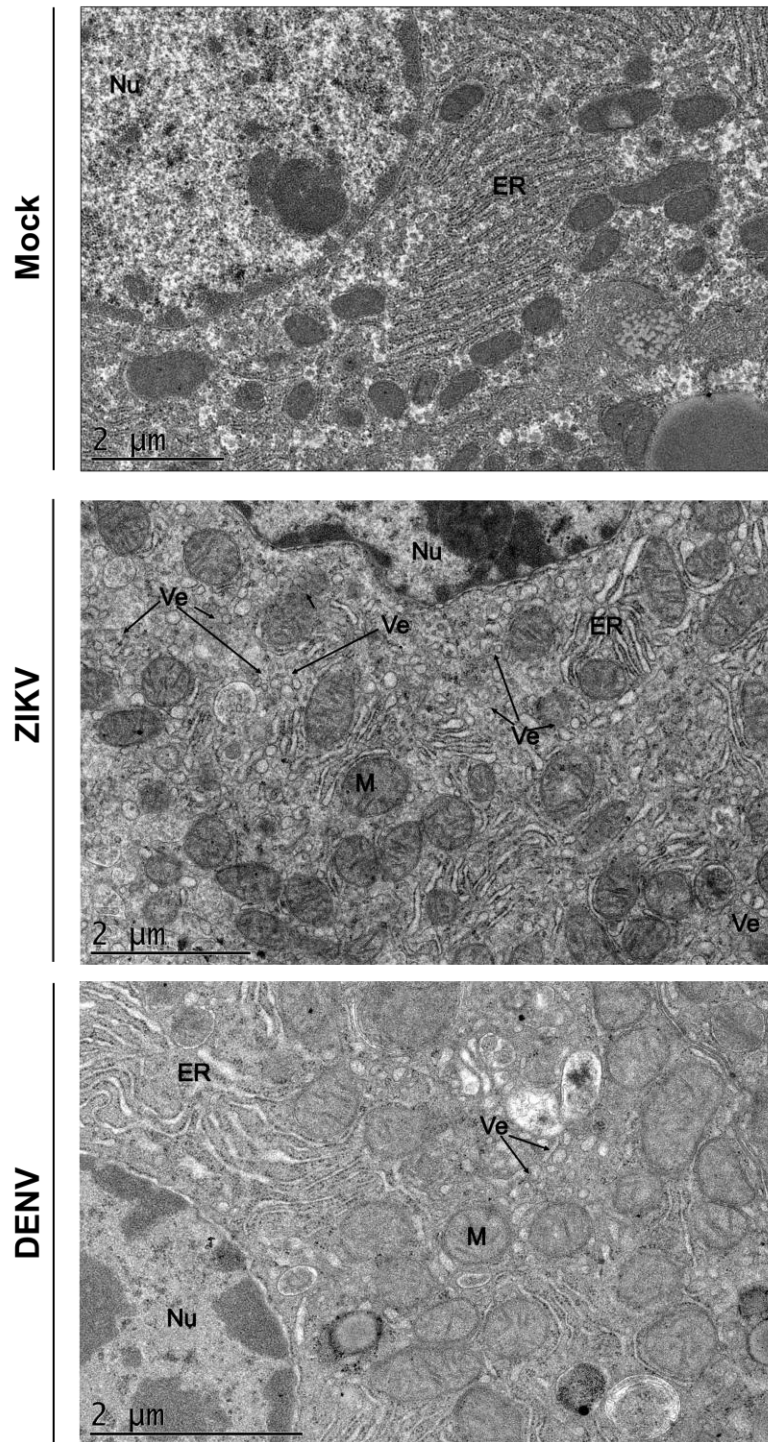


Figura 29. Complejos de replicación de ZIKV y DENV en hígados de ratón. Nu, núcleo; M, mitocondria, ER, Retículo endoplásmico, Ve, vesículas inducidas por flavivirus en ratones AG129 infectados con ZIKV y DENV

Testículo

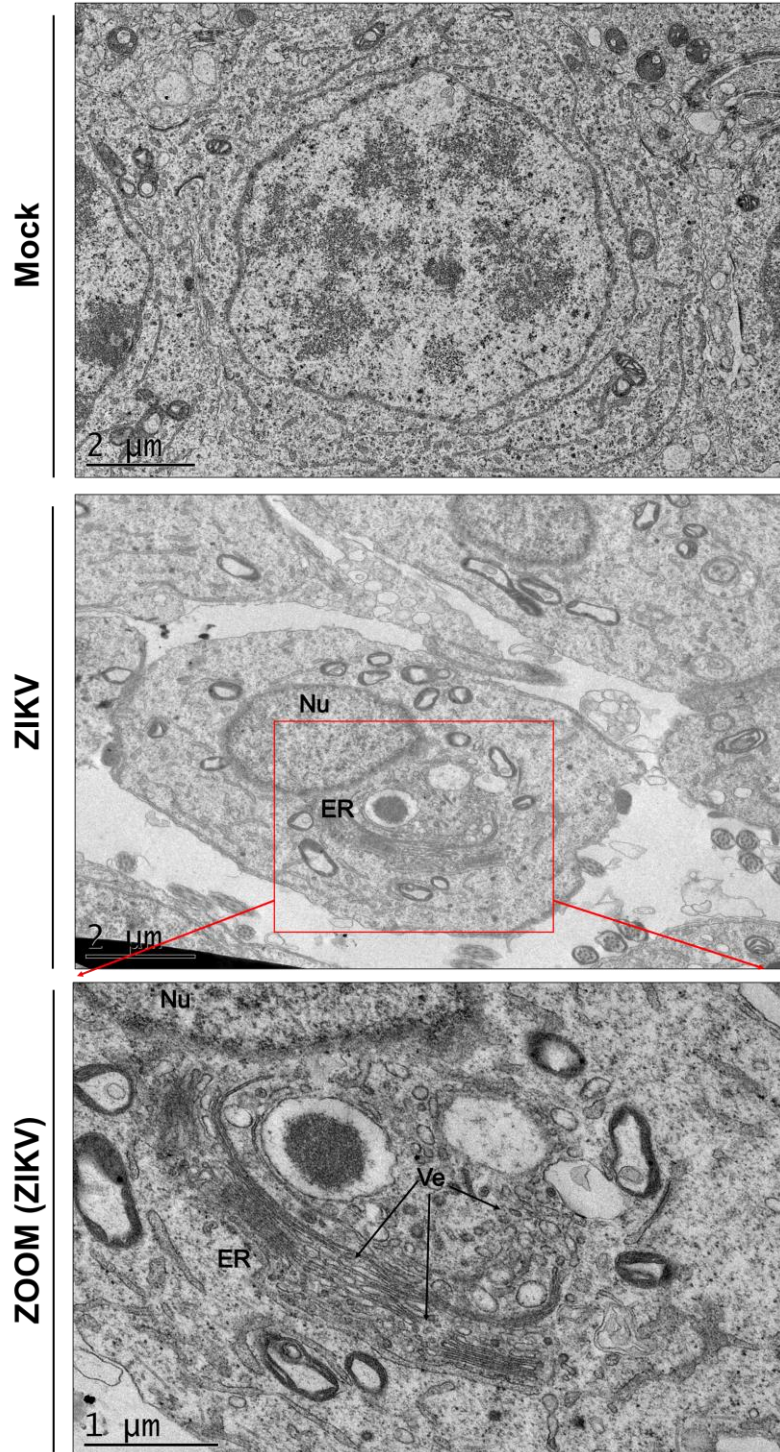


Figura 30. Complejos de replicación de ZIKV en testículos de ratón. Nu, núcleo; M, mitocondria, ER, Retículo endoplásmico, Ve, vesículas inducidas por ZIKV en ratones AG129.

Cerebro

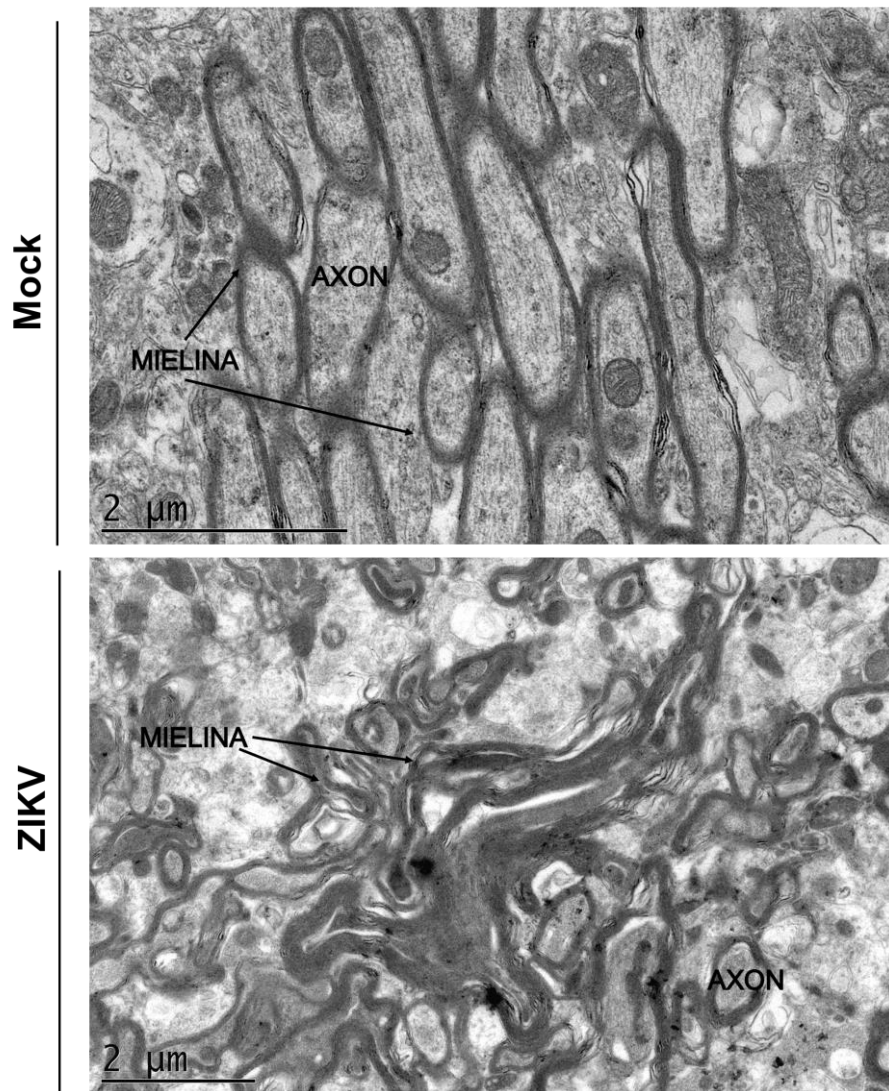
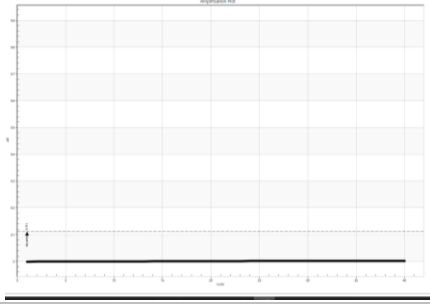
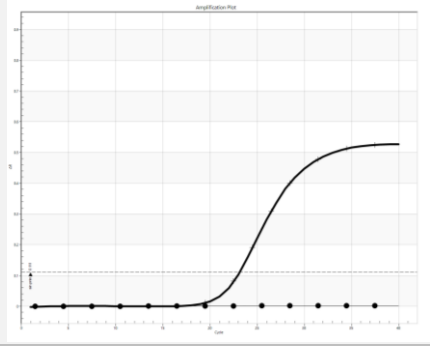
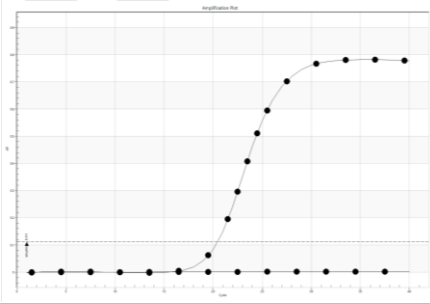
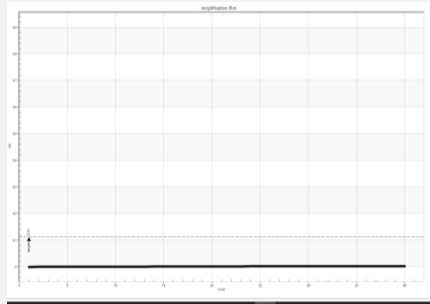


Figura 31. Microscopía electrónica de cerebros de ratones AG129 infectados con ZIKV.

Tabla 6. Detección de ZIKV y DENV en ratones AG129

Flavivirus	Órgano	TEM	RT-PCR
ZIKV	Hígado	CRs y VE presentes	<p>Negativa</p> 
	Testículo	CRs y VE presentes	<p>Positiva</p> 
	Cerebro	CRs y VE Ausentes	<p>Positiva</p> 
DENV	Hígado	CRs y VE presentes	<p>Negativa</p> 

7.13 La MET no protege a los ratones AG129 del ZIKV

Para determinar el efecto antiviral de MET, ratones AG129 fueron infectados vía intraperitoneal con 2×10^7 FFU de ZIKV o 4×10^6 FFU de DENV por ratón. El grupo tratado recibió 50 mg/kg/día de MET^{197,205} a partir del cuarto día postinfección y durante diez días o hasta el día de la eutanasia. El tiempo de supervivencia de ratones infectados con el ZIKV no mostró diferencias significativas en comparación con los tratados. Los signos de la enfermedad, la pérdida de peso y las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier fueron similares entre los ratones tratados y no tratados (Figura 32A–C), sugiriendo que la MET no protege a los ratones AG129 infectados por ZIKV.

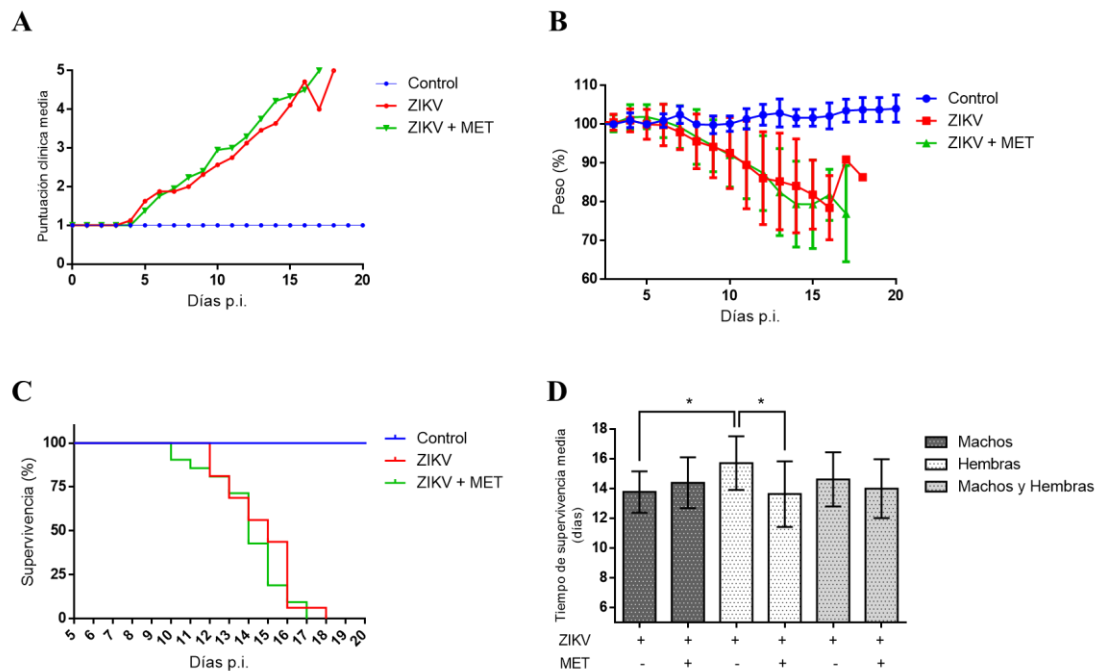


Figura 32. Efecto de la MET en ratones AG129 infectados con ZIKV. Signos (A), peso (B) y porcentaje de supervivencia (C). Los gráficos representan grupos de ratones de ambos sexos, excepto la gráfica (D), que muestra el tiempo de supervivencia promedio de machos, hembras y ambos sexos, con y sin tratamiento MET. El grupo "Control", está formado por ratones no infectados y tratados con MET; el grupo "ZIKV", por ratones infectados con ZIKV más el vehículo (H₂O); y el grupo "ZIKV + MET", por ratones inoculados con ZIKV y tratados con MET. Días postinfección (Días pi). (*) Indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados y no tratados con MET; el resumen de resultado se muestra en la Tabla 7.

Curiosamente, observamos una mediana de supervivencia más corta (no significativa) en ratones infectados y tratados con ZIKV (14 días), en comparación con los no tratados (16 días) y un tiempo de supervivencia media significativamente menor en ratones tratados (tratados, 14.63 ± 1.821 ; no tratados, 14.00 ± 1.975). Además, observamos un incremento de los signos clínicos graves (aumento de la parálisis en las extremidades) en ratones hembra infectadas y tratadas con MET (Tabla 5 y 7). Por esta razón, las hembras y los machos se analizaron como grupos separados (Figura 33). El resumen de los análisis agrupados por sexos se muestra en la Tabla 8.

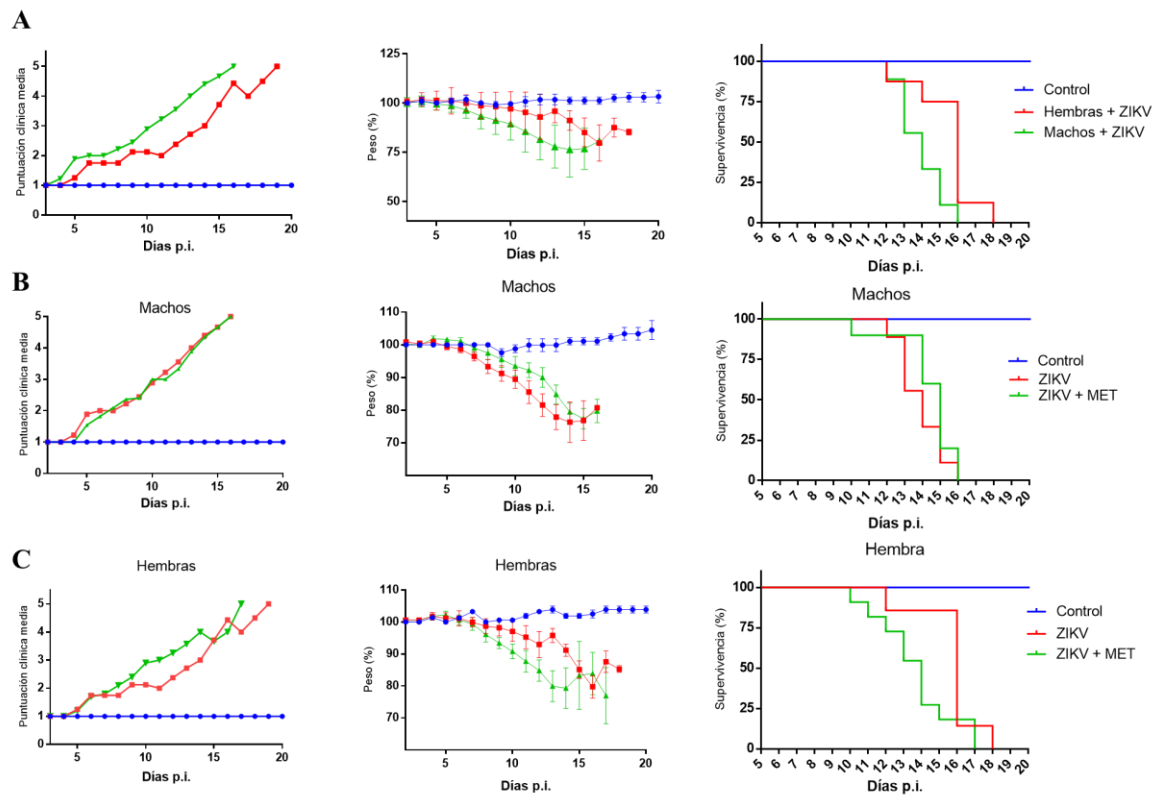


Figura 33. Efecto del tratamiento con MET en ratones hembra y machos AG129 infectados con ZIKV. Signos, peso y porcentaje de supervivencia de: (A) ratones hembra y macho infectados con ZIKV; (B) ratones macho infectados con ZIKV y tratados con MET; (C) ratones hembra infectados con ZIKV y tratados con MET. Días postinfección (Días pi); el resumen se muestra en la Tabla 8.

Los resultados de este análisis fueron los siguientes: 1) Existen diferencias en la enfermedad causada por ZIKV entre machos y hembras (sin tratamiento).

Las hembras presentaron retraso en la aparición de los signos de la enfermedad y en la pérdida de peso en comparación con los machos (Figura 33A). La mediana de supervivencia y el tiempo de supervivencia media en machos fue de 14 y 13.78 días, respectivamente, mientras que en los ratones hembra fue de 16 y 15.7, respectivamente (Figura 33A y tabla 8).

2) El tratamiento con MET no indujo cambios en la población de machos, tratados y no tratados (Figura 33B y tabla 8).

3) El tratamiento con MET provocó un aumento en la gravedad de los signos de infección y una disminución del tiempo de supervivencia media en hembras tratadas e infectados con ZIKV en comparación con hembras no tratadas (Figura 33C y tabla 8).

7.14 MET retrasa la aparición de los signos de la enfermedad, incrementando el tiempo de supervivencia de los ratones AG129 infectados con DENV.

Para determinar el efecto anti-DENV de MET, ratones AG129 fueron infectados vía intraperitoneal con 4×10^6 FFU de DENV serotipo 2. El esquema de tratamiento fue el mismo utilizado para ZIKV. El tratamiento mostró un retraso en la aparición de los signos y en el decaimiento del peso a causa de la enfermedad de DENV (Figura 34A, B). MET fue capaz de incrementar el tiempo de supervivencia con una mediana de 13 y 15 días y un tiempo de supervivencia media de 12.92 ± 2.10 y 14.83 ± 1.69 días, para los grupos no tratados y tratados respectivamente (Figura 34C, D y tabla 7). El análisis de los resultados reagrupados por sexo reveló que no existe diferencias en el desarrollo de la enfermedad de DENV entre hembras y machos (no tratados). La mediana de supervivencia fue de 13.5 y 13 días para machos y hembras, respectivamente, y el tiempo de supervivencia media de 13.13 ± 2.35 y 12.50 ± 1.73 ; 2) (Figura 35A). Por lo anterior, el efecto de la MET en hembras y machos fue el mismo.

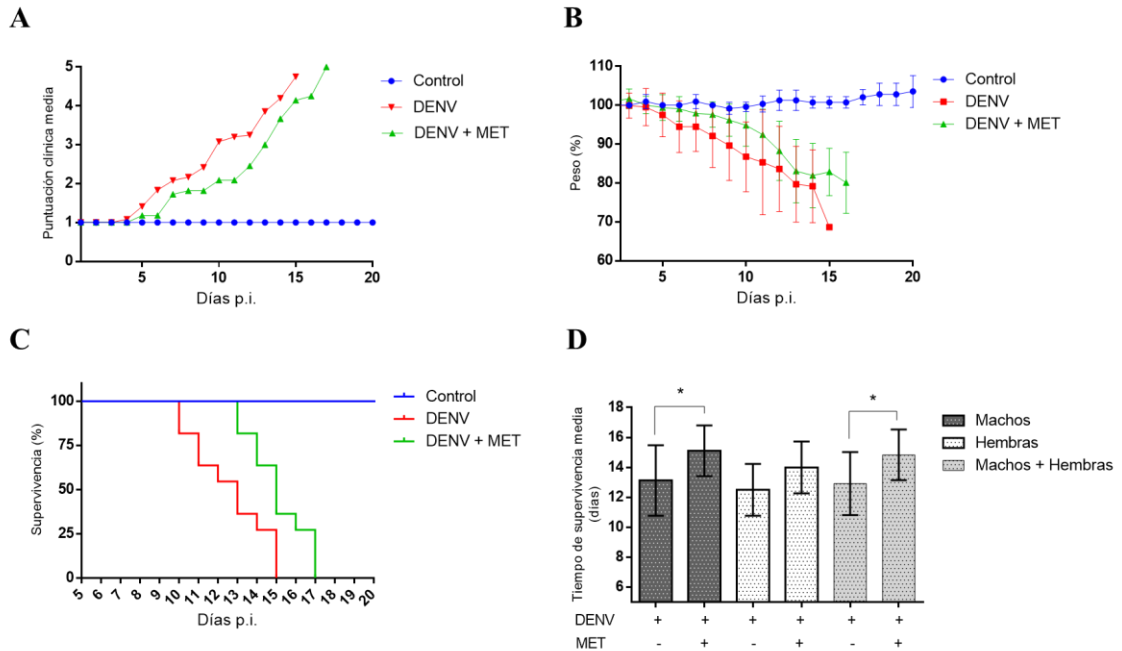


Figura 34. Efecto del tratamiento con MET en la supervivencia de ratones AG129 infectados con DENV. Signos (A), peso (B) y porcentaje de supervivencia (C). Los gráficos representan grupos de ratones de ambos sexos, excepto la gráfica (D), que muestra el tiempo de supervivencia promedio de machos, hembras y ambos sexos, con y sin tratamiento MET. El grupo "Control", está formado por ratones no infectados y tratados con MET; el grupo "DENV", por ratones infectados con DENV más el vehículo (H₂O); y el grupo "DENV + MET", por ratones que fueron inoculados con DENV y tratados con MET. Días postinfección (Días pi). (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados y no tratados con MET; el resumen de estos resultados se muestra en la Tabla 8.

La MET retrasó la aparición de los signos e incrementó el tiempo de supervivencia en hembras y machos infectados con DENV. En ratones macho infectados con DENV, la MET incrementó la mediana de supervivencia de 13.5 a 15 días y el tiempo de supervivencia media de 13.13 ± 2.35 a 15.11 ± 1.69 (Figura 35B y tabla 8). En hembras infectadas con DENV, la mediana de supervivencia se mantuvo en 13 días, entre grupos tratados y no tratados, sin embargo, el tiempo de supervivencia media incremento de 12.50 ± 1.73 a 14 ± 1.73 (Figura 35C y tabla 8).

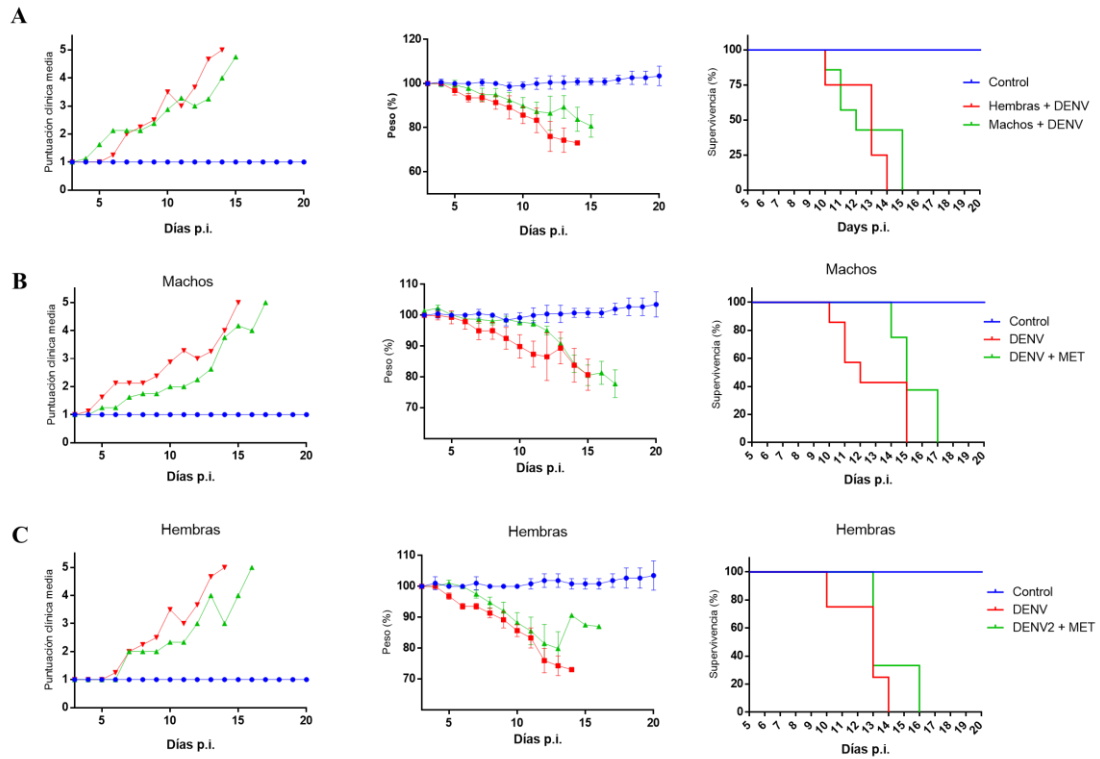


Figura 35. Efecto del tratamiento con MET en ratones hembra y machos AG129 infectados con DENV. Porcentaje de supervivencia, signos y peso de: (A) ratones hembra y macho infectados con DENV sin tratamiento. (B) Ratones macho infectados con DENV y tratados con MET. (C) Ratones hembra infectados con DENV y tratados con MET. Días postinfección (Días pi); el resumen de los ensayos de supervivencia se muestra en la Tabla 8.

Tabla 7. Efecto del tratamiento con MET en ratones AG129 infectados por ZIKV o DENV

Grupos de tratamientos	# eventos (n)	Mediana de supervivencia	Tiempo de supervivencia media (días)	¿Hay diferencia en las curvas de supervivencia?	¿Hay diferencia en el tiempo de supervivencia media?	Observaciones
ZIKV	16 (9 ♂, 7 ♀)	16	14.63±1.821	NO	NO	Exacerbación de los signos clínicos del ZIKV (aumento de la parálisis de las patas traseras y/o extremidades) en ratones hembra tratados con MET.
ZIKV + MET	21 (10 ♂, 11 ♀)	14	14.00±1.975			
DENV	12 (8 ♂, 3 ♀)	13	12.92±2.10	SI Log-rank (Mantel-Cox test) * p=0.0339	SI ANOVA-LSD	Los ratones tratados con MET mostraron signos leves de DENV y una mediana de supervivencia y un tiempo de vida media mayor a la de los ratones no tratados.
DENV + MET	12 (9 ♂, 4 ♀)	15	14.83±1.69	Gehan-Breslow-Wilcoxon test * p=0.0358	*p=0.0197	

Tabla 8. Efecto del tratamiento con MET en ratones AG129 infectados por ZIKV o DENV, analizados por sexo.

Ratón	Grupos	# eventos (n)	Mediana de supervivencia (días)	Tiempo de supervivencia media(días)	¿Hay diferencia en las curvas de supervivencia?	¿Hay diferencia en el tiempo de supervivencia media?	Observaciones
Macho	ZIKV	9	14	13.78±1.394	NO	NO	No hubo cambios entre los grupos
	ZIKV + MET	10	15	14.40±1.713			
Hembra	ZIKV	7	16	15.71±1.799	NO	SI	Los ratones tratados con MET mostraron signos graves de infección por ZIKV en comparación con los no tratados
	ZIKV + MET	11	14	13.64±2.203		ANOVA-LSD *p=0.0246	
Macho	DENV	8	13.5	13.13±2.35	NO	SI	Los ratones tratados con MET mostraron una enfermedad más leve del DENV en comparación con los no tratados.
	DENV + MET	9	15	15.11±1.69		ANOVA-LSD *p=0.0407	
Hembra	DENV	4	13	12.50±1.73	NO	NO	Los ratones tratados con MET mostraron una enfermedad más leve del DENV en comparación con los no tratados.
	DENV + MET	3	13	14±1.73			

7.15 Efecto de la MET sobre la carga viral del ZIKV en cerebros de ratón AG129

Debido a las manifestaciones exacerbadas de la enfermedad de ZIKV durante los tratamientos, decidimos analizar la carga viral del ZIKV en cerebros de ratones AG129 infectados y tratados con MET. Curiosamente, encontramos un ligero incremento (no estadísticamente significativo) de la carga viral del ZIKV en cerebros de ratones infectados y tratados, mientras que en los testículos no hubo cambio aparente entre ambos grupos.

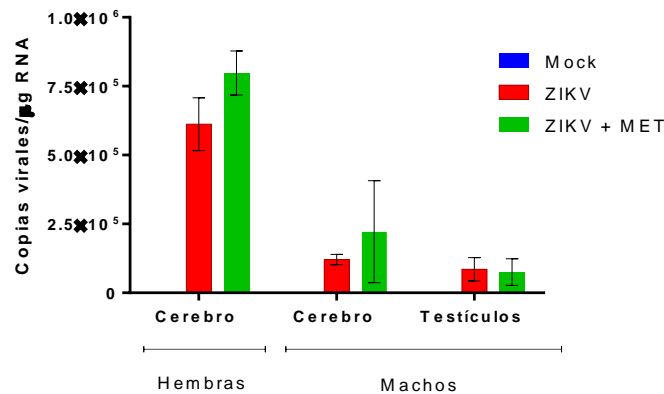


Figura 36. Efecto de MET en la carga viral de ZIKV. Los testículos y los cerebros de ratones hembra y machos infectadas con ZIKV y tratados con MET fueron analizados por qRT-PCR.

VIII DISCUSIÓN

Las enfermedades causadas por flavivirus continúan siendo uno de los problemas de salud más importantes a nivel mundial. Actualmente, no existe vacuna o agente terapéutico específico contra ZIKV y el uso de la vacuna DENV se ha restringido solo para individuos seropositivos^{8,206}. Por lo tanto, la búsqueda de nuevas estrategias para controlar las infecciones por flavivirus es fundamental. El reposicionamiento de fármacos aprobados por la FDA con propiedades antivirales para el tratamiento de infecciones causadas por flavivirus, es una estrategia prometedora, ya que al ser seguros para su uso en humanos, se evitan muchos de los procesos de desarrollo y producción farmacéutica, así como los procedimientos administrativos y burocráticos para su aprobación²⁰⁷.

Los fármacos con propiedades antivirales se pueden clasificar en dos grandes grupos: los dirigidos a componentes virales y los dirigidos al huésped que inhiben moléculas celulares clave que contribuyen al ciclo replicativo de los virus^{181–183}. Este último grupo alberga a los fármacos hipolipemiantes, que se caracterizan por interferir en diferentes vías metabólicas para la síntesis de lípidos, los cuales son requeridos para la replicación de los flavivirus⁷².

La MET es el derivado de la biguanida más utilizado alrededor del mundo para tratar la diabetes de tipo II, debido a sus efectos hipoglucemiantes^{208–210}, sin embargo, este fármaco también puede interferir con la síntesis de colesterol y ácidos grasos^{211,212}. Previamente nuestro grupo demostró que la MET podía inhibir la infección por DENV *in vitro*¹⁷⁶, sin embargo, su eficacia antiviral y su espectro anti-flavivirus no había sido estudiado. Aquí, demostramos que la MET es eficaz para inhibir al ZIKV, el DENV y el YFV *in vitro*, pero solo es eficaz contra el DENV en ratones AG129.

Primero, demostramos la eficacia de la MET para inhibir al virus ZIKV en células U-87 (glioblastoma) y Huh-7 (hepatocarcinoma) (Figura 15 y tabla 3) cada una de ellas representado un órgano blanco del virus en humanos. La

eficacia infectiva del ZIKV en ambas líneas celulares (Figura 13), fue ideal para calcular el índice de selectividad de la MET y para comparar su eficacia en distintos tipos de célula.

El índice de selectividad (SI), aplicado a la virología, es la relación entre la citotoxicidad y la actividad antiviral de un fármaco, y se calcula dividiendo la concentración citotóxica que causa el 50% de muerte celular, entre la concentración que inhibe el 50% de la infección (CC50/IC50). El fármaco ideal es aquél que causa toxicidad a concentraciones altas y un efecto antiviral a concentraciones muy bajas. Cuanto mayor sea el valor del SI, teóricamente el fármaco es más efectivo y seguro para su estudio en modelos *in vivo*. Por lo tanto, el SI es un parámetro ampliamente utilizado para expresar la eficacia antiviral *in vitro* de un compuesto^{213,214}.

Nuestros resultados mostraron que la concentración de MET para inhibir al 50% la infección por ZIKV (IC50) fue menor en células U-87 (5,84mM), que en las células Huh-7 (9.0 mM) (Figura 15); por consiguiente el SI de MET fue más alto en células U-87 (4.68) en comparación con Huh-7 (3.65) (Tabla 3). Esto sugiere una mayor eficacia anti-ZIKV en células de linaje neuronal, lo cual es ventajoso debido al neurotropismo del ZIKV^{40,215}.

Además, reportamos que la toxicidad de la MET en células de linaje neuronal es baja, en comparación con otro fármaco hipolipemiantes (LOV) con efecto anti-ZIKV¹⁸⁰ (Figura 16). Se sabe que las células neuronales suelen ser más sensibles a la depleción de lípidos ya que estos juegan un papel importante en el sistema nervioso central (SNC), como componentes estructurales de las membranas neuronales y como moléculas de señalización bioactivas²¹⁶. Sin embargo, los valores de CC50 de MET fueron similares en ambas líneas celulares, 32.9 mM en células huh-7 y 33.43 mM en U-87 (Figura 14), lo que sugería baja toxicidad.

Recientemente, se probó la eficacia *in vitro* de las estatinas (STA) durante la infección con ZIKV en células Vero. A excepción de la Cerivastatina, la mayoría de los valores del SI se reportaron entre 2.66 y 4.27, similar a nuestros resultados¹⁸⁰. Sin embargo, las células Vero no representan un órgano blanco en humanos para el ZIKV, por lo que, para comparar la toxicidad y eficacia antiviral de la MET, se calculó la IS de la Lovastatina (LOV), en células U-87 y Huh-7.

Nuestros resultados mostraron que la LOV fue altamente tóxica en las células U-87, incluso a bajas concentraciones (1uM por 24 hrs), por lo tanto, no fue posible calcular el SI (Tabla 3). Por otra parte, el tratamiento con LOV inhibió la infección del ZIKV en células hepáticas con mayor eficacia que MET, con un SI de 11,15 (Figura 16) (Tabla 3). Dos factores podrían explicar este resultado:

- 1) Como se mencionó anteriormente, la tolerancia celular a la depleción de lípidos es de suma relevancia para la toxicidad y eficacia antiviral. En este sentido, las células hepáticas, al especializarse en la síntesis y distribución de lípidos^{217,218}, suelen ser menos sensibles a la depleción lipídica. Esto permite que concentraciones relativamente altas del fármaco no generen toxicidad, como se muestra en la Figura 16 (CC50=231.9 uM/IC50 20.78 uM), favoreciendo así el efecto antiviral de la LOV en células hepáticas, pero no en las células de linaje neuronal, en donde el fármaco es altamente tóxico a bajas concentraciones.
- 2) Un segundo factor podría estar basado en el mecanismo de acción de ambos fármacos²¹⁹. Tal como se describió en la sección 2.3 “*Lípidos y el ciclo viral de los flavivirus*” la evidencia científica ha demostrado que lípidos como el colesterol son importantes en diferentes etapas del ciclo replicativo de los flavivirus^{72,163}. Por lo tanto, la inhibición de las enzimas que catalizan la biosíntesis de isoprenoides y colesterol ha demostrado ser eficaz contra el DENV y el ZIKV en modelos *in vitro*^{102,176,180}. En este sentido, las STA son los fármacos de elección para interferir con la vía biosintética del

colesterol²¹⁹, y se ha demostrado que tienen un amplio espectro anti-flavivirus al inhibir directamente la enzima HMGCR responsable de la síntesis de colesterol de *Novo*²²⁰. Estos fármacos son análogos estructurales de la HMG-CoA, un metabolito intermedio en la vía del mevalonato, por lo que inhiben competitivamente la HMGCR, la enzima limitante de esta vía, con una afinidad aproximadamente 1.000-10.000 veces mayor que el sustrato natural²¹⁷.

A diferencia de las STA, la MET puede inhibir la síntesis de lípidos, como el colesterol, de manera indirecta. Esto a través de la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK). El mecanismo de acción molecular de MET permanece en parte desconocido; sin embargo, se ha sugerido que al ser un catión, se acumula en la mitocondria por el gradiente eléctrico de la membrana interna, inhibiendo el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial ^{221,222}. Por lo tanto, MET inhibe la síntesis de ATP mitocondrial y en consecuencia la activación indirecta de AMPK, que es sensible al agotamiento de ATP²¹², regulando así negativamente la actividad de la HMGCR. En este contexto, es posible que la inhibición directa de HMGCR por LOV sea responsable de un mayor efecto antiviral, pero también de su alta toxicidad en comparación con la MET.

En lo que respecta al tratamiento, la MET redujo el número de células infectadas, el rendimiento viral y la síntesis de proteínas virales, pero no la entrada viral del ZIKV en células Huh-7 y U-87 infectadas con ZIKV (Figura 17, 18 y 19). El efecto antiviral fue dosis dependiente, y la reducción fue estadísticamente significativa en ambas líneas celulares a concentraciones iguales o superiores a 7,5 mM. Además, el análisis estadístico entre grupos tratados de ambas líneas celulares correlacionó con el SI, mostrando mayor eficacia anti-ZIKV de la MET en células U-87 que en células Huh-7, a la concentración de 15 mM (Figura 17 y 18).

Por otro lado, el pretratamiento y el tratamiento con MET durante la adsorción y entrada viral no afectó la infección del ZIKV (Figura 19). En conjunto estos

resultados sugieren que la MET afecta los pasos posteriores a la adsorción y entrada viral del ciclo replicativo del ZIKV, y que dicho efecto depende de la presencia del fármaco y concentración del fármaco.

La eficacia antiviral de la MET también fue probada con otros flavivirus, demostrando que virus como el DENV y el YFV son altamente sensibles al tratamiento con MET. Para este objetivo se utilizó como modelo *in vitro* las células Huh-7, donde fue calculado el SI de la MET para el DENV y YFV. Los valores de las IC50 fueron de 3.82 y 5.36 mM, y los valores del SI fueron 8.61 y 6.13 para DENV y YFV, respectivamente (Figura 21A; 22A y Tabla 4). El tratamiento inhibió los mismos parámetros evaluados del ciclo replicativo de ZIKV; porcentaje de células infectadas, rendimiento viral, y síntesis de proteínas virales en DENV (Figura 21B-E) y en YFV (Figura 22C, D; 24E). Además, se demostró mayor eficacia antiviral contra el DENV que contra el ZIKV (Figura 21B, C, E y Tabla 4). No podemos estar seguros de que MET haya sido más eficaz para inhibir la infección por YFV en comparación con ZIKV, debido a la diferencia de infectividad entre ambos virus (Figura 20).

En conjunto estos resultados muestran que la MET tiene un amplio espectro anti-flavivirus, probablemente al limitar los recursos lípidos necesarios para la formación de los complejos replicativos, como se ha sugerido actúan los fármacos hipolipemiantes^{72,163,176}. Como se mencionó anteriormente (sección 2.3.3.1), posterior a la entrada y liberación del genoma viral, inicia la traducción del ssRNA (+) que codifica diez proteínas, tres estructurales y siete no estructurales, las cuales se anclan al RE a través de su dominio transmembrana¹¹⁴. En este punto la interacción entre las proteínas virales y los lípidos celulares es esencial para formar los CR¹¹⁶; específicamente, la expresión de las proteínas no estructurales NS2B, NS4A y NS4B, se ha asociado a la remodelación de las membranas del RE¹¹⁷⁻¹¹⁹.

En este sentido, la reducción de lípidos y la reducción de proteínas no estructurales como NS4A a causa de los tratamientos con MET, podría

dificultar la formación de los CR, tal como se muestra en el análisis por microscopía confocal, en donde se observó una reducción significativa de la marca fluorescente de la proteína NS4A en los complejos replicativos de ZIKV, DENV y YFV, durante el tratamiento con MET (Figura 23B y 24B, E).

Conforme ocurre la traducción del genoma viral las proteínas no estructurales nacientes se concentran en estructuras similares a organelos que forman los CR, los cuales funcionan como fábricas de replicación del genoma viral (sección 2.3.3.1) en donde se localizan proteínas clave para la replicación, como la NS3, con actividad proteasa/helicasa, y la NS5, con actividad RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp)^{120,122,124}. Por consiguiente, la reducción de la proteína NS3 de ZIKV (Figura 18) y de DENV (Figura 21D), sugiere que este fármaco también afecta la replicación del RNA viral.

La proteína estructural E también disminuyó (Figura 23B y 24B, E) y de acuerdo con el índice del coeficiente de Pearson, los tratamientos con MET provocaron la deslocalización entre E y NS4A en los tres flavivirus (Figura 23C y 24C, F). Hay que destacar que la proximidad entre las proteínas virales estructurales y no estructurales en los CR es relevante para la replicación y ensamblaje de los flavivirus¹²⁴, por lo que la colocación de estas proteínas es un indicador de la integridad de los CR, tal como se observó en células infectadas con ZIKV, DENV y YFV sin tratamiento (Figura 23,A,C y 24,A,C,D,F). Por tanto, la MET al comprometer la integridad de los complejos replicativos, puede afectar indirectamente la replicación y la morfogénesis viral (Sección 2.3.3 y 2.3.4).

Además, el análisis ultraestructural por TEM de células Huh-7 infectadas con ZIKV, DENV o YFV demostró que los tratamientos con MET evitaron las alteraciones morfológicas y estructurales causadas por flavivirus, como la desorganización y el agrandamiento del RE, y las alteraciones morfológicas del núcleo (Figura 25 y 26). El tratamiento con MET también redujo de manera

significativa las Vesículas inducidas por flavivirus (Ve) (Figura 27), principales estructuras de los CR que se forman a partir de invaginaciones de membrana del RE ^{120,121,124}.

En conjunto nuestros resultados demuestran que la MET afecta el establecimiento y la formación de los CR, y por consiguiente la replicación, la traducción y la morfogénesis viral. Consecuentemente, la reducción de proteína y el bajo rendimiento viral provoca la reducción del porcentaje de células infectadas. Sin embargo, el mecanismo antiviral exacto de la MET se desconoce hasta el día de hoy.

Al igual que otros fármacos hipolipemiantes con efecto anti-flavivirus, el efecto antiviral de la MET se ha atribuido principalmente a su capacidad para depletar lípidos durante el establecimiento de la infección. Esto basado en la participación de los lípidos durante el ciclo replicativo de los flavivirus (Sección 2.3)^{72,163,223}. Como se mencionó anteriormente, existe evidencia que muestran que los flavivirus modifican el perfil lipídico de la células y la constitución lipídica de las membranas asociadas a los complejos (sección 2.3.3.2)^{81,116,117,126,127}. Estas alteraciones lipídicas son necesarias para la replicación (sección 2.3.3) y la morfogénesis viral (sección 2.3.4); así como para la adquisición de una envoltura viral de composición única (sección 2.3.1.1), necesaria para los procesos de entrada y fusión de membranas para la liberación del genoma viral (sección 2.3.1).

En otras palabras, el reordenamiento estructural y morfológico que sufre el RE está acompañado de un cambio en su composición lipídica, específicamente en las membranas asociadas a los CR. Dicho cambio se logra a través de la alteración de las vías metabólicas del huésped provocada por estos virus. Por ejemplo, se ha informado que la formación de complejos replicativos de DENV requiere colesterol y otras especies de lípidos ^{81,103}; en consecuencia, los tratamientos farmacológicos que reducen el colesterol disminuyen la infección viral^{176,177}. Asimismo, se ha confirmado la dependencia de la síntesis de lípidos

para ZIKV^{126,127,224–226}. Análisis lipidómicos han mostrado alteraciones en el perfil lipídico en células de mosquito¹²⁷, células microgliales²²⁴ y células de placenta fetal¹²⁶ debido a la reprogramación metabólica durante la infección por ZIKV. En general, la biosíntesis de ácidos grasos y la biosíntesis de colesterol, se encuentran alteradas en las infecciones por flavivirus, por lo que dichas vías se han propuesto como objetivos terapéuticos para su tratamiento del ZIKV y DENV (Sección 2.4)^{72,163}.

A diferencia de otros fármacos hipolipemiantes como las estatinas que inhiben directamente la vía de la síntesis de colesterol, la MET al activar a la proteína AMPK puede inactivar enzimas clave de diferentes vías metabólicas, como es la HMGCR y la ACC; además puede inhibir las diferentes isoformas de SREBPs y, por tanto, la expresión de genes relacionados con la biogénesis del colesterol, ácidos grasos y triglicéridos^{212,227}. Por lo tanto, la MET podría ejercer su efecto antiviral contra ZIKV al reducir la síntesis de ácidos grasos (sección 2.4.1) o contra DENV al reducir los niveles de colesterol (sección 2.4.2). Sin embargo, debido a la compleja regulación río debajo de AMPK, responsable de los efectos pleiotrópicos de la MET, no descartamos otros mecanismos que contribuyan al efecto antiviral de este fármaco.

Finalmente, se analizó el efecto del tratamiento con MET en un modelo de ratones inmunodeficientes AG129. Previo a los ensayos, describimos la enfermedad por ZIKV y DENV en ratones AG129, utilizando como referencia la escala de morbilidad para DENV reportado por Orozco et al. (2012)¹⁹⁸. Hay que destacar que los criterios descritos por Orozco et. al. Orozco et. al. (2012)¹⁹⁸, se cumplieron en los ratones AG129 infectados con DENV, mientras que para el ZIKV se adecuaron nuevos criterios (Tabla 5).

Ratones infectados con 4×10^6 UFF del DENV2 por ratón, (estandarizado previamente en nuestro laboratorio, datos no mostrados), fueron utilizados como control para caracterizar la enfermedad de ZIKV y para evaluar el efecto anti-DENV de MET. Los signos del DENV aparecieron entre el día 4-7 (Figura

28B) seguido de la caída del peso que comenzó entre el día 6-8 y que continuó hasta el día del deceso (Figura 28D). Después del día 10, los signos se agravaron rápidamente, al igual que la pérdida de peso. La mediana de supervivencia fue de 13 días (Figura 28F).

Aquí reportamos que la MET, retrasó la aparición de los signos de 2 a 3 días respecto al control de infección, día 4-7 no tratados y día 6-9 tratados (Figura 34A). Además, el tratamiento redujo los signos graves (Tabla 5 y 7), en comparación con los ratones no tratados. La curva de decaimiento del peso fue atenuada por el tratamiento con MET, siendo evidente hasta el día 8-10 (Figura 34B), en comparación con los ratones no tratados (día 6-8). Además, el tratamiento con MET aumentó significativamente la supervivencia (dos días) en comparación con los ratones no tratados, con una mediana de 15 y 13 días, y un tiempo de supervivencia media de 14.83 ± 1.69 y 12.92 ± 2.10 días, en ratones tratados y no tratados respectivamente (Figura 34C).

Por otro lado, el inoculo de 2×10^7 UFF del ZIKV, que se estandarizó para evaluar el efecto antiviral de la MET (Figura 28), provocó la aparición de los signos entre el día 4 y 7 (Figura 28A), el decaimiento del peso entre el día 7-10 (Figura 28C), y una mediana de supervivencia de 15 días (Figura 28E). Las principales diferencias entre DENV y ZIKV fueron, la frecuente aparición de signos graves, como parálisis de patas traseras/extremidades y temblores o ataxias en ratones infectados con ZIKV, tal como los reportó Lazear H. y colaboradores, 2016^{202,228}.

Curiosamente, el tratamiento con MET no logró prevenir ni retrasar la mortalidad de ratones infectados con ZIKV y no contrarrestó ningún signo de la enfermedad (Figura 32). Una posible explicación es que MET actúa principalmente en el hígado, uno de los principales órganos diana de la infección por DENV pero no de ZIKV^{209,210,229}. Contrario a lo esperado, observamos signos de gravedad y una disminución significativa del tiempo de

supervivencia media en hembras tratadas con MET en comparación con hembras no tratadas (Figura 32, tabla 7).

El análisis de nuestros resultados por sexo reveló diferencias en la enfermedad causada por el ZIKV entre machos y hembras, sin tratamiento (Figura 33A). Aunque no fue estadísticamente significativo, el tratamiento con MET redujo 2 días (de 16 a 14) la mediana de supervivencia en hembras y provocó un aumento en la gravedad de los signos de infección. Esta exacerbación de signos neurológicos podría explicarse al incremento del número de copias del genoma viral en los cerebros de ratones infectados y tratados (Figura 36). Sin embargo, este incremento no fue estadísticamente significativo, probablemente por el número de ratones utilizados por cada grupo (2 ratones por grupo). Curiosamente el tratamiento no ocasionó ningún cambio en la carga viral de los testículos (Figura 36). La explicación de este hecho podría estar relacionada con dos factores: (1) El efecto diferencial entre hembras y machos en respuesta a las infecciones virales^{230,231}; (2) y/o la regulación diferencial de AMPK en diferentes órganos por parte de los virus.

Por ejemplo, el sexo femenino se ha asociado con DENV severo²³² y una mayor frecuencia de infecciones sintomáticas por ZIKV²³³. En este contexto, estudios con ratones han sugerido que las hembras son las más afectadas por ZIKV²³⁴. Snyder-Keller et al. (2019) informaron un aumento de la muerte celular en cerebros de ratones hembra 129S1 en comparación con ratones macho. Aunque no hubo evidencia de que los niveles de ZIKV fueran más altos en los ratones hembra que en los machos, los eventos neuropatológicos que desencadenaron una necrosis más significativa y la acumulación de calcificaciones en el cerebro de los ratones hembra fueron notables²³⁴. Sin embargo, al igual que Snyder-Keller y colaboradores, nuestro estudio fue realizado en un modelo inmunodeficiente, por lo que la respuesta diferencial entre hembras y machos podría relacionarse también con factores neuroendocrinos y su desregulación durante la infección con el ZIKV, y durante los tratamientos con MET.

El segundo factor se basa en la proteína AMPK, que puede estar regulada positiva o negativamente por diferentes virus. Se ha informado que el virus de la hepatitis C (VHC) ^{235,236}el virus de Epstein-Bar (EBV) ²³⁷ y el DENV ¹⁷⁶ pueden regular a la baja la forma activa de AMPK, fosforilada en Thr-172 (pAMPK). Tal inactivación proporciona un entorno lipídico del huésped favorable para la replicación. Por el contrario, la infección por citomegalovirus humano (HCMV) aumenta la activación de AMPK para la importación de glucosa y la vía glucolítica, esenciales durante la replicación del HCMV²³⁴.

Curiosamente, se han informado diferentes efectos sobre la proteína AMPK durante la infección por ZIKV. Chen et al. (2018) informaron que durante la infección por ZIKV, hay una disminución de pAMPK en las células HRvEC y HUVEC. En este sentido, la activación farmacológica de AMPK utilizando GSK621, AICAR o MET induce la reducción de la replicación de ZIKV ^{190,238} y DENV¹⁰³ en células HUVEC y Huh-7, respectivamente.

En contraste, Thaker y colaboradores (2019) han informado de un aumento en la forma activa de pAMPK durante la infección por ZIKV en tejido cerebral de ratones *Infar1* ^{-/-}, en HFF-1 humano (línea celular de fibroblastos del prepucio) y células hFRPE (epitelio de pigmento retinal fetal humano). Este último estudio sugirió que la activación de AMPK promueve la muerte celular mediada por caspasa ²³⁹.

Por lo tanto, queda por determinar si ZIKV puede modular diferencialmente la proteína AMPK en diferentes órganos. En este caso, MET podría tener un doble efecto, contrarrestando la infección en tejidos específicos y contribuyendo a la patología y muerte celular en otros. Teniendo en cuenta todo lo anterior, el empeoramiento de los signos neurológicos de ZIKV en ratones hembra requerirá más estudios. En conjunto nuestros resultados sugieren que el tratamiento con MET podría atenuar y/o prevenir formas graves de infección por DENV, pero no las del ZIKV.

IX CONCLUSIONES

Aquí, informamos el potencial antiviral *in vitro* e *in vivo* de MET contra ZIKV en comparación con el efecto contra DENV. Los resultados *in vitro* mostraron que MET inhibe la infección por ZIKV en diferentes líneas celulares, lo que sugiere que este efecto persiste independientemente del tipo de célula. Al mismo tiempo, hemos reportado que su eficacia depende de su toxicidad, la cual es célula dependiente, y que muy probablemente está relacionada con la tolerancia de cada célula a la reducción del colesterol. En este sentido, demostramos que la baja toxicidad de la MET en célula de linaje neuronal pone en ventaja a este fármaco comparado con otros fármacos hipolipemiantes que se ha propuesto para tratar infecciones por flavivirus, tal es el caso de la Lovastatina. También demostramos el amplio espectro anti-flavivirus de MET y una mayor eficacia en la inhibición del DENV, *in vitro* e *in vivo*. Curiosamente, MET no contrarrestó la enfermedad de ZIKV *in vivo*, por el contrario, se observaron signos graves exacerbados en hembras, lo cual requiere de más estudios para determinar si la MET es un factor de riesgo en hembras. En los ensayos *in vivo* con DENV, la MET aumentó el tiempo de supervivencia de los ratones infectados con DENV y disminuyó la gravedad de la enfermedad. Juntos, estos hallazgos indican que MET es un agente antiviral eficaz para inhibir la infección por DENV. Hay que destacar que la MET tiene efectos distintos sobre las infecciones causadas por ZIKV y DENV, aunque pertenecen a la misma familia, por lo que es importante el estudio de los mecanismos moleculares “fármaco-virus” para conocer la eficacia y el riesgo de los tratamientos durante las infecciones por flavivirus.

X PERSPECTIVAS

Mecanismos y patogenicidad de los virus

- Caracterizar la modulación de la proteína AMPK a causa de las infecciones por ZIKV y DENV en diferentes órganos blanco, utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*.

Efecto anti-DENV de la MET

- Analizar los mecanismos antivirales de la MET, AMPK-dependientes y AMPK independientes.
- Estudiar *in vitro* e *in vivo* el efecto de la MET en combinación con otros fármacos con propiedades antivirales, como posible terapia para el tratamiento de infección por DENV.

Posibles efectos adversos de la MET en hembras durante la infección por ZIKV.

- Descartar efectos adversos de la MET y de los fármacos hipolipemiantes en ratones hembra, competentes e inmunodeficientes, durante la infección por ZIKV.
- Evaluar la seguridad del tratamiento de la MET y de los fármacos hipolipemiantes en ratones hembra gestantes infectadas con ZIKV.

XI. REFERENCIAS

1. Simmonds, P. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *J. Gen. Virol.* **98**, 2–3 (2017).
2. Lindenbach, B. D., Thiel, H.-J. & Rice, C. M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. 52 (2006).
3. Family - Flaviviridae. in *Virus Taxonomy* (eds. King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B. & Lefkowitz, E. J.) 1003–1020 (Elsevier, 2012). doi:10.1016/B978-0-12-384684-6.00086-0.
4. Bhatt, S. *et al.* The global distribution and burden of dengue. *Nature* **496**, 504–507 (2013).
5. Ali, S. *et al.* Environmental and Social Change Drive the Explosive Emergence of Zika Virus in the Americas. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, e0005135 (2017).
6. Kok, W. M. New developments in flavivirus drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **11**, 433–445 (2016).
7. Arredondo-García, J. L. *et al.* Four-year safety follow-up of the tetravalent dengue vaccine efficacy randomized controlled trials in Asia and Latin America. *Clin. Microbiol. Infect.* **24**, 755–763 (2018).
8. Poland, G. A., Ovsyannikova, I. G. & Kennedy, R. B. Zika Vaccine Development: Current Status. *Mayo Clin. Proc.* **94**, 2572–2586 (2019).
9. What is a Mosquito? | CDC. *Centers for Disease Control and Prevention* <https://www.cdc.gov/mosquitoes/about/what-is-a-mosquito.html> (2020).
10. Transmisión | Dengue | CDC. *Centers for Disease Control and Prevention* <https://www.cdc.gov/dengue/es/transmission/index.html> (2019).
11. Saiz, J.-C. *et al.* Zika Virus: the Latest Newcomer. *Front. Microbiol.* **7**, (2016).
12. El dengue en el mundo | Dengue | CDC. <https://www.cdc.gov/dengue/es/areaswithrisk/around-the-world.html> (2021).
13. Ciclo de vida de Aedes aegypti y Aedes albopictus | CDC. *Centers for Disease Control and Prevention* <https://www.cdc.gov/mosquitoes/es/about/life-cycles/aedes.html> (2022).
14. Gao, D. *et al.* Prevention and Control of Zika as a Mosquito-Borne and Sexually Transmitted Disease: A Mathematical Modeling Analysis. *Sci. Rep.* **6**, 28070 (2016).
15. Counotte, M. J. *et al.* Sexual transmission of Zika virus and other flaviviruses: A living systematic review. *PLoS Med.* **15**, e1002611 (2018).
16. Mlakar, J. *et al.* Zika Virus Associated with Microcephaly. *N. Engl. J. Med.* **374**, 951–958 (2016).
17. Organization, W. H. Zika strategic response framework and joint operations plan, January-June 2016. (2016).
18. Barjas-Castro, M. L. *et al.* Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. *Transfusion (Paris)* **56**, 1684–1688 (2016).
19. Basurko, C. *et al.* Estimating the Risk of Vertical Transmission of Dengue: A Prospective Study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **98**, 1826–1832 (2018).
20. Sinhabahu, V. P., Sathananthan, R. & Malavige, G. N. Perinatal transmission of dengue: a case report. *BMC Res. Notes* **7**, 795 (2014).

21. Fourié, T., Grard, G., Lepercq-Goffart, I., Briolant, S. & Fontaine, A. Variability of Zika Virus Incubation Period in Humans. *Open Forum Infect. Dis.* **5**, ofy261 (2018).
22. Chan, M. & Johansson, M. A. The Incubation Periods of Dengue Viruses. *PLoS ONE* **7**, e50972 (2012).
23. Síntomas y tratamiento del Dengue | CDC. *Centers for Disease Control and Prevention*
<https://www.cdc.gov/dengue/es/symptoms/index.html> (2021).
24. Lo que sabemos acerca del zika. *Centers for Disease Control and Prevention*
<https://www.cdc.gov/zika/es/about/overview.html> (2019).
25. Duffy, M. R. *et al.* Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2536–2543 (2009).
26. Zanoluca, C. *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **110**, 569–572 (2015).
27. Lanciotti, R. S. *et al.* Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 1232–1239 (2008).
28. Angel-Ambrocio, A. H. *et al.* An embryonic heart cell line is susceptible to dengue virus infection. *Virus Res.* **198**, 53–58 (2015).
29. Dick, G. W. A., Kitchen, S. F. & Haddock, A. J. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **46**, 509–520 (1952).
30. Karimi, O. *et al.* Thrombocytopenia and subcutaneous bleedings in a patient with Zika virus infection. *The Lancet* **387**, 939–940 (2016).
31. Brasil, P. *et al.* Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N. Engl. J. Med.* **375**, 2321–2334 (2016).
32. de Fatima Vasco Aragao, M. *et al.* Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. *The BMJ* **353**, (2016).
33. Datos sobre la microcefalia | CDC. *Centers for Disease Control and Prevention*
<https://www.cdc.gov/ncbddd/spanish/birthdefects/microcephaly.html> (2016).
34. Cauchemez, S. *et al.* Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: a retrospective study. *Lancet Lond. Engl.* **387**, 2125–2132 (2016).
35. Cao-Lormeau, V.-M. *et al.* Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *The Lancet* **387**, 1531–1539 (2016).
36. do Rosário, M. S. *et al.* Guillain-Barré Syndrome after Zika Virus Infection in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **95**, 1157–1160 (2016).
37. Counotte, M. J. *et al.* Zika virus infection as a cause of congenital brain abnormalities and Guillain-Barré syndrome: From systematic review to living systematic review. *F1000Research* **7**, (2018).
38. Oehler, E. *et al.* Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. *Eurosurveillance* **19**, 20720 (2014).

39. dos Santos, T. *et al.* Zika Virus and the Guillain–Barré Syndrome — Case Series from Seven Countries. (2016) doi:10.1056/NEJMc1609015.
40. Tang, H. *et al.* Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell* **18**, 587–590 (2016).
41. Dang, J. *et al.* Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell Stem Cell* **19**, 258–265 (2016).
42. Furtado, J. M., Espósito, D. L., Klein, T. M., Teixeira-Pinto, T. & da Fonseca, B. A. Uveitis Associated with Zika Virus Infection. (2016) doi:10.1056/NEJMc1603618.
43. de Paula Freitas, B. *et al.* Ocular Findings in Infants With Microcephaly Associated With Presumed Zika Virus Congenital Infection in Salvador, Brazil. *JAMA Ophthalmol.* **134**, 529–535 (2016).
44. Wu, Y. *et al.* A unique case of human Zika virus infection in association with severe liver injury and coagulation disorders. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
45. San Martín, J. L. *et al.* The Epidemiology of Dengue in the Americas Over the Last Three Decades: A Worrisome Reality. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **82**, 128–135 (2010).
46. Harris, E. *et al.* Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **63**, 5–11 (2000).
47. Manejo de Casos de Dengue.
48. Dengue: Guías para la atención de enfermos en la Región de las Américas (2ª Edición) - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. <https://www.paho.org/es/documentos/dengue-guias-para-atencion-enfermos-region-americas-2a-edicion>.
49. Dengue and severe dengue. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>.
50. CDC. Virus del Zika. *Centers for Disease Control and Prevention* <https://www.cdc.gov/zika/es/index.html> (2019).
51. Zika Travel Information | Travelers' Health | CDC. <https://wwwnc.cdc.gov/travel/page/zika-travel-information>.
52. Salud, S. de. Casos Confirmados de Infección por Virus Zika 2022. *gob.mx* <http://www.gob.mx/salud/documentos/casos-confirmados-de-infeccion-por-virus-zika-2022>.
53. Salud, S. de. ZIKA Información Relevante. *gob.mx* <http://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/zika-informacion-relevante>.
54. Rodríguez, D. G. G. DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA.
55. Brady, O. J. *et al.* Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, e1760 (2012).
56. Areas con riesgo de dengue | CDC. *Centers for Disease Control and Prevention* <https://www.cdc.gov/dengue/es/areaswithrisk/around-the-world.html> (2023).
57. Salud, S. de. Panorama Epidemiológico de Dengue 2022. *gob.mx* <http://www.gob.mx/salud/documentos/panorama-epidemiologico-de-dengue-2022>.

58. PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DE DENGUE. (2023).
59. Zhang, W. *et al.* Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 907–912 (2003).
60. Kostyuchenko, V. A. *et al.* Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature* **533**, 425–428 (2016).
61. Sirohi, D. *et al.* The 3.8Å resolution cryo-EM structure of Zika Virus. *Science* **352**, 467–470 (2016).
62. Rj, K. *et al.* Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* **108**, (2002).
63. Cordero-Rivera, C. D. *et al.* The importance of viral and cellular factors on flavivirus entry. *Curr. Opin. Virol.* **49**, 164–175 (2021).
64. Begum, F., Das, S., Mukherjee, D., Mal, S. & Ray, U. Insight into the Tropism of Dengue Virus in Humans. *Viruses* **11**, 1136 (2019).
65. Martina, B. E. E., Koraka, P. & Osterhaus, A. D. M. E. Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 564–581 (2009).
66. Miner, J. J. & Diamond, M. S. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host Microbe* **21**, 134–142 (2017).
67. Nowakowski, T. J. *et al.* Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Human Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell* **18**, 591–596 (2016).
68. Ma, W. *et al.* Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice. *Cell* **167**, 1511-1524.e10 (2016).
69. Tabata, T. *et al.* Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host Microbe* **20**, 155–166 (2016).
70. Chen, J. C. *et al.* Infection of human uterine fibroblasts by Zika virus in vitro: implications for viral transmission in women. *Int. J. Infect. Dis.* **51**, 139–140 (2016).
71. Bhatnagar, J. *et al.* Zika Virus RNA Replication and Persistence in Brain and Placental Tissue. *Emerg. Infect. Dis.* **23**, 405–414 (2017).
72. Farfan-Morales, C. N. *et al.* Anti-flavivirus Properties of Lipid-Lowering Drugs. *Front. Physiol.* **12**, 1746 (2021).
73. Reddy, T. & Sansom, M. S. P. The Role of the Membrane in the Structure and Biophysical Robustness of the Dengue Virion Envelope. *Struct. England* **24**, 375–382 (2016).
74. Brügger, B. *et al.* The HIV lipidome: A raft with an unusual composition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 2641–2646 (2006).
75. Gerl, M. J. *et al.* Quantitative analysis of the lipidomes of the influenza virus envelope and MDCK cell apical membrane. *J. Cell Biol.* **196**, 213–221 (2012).
76. Kalvodova, L. *et al.* The lipidomes of vesicular stomatitis virus, semliki forest virus, and the host plasma membrane analyzed by quantitative shotgun mass spectrometry. *J. Virol.* **83**, 7996–8003 (2009).

77. Merz, A. *et al.* Biochemical and Morphological Properties of Hepatitis C Virus Particles and Determination of Their Lipidome. *J. Biol. Chem.* **286**, 3018–3032 (2011).
78. Martín-Acebes, M. A. *et al.* The Composition of West Nile Virus Lipid Envelope Unveils a Role of Sphingolipid Metabolism in Flavivirus Biogenesis. *J. Virol.* **88**, 12041–12054 (2014).
79. Aizaki, H. *et al.* Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J. Virol.* **82**, 5715–5724 (2008).
80. Callens, N. *et al.* Morphology and Molecular Composition of Purified Bovine Viral Diarrhea Virus Envelope. *PLoS Pathog.* **12**, e1005476 (2016).
81. Perera, R. *et al.* Dengue Virus Infection Perturbs Lipid Homeostasis in Infected Mosquito Cells. *PLoS Pathog.* **8**, e1002584 (2012).
82. Meertens, L. *et al.* The TIM and TAM Families of Phosphatidylserine Receptors Mediate Dengue Virus Entry. *Cell Host Microbe* **12**, 544–557 (2012).
83. Richard, A. S. *et al.* Virion-associated phosphatidylethanolamine promotes TIM1-mediated infection by Ebola, dengue, and West Nile viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 14682–14687 (2015).
84. Carro, A. C. & Damonte, E. B. Requirement of cholesterol in the viral envelope for dengue virus infection. *Virus Res.* **174**, 78–87 (2013).
85. Lee, C.-J., Lin, H.-R., Liao, C.-L. & Lin, Y.-L. Cholesterol Effectively Blocks Entry of Flavivirus. *J. Virol.* **82**, 6470–6480 (2008).
86. Sun, X. & Whittaker, G. R. Role for Influenza Virus Envelope Cholesterol in Virus Entry and Infection. *J. Virol.* **77**, 12543–12551 (2003).
87. Agrelli, A., de Moura, R. R., Crovella, S. & Brandão, L. A. C. ZIKA virus entry mechanisms in human cells. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **69**, 22–29 (2019).
88. Amara, A. & Mercer, J. Viral apoptotic mimicry. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 461–469 (2015).
89. Cruz-Oliveira, C. *et al.* Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**, 155–170 (2015).
90. Jemielity, S. *et al.* TIM-family Proteins Promote Infection of Multiple Enveloped Viruses through Virion-associated Phosphatidylserine. *PLoS Pathog.* **9**, (2013).
91. van der Schaar, H. M. *et al.* Dissecting the Cell Entry Pathway of Dengue Virus by Single-Particle Tracking in Living Cells. *PLoS Pathog.* **4**, (2008).
92. Hamel, R. *et al.* Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J. Virol.* **89**, 8880–8896 (2015).
93. Bhattacharyya, S. *et al.* Enveloped Viruses Disable Innate Immune Responses in Dendritic Cells by Direct Activation of TAM Receptors. *Cell Host Microbe* **14**, 136–147 (2013).
94. Carnec, X. *et al.* The Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine Receptor CD300a Binds Dengue Virus and Enhances Infection. *J. Virol.* **90**, 92–102 (2015).
95. Regen, S. L. The Origin of Lipid Rafts. *Biochemistry* **59**, 4617–4621 (2020).

96. Diwaker, D., Mishra, K. P., Ganju, L. & Singh, S. B. Protein disulfide isomerase mediates dengue virus entry in association with lipid rafts. *Viral Immunol.* **28**, 153–160 (2015).
97. Lee, C.-J., Liao, C.-L. & Lin, Y.-L. Flavivirus Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling To Block Caspase-Dependent Apoptotic Cell Death at the Early Stage of Virus Infection. *J. Virol.* **79**, 8388–8399 (2005).
98. Puerta-Guardo, H. *et al.* Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in U937 cells requires cholesterol-rich membrane microdomains. *J. Gen. Virol.* **91**, 394–403.
99. Reyes-del Valle, J., Chávez-Salinas, S., Medina, F. & del Angel, R. M. Heat Shock Protein 90 and Heat Shock Protein 70 Are Components of Dengue Virus Receptor Complex in Human Cells. *J. Virol.* **79**, 4557–4567 (2005).
100. Acosta, E. G., Castilla, V. & Damonte, E. B. Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. *Cell. Microbiol.* **11**, 1533–1549 (2009).
101. Mosso, C., Galván-Mendoza, I. J., Ludert, J. E. & del Angel, R. M. Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. *Virology* **378**, 193–199 (2008).
102. Rothwell, C. *et al.* Cholesterol biosynthesis modulation regulates dengue viral replication. *Virology* **389**, 8–19 (2009).
103. Soto-Acosta, R. *et al.* The increase in cholesterol levels at early stages after dengue virus infection correlates with an augment in LDL particle uptake and HMG-CoA reductase activity. *Virology* **442**, 132–147 (2013).
104. García Cordero, J., León Juárez, M., González-Y-Merchand, J. A., Cedillo Barrón, L. & Gutiérrez Castañeda, B. Caveolin-1 in Lipid Rafts Interacts with Dengue Virus NS3 during Polyprotein Processing and Replication in HMEC-1 Cells. *PLoS ONE* **9**, (2014).
105. Medigeshi, G. R., Hirsch, A. J., Streblow, D. N., Nikolich-Zugich, J. & Nelson, J. A. West Nile virus entry requires cholesterol-rich membrane microdomains and is independent of alphavbeta3 integrin. *J. Virol.* **82**, 5212–5219 (2008).
106. Kaufmann, B. & Rossmann, M. G. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* **13**, 1–9 (2011).
107. Zaitseva, E., Yang, S.-T., Melikov, K., Pourmal, S. & Chernomordik, L. V. Dengue Virus Ensures Its Fusion in Late Endosomes Using Compartment-Specific Lipids. *PLoS Pathog.* **6**, (2010).
108. Stiasny, K. & Heinz, F. X. Effect of membrane curvature-modifying lipids on membrane fusion by tick-borne encephalitis virus. *J. Virol.* **78**, 8536–8542 (2004).
109. Tani, H. *et al.* Involvement of Ceramide in the Propagation of Japanese Encephalitis Virus. *J. Virol.* **84**, 2798–2807 (2010).
110. Gollins, S. W. & Porterfield, J. S. pH-dependent fusion between the flavivirus West Nile and liposomal model membranes. *J. Gen. Virol.* **67 (Pt 1)**, 157–166 (1986).
111. Moesker, B., Rodenhuis-Zybert, I. A., Meijerhof, T., Wilschut, J. & Smit, J. M. Characterization of the functional requirements of West Nile virus membrane fusion. *J. Gen. Virol.* **91**, 389–393 (2010).

112. Stiasny, K., Koessl, C. & Heinz, F. X. Involvement of Lipids in Different Steps of the Flavivirus Fusion Mechanism. *J. Virol.* **77**, 7856–7862 (2003).
113. Umashankar, M. *et al.* Differential Cholesterol Binding by Class II Fusion Proteins Determines Membrane Fusion Properties. *J. Virol.* **82**, 9245–9253 (2008).
114. Barrows, N. J. *et al.* Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chem. Rev.* **118**, 4448–4482 (2018).
115. Murray, C. L., Jones, C. T. & Rice, C. M. Architects of Assembly: roles of Flaviviridae nonstructural proteins in virion morphogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 699–708 (2008).
116. Chotiwan, N. *et al.* Dynamic remodeling of lipids coincides with dengue virus replication in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS Pathog.* **14**, e1006853 (2018).
117. Leier, H. C. *et al.* A global lipid map defines a network essential for Zika virus replication. *Nat. Commun.* **11**, 3652 (2020).
118. León-Juárez, M. *et al.* Recombinant Dengue virus protein NS2B alters membrane permeability in different membrane models. *Viol. J.* **13**, 1 (2016).
119. Miller, S., Kastner, S., Krijnse-Locker, J., Bühler, S. & Bartenschlager, R. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J. Biol. Chem.* **282**, 8873–8882 (2007).
120. Cortese, M. *et al.* Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Rep.* **18**, 2113–2123 (2017).
121. Hanners, N. W. *et al.* Western Zika Virus in Human Fetal Neural Progenitors Persists Long Term with Partial Cytopathic and Limited Immunogenic Effects. *Cell Rep.* **15**, 2315–2322 (2016).
122. Junjhon, J. *et al.* Ultrastructural Characterization and Three-Dimensional Architecture of Replication Sites in Dengue Virus-Infected Mosquito Cells. *J. Virol.* **88**, 4687–4697 (2014).
123. Peña, J. & Harris, E. Early dengue virus protein synthesis induces extensive rearrangement of the endoplasmic reticulum independent of the UPR and SREBP-2 pathway. *PLoS One* **7**, e38202 (2012).
124. Welsch, S. *et al.* Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host Microbe* **5**, 365–375 (2009).
125. Offerdahl, D. K., Dorward, D. W., Hansen, B. T. & Bloom, M. E. Cytoarchitecture of Zika Virus Infection in Human Neuroblastoma and *Aedes albopictus* Cell Lines. *Virology* **501**, 54–62 (2017).
126. Chen, Q. *et al.* Metabolic reprogramming by Zika virus provokes inflammation in human placenta. *Nat. Commun.* **11**, (2020).
127. Melo, C. F. O. R. *et al.* A Lipidomics Approach in the Characterization of Zika-Infected Mosquito Cells: Potential Targets for Breaking the Transmission Cycle. *PLoS ONE* **11**, (2016).
128. Mackenzie, J. M., Khromykh, A. A. & Parton, R. G. Cholesterol Manipulation by West Nile Virus Perturbs the Cellular Immune Response. *Cell Host Microbe* **2**, 229–239 (2007).

129. Villareal, V. A., Rodgers, M. A., Costello, D. A. & Yang, P. L. Targeting host lipid synthesis and metabolism to inhibit dengue and hepatitis C viruses. *Antiviral Res.* **124**, 110–121 (2015).
130. Castro, B. M., Prieto, M. & Silva, L. C. Ceramide: a simple sphingolipid with unique biophysical properties. *Prog. Lipid Res.* **54**, 53–67 (2014).
131. Holopainen, J. M., Angelova, M. I. & Kinnunen, P. K. Vectorial budding of vesicles by asymmetrical enzymatic formation of ceramide in giant liposomes. *Biophys. J.* **78**, 830–838 (2000).
132. Hurley, J. H., Boura, E., Carlson, L.-A. & Rózycki, B. Membrane Budding. *Cell* **143**, 875–887 (2010).
133. Trajkovic, K. *et al.* Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science* **319**, 1244–1247 (2008).
134. Zha, X. *et al.* Sphingomyelinase Treatment Induces ATP-independent Endocytosis. *J. Cell Biol.* **140**, 39–47 (1998).
135. Martinez-Seara, H. *et al.* Interplay of Unsaturated Phospholipids and Cholesterol in Membranes: Effect of the Double-Bond Position. *Biophys. J.* **95**, 3295–3305 (2008).
136. Roux, A. *et al.* Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules. *EMBO J.* **24**, 1537–1545 (2005).
137. García-Arribas, A. B., Alonso, A. & Goñi, F. M. Cholesterol interactions with ceramide and sphingomyelin. *Chem. Phys. Lipids* **199**, 26–34 (2016).
138. Marsh, D. Cholesterol-induced fluid membrane domains: a compendium of lipid-raft ternary phase diagrams. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 2114–2123 (2009).
139. Silvius, J. R. Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1610**, 174–183 (2003).
140. Staneva, G., Momchilova, A., Wolf, C., Quinn, P. J. & Koumanov, K. Membrane microdomains: role of ceramides in the maintenance of their structure and functions. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 666–675 (2009).
141. Samsa, M. M. *et al.* Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog.* **5**, e1000632 (2009).
142. Tan, T. Y. *et al.* Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. *Nat. Commun.* **11**, 895 (2020).
143. Teoh, P.-G., Huang, Z.-S., Pong, W.-L., Chen, P.-C. & Wu, H.-N. Maintenance of dimer conformation by the dengue virus core protein $\alpha 4$ - $\alpha 4'$ helix pair is critical for nucleocapsid formation and virus production. *J. Virol.* **88**, 7998–8015 (2014).
144. Xie, X. *et al.* Dengue NS2A Protein Orchestrates Virus Assembly. *Cell Host Microbe* **26**, 606-622.e8 (2019).
145. Zhang, X. *et al.* Zika Virus NS2A-Mediated Virion Assembly. *mBio* **10**, (2019).
146. Olzmann, J. A. & Carvalho, P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 137–155 (2019).

147. Walther, T. C. & Farese, R. V. Lipid Droplets And Cellular Lipid Metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 687–714 (2012).
148. Tsuchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R. & Fujimoto, T. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J. Biol. Chem.* **277**, 44507–44512 (2002).
149. Nguyen, T. B. & Olzmann, J. A. Lipid droplets and lipotoxicity during autophagy. *Autophagy* **13**, 2002–2003 (2017).
150. Monson, E. A., Trenerry, A. M., Laws, J. L., Mackenzie, J. M. & Helbig, K. J. Lipid droplets and lipid mediators in viral infection and immunity. *FEMS Microbiol. Rev.* (2021) doi:10.1093/femsre/uaaa066.
151. Tang, W.-C., Lin, R.-J., Liao, C.-L. & Lin, Y.-L. Rab18 Facilitates Dengue Virus Infection by Targeting Fatty Acid Synthase to Sites of Viral Replication. *J. Virol.* **88**, 6793–6804 (2014).
152. Carvalho, F. A. *et al.* Dengue Virus Capsid Protein Binding to Hepatic Lipid Droplets (LD) Is Potassium Ion Dependent and Is Mediated by LD Surface Proteins. *J. Virol.* **86**, 2096–2108 (2012).
153. Ishida, K. *et al.* Functional Correlation between Subcellular Localizations of Japanese Encephalitis Virus Capsid Protein and Virus Production. *J. Virol.* **93**, (2019).
154. Martins, A. S., Carvalho, F. A., Faustino, A. F., Martins, I. C. & Santos, N. C. West Nile Virus Capsid Protein Interacts With Biologically Relevant Host Lipid Systems. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**, (2019).
155. Martins, I. C. *et al.* The disordered N-terminal region of dengue virus capsid protein contains a lipid-droplet-binding motif. *Biochem. J.* **444**, 405–415 (2012).
156. Saumya, K. U., Kumar, D., Kumar, P. & Giri, R. Unlike dengue virus, the conserved 14-23 residues in N-terminal region of Zika virus capsid is not involved in lipid interactions. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1862**, 183440 (2020).
157. Shang, Z., Song, H., Shi, Y., Qi, J. & Gao, G. F. Crystal Structure of the Capsid Protein from Zika Virus. *J. Mol. Biol.* **430**, 948–962 (2018).
158. Heaton, N. S. & Randall, G. Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe* **8**, 422–432 (2010).
159. Barletta, A. B. F. *et al.* Emerging role of lipid droplets in *Aedes aegypti* immune response against bacteria and Dengue virus. *Sci. Rep.* **6**, 19928 (2016).
160. Miyanari, Y. *et al.* The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1089–1097 (2007).
161. Cloherty, A. P. M., Olmstead, A. D., Ribeiro, C. M. S. & Jean, F. Hijacking of Lipid Droplets by Hepatitis C, Dengue and Zika Viruses-From Viral Protein Moonlighting to Extracellular Release. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
162. García, C. C. *et al.* Cellular Organelles Reorganization During Zika Virus Infection of Human Cells. *Front. Microbiol.* **11**, 1558 (2020).
163. Osuna-Ramos, J. F., Reyes-Ruiz, J. M. & del Ángel, R. M. The Role of Host Cholesterol During Flavivirus Infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, (2018).

164. Tong, L. & Harwood, H. J. Acetyl-coenzyme A carboxylases: versatile targets for drug discovery. *J. Cell. Biochem.* **99**, (2006).
165. Smith, S., Witkowski, A. & Joshi, A. K. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Prog. Lipid Res.* **42**, 289–317 (2003).
166. Heaton, N. S. *et al.* Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 17345–17350 (2010).
167. Merino-Ramos, T. *et al.* Modification of the Host Cell Lipid Metabolism Induced by Hypolipidemic Drugs Targeting the Acetyl Coenzyme A Carboxylase Impairs West Nile Virus Replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 307–315 (2016).
168. Martín-Acebes, M. A., Blázquez, A.-B., Jiménez de Oya, N., Escribano-Romero, E. & Saiz, J.-C. West Nile virus replication requires fatty acid synthesis but is independent on phosphatidylinositol-4-phosphate lipids. *PLoS One* **6**, e24970 (2011).
169. Poh, M. K. *et al.* U18666A, an intra-cellular cholesterol transport inhibitor, inhibits dengue virus entry and replication. *Antiviral Res.* **93**, 191–198 (2012).
170. Martín-Acebes, M. A. *et al.* Host sphingomyelin increases West Nile virus infection in vivo. *J. Lipid Res.* **57**, 422–432 (2016).
171. Mullen, T. D., Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. *Biochem. J.* **441**, 789–802 (2012).
172. Aktepe, T. E., Pham, H. & Mackenzie, J. M. Differential utilisation of ceramide during replication of the flaviviruses West Nile and dengue virus. *Virology* **484**, 241–250 (2015).
173. Carocci, M. *et al.* The bioactive lipid 4-hydroxyphenyl retinamide inhibits flavivirus replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 85–95 (2015).
174. Fraser, J. E. *et al.* A Nuclear Transport Inhibitor That Modulates the Unfolded Protein Response and Provides In Vivo Protection Against Lethal Dengue virus Infection. *J. Infect. Dis.* **210**, 1780–1791 (2014).
175. Luo, J., Yang, H. & Song, B.-L. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 225–245 (2020).
176. Soto-Acosta, R., Bautista-Carbajal, P., Cervantes-Salazar, M., Angel-Ambrocio, A. H. & del Angel, R. M. DENV up-regulates the HMG-CoA reductase activity through the impairment of AMPK phosphorylation: A potential antiviral target. *PLoS Pathog.* **13**, (2017).
177. Osuna-Ramos, J. F. *et al.* Ezetimibe inhibits dengue virus infection in Huh-7 cells by blocking the cholesterol transporter Niemann–Pick C1-like 1 receptor. *Antiviral Res.* **160**, 151–164 (2018).
178. Tree, M. O. *et al.* Dengue virus reduces expression of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 to facilitate replication in *Aedes aegypti*. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
179. Martínez-Gutiérrez, M., Castellanos, J. E. & Gallego-Gómez, J. C. Statins Reduce Dengue Virus Production via Decreased Virion Assembly. *Intervirology* **54**, 202–216 (2011).

180. España, E. *et al.* Lipophilic statins inhibit Zika virus production in Vero cells. *Sci. Rep.* **9**, 11461 (2019).
181. Acosta, E. G. & Bartenschlager, R. The quest for host targets to combat dengue virus infections. *Curr. Opin. Virol.* **20**, 47–54 (2016).
182. Boldescu, V., Behnam, M. A. M., Vasilakis, N. & Klein, C. D. Broad-spectrum agents for flaviviral infections: Dengue, Zika and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 565–586 (2017).
183. Saiz, J.-C., de Oya, N. J., Blázquez, A.-B., Escribano-Romero, E. & Martín-Acebes, M. A. Host-Directed Antivirals: A Realistic Alternative to Fight Zika Virus. *Viruses* **10**, (2018).
184. Huang, Y. *et al.* Zika virus propagation and release in human fetal astrocytes can be suppressed by neutral sphingomyelinase-2 inhibitor GW4869. *Cell Discov.* **4**, 19 (2018).
185. Jiménez de Oya, N. *et al.* Targeting host metabolism by inhibition of acetyl-Coenzyme A carboxylase reduces flavivirus infection in mouse models. *Emerg. Microbes Infect.* **8**, 624–636 (2019).
186. Wichit, S. *et al.* Imipramine Inhibits Chikungunya Virus Replication in Human Skin Fibroblasts through Interference with Intracellular Cholesterol Trafficking. *Sci. Rep.* **7**, 3145 (2017).
187. Merino-Ramos, T., Jiménez de Oya, N., Saiz, J.-C. & Martín-Acebes, M. A. Antiviral Activity of Nordihydroguaiaretic Acid and Its Derivative Tetra-O-Methyl Nordihydroguaiaretic Acid against West Nile Virus and Zika Virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, e00376-17 (2017).
188. Soto-Acosta, R., Bautista-Carbajal, P., Syed, G. H., Siddiqui, A. & Del Angel, R. M. Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) inhibits replication and viral morphogenesis of dengue virus. *Antiviral Res.* **109**, 132–140 (2014).
189. Syed, G. H. & Siddiqui, A. Effects of hypolipidemic agent nordihydroguaiaretic acid on lipid droplets and Hepatitis C virus. *Hepatology. Baltim. Md* **54**, 1936–1946 (2011).
190. Cheng, F., Ramos da Silva, S., Huang, I.-C., Jung, J. U. & Gao, S.-J. Suppression of Zika Virus Infection and Replication in Endothelial Cells and Astrocytes by PKA Inhibitor PKI 14-22. *J. Virol.* **92**, (2018).
191. Jiménez de Oya, N., Blázquez, A.-B., Casas, J., Saiz, J.-C. & Martín-Acebes, M. A. Direct Activation of Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK) by PF-06409577 Inhibits Flavivirus Infection through Modification of Host Cell Lipid Metabolism. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, (2018).
192. Kuno, G. & Oliver, A. Maintaining mosquito cell lines at high temperatures: effects on the replication of flaviviruses. *Vitro Cell. Dev. Biol. J. Tissue Cult. Assoc.* **25**, 193–196 (1989).
193. Morens, D. M., Halstead, S. B., Repik, P. M., Putvatana, R. & Raybourne, N. 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. *J. Clin. Microbiol.* **22**, 250–254 (1985).
194. De Jesús-González, L. A. *et al.* The Nuclear Pore Complex: A Target for NS3 Protease of Dengue and Zika Viruses. *Viruses* **12**, (2020).
195. Reyes-Ruiz, J. M. *et al.* Mosquito cells persistently infected with dengue virus produce viral particles with host-dependent replication. *Virology* **531**, 1–18 (2019).

196. Bautista-Carbajal, P. *et al.* The calmodulin antagonist W-7 (N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide hydrochloride) inhibits DENV infection in Huh-7 cells. *Virology* **501**, 188–198 (2017).
197. Wilcock, C. & Bailey, C. J. Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* **24**, 49–57 (1994).
198. Orozco, S. *et al.* Characterization of a model of lethal dengue virus 2 infection in C57BL/6 mice deficient in the alpha/beta interferon receptor. *J. Gen. Virol.* **93**, 2152–2157 (2012).
199. ISO 10993-5:2009(en), Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:10993:-5:ed-3:v1:en>.
200. Medina-Magües, L. G. *et al.* mRNA Vaccine Protects against Zika Virus. *Vaccines* **9**, 1464 (2021).
201. Martinez-Gutierrez, M., Correa-Londoño, L. A., Castellanos, J. E., Gallego-Gómez, J. C. & Osorio, J. E. Lovastatin Delays Infection and Increases Survival Rates in AG129 Mice Infected with Dengue Virus Serotype 2. *PLoS ONE* **9**, (2014).
202. Rossi, S. L. *et al.* Characterization of a Novel Murine Model to Study Zika Virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **94**, 1362–1369 (2016).
203. Govero, J. *et al.* Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature* **540**, 438–442 (2016).
204. Cugola, F. R. *et al.* The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* **534**, 267–271 (2016).
205. Wilcock, C., Wyre, N. D. & Bailey, C. J. Subcellular distribution of metformin in rat liver. *J. Pharm. Pharmacol.* **43**, 442–444 (1991).
206. Dengue vaccine: WHO position paper, September 2018 – Recommendations. *Vaccine* **37**, 4848–4849 (2019).
207. Barrows, N. J. *et al.* A Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection. *Cell Host Microbe* **20**, 259–270 (2016).
208. Bailey, C. J. Metformin: historical overview. *Diabetologia* **60**, 1566–1576 (2017).
209. An, H. *et al.* The importance of the AMPK gamma 1 subunit in metformin suppression of liver glucose production. *Sci. Rep.* **10**, (2020).
210. Takashima, M. *et al.* Role of KLF15 in Regulation of Hepatic Gluconeogenesis and Metformin Action. *Diabetes* **59**, 1608–1615 (2010).
211. Solymár, M. *et al.* Metformin induces significant reduction of body weight, total cholesterol and LDL levels in the elderly – A meta-analysis. *PLoS ONE* **13**, (2018).
212. Zhou, G. *et al.* Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* **108**, 1167–1174 (2001).
213. Pritchett, J. C., Naesens, L. & Montoya, J. Chapter 19 - Treating HHV-6 Infections: The Laboratory Efficacy and Clinical Use of Anti-HHV-6 Agents. in *Human Herpesviruses HHV-6A, HHV-6B & HHV-7 (Third Edition)* (eds. Flamand, L., Lautenschlager, I., Krueger, G. R. F. & Ablashi, D. V.) 311–331 (Elsevier, 2014). doi:10.1016/B978-0-444-62703-2.00019-7.

214. Indrayanto, G., Putra, G. S. & Suhud, F. Chapter Six - Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. in *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* (ed. Al-Majed, A. A.) vol. 46 273–307 (Academic Press, 2021).
215. Li, C. *et al.* Disruption of glial cell development by Zika virus contributes to severe microcephalic newborn mice. *Cell Discov.* **4**, 1–12 (2018).
216. Tracey, T. J., Kirk, S. E., Steyn, F. J. & Ngo, S. T. The role of lipids in the central nervous system and their pathological implications in amyotrophic lateral sclerosis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **112**, 69–81 (2021).
217. Vaziri, N. D. & Liang, K. Effects of HMG-CoA reductase inhibition on hepatic expression of key cholesterol-regulatory enzymes and receptors in nephrotic syndrome. *Am. J. Nephrol.* **24**, 606–613 (2004).
218. Horton, J. D., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* **109**, 1125–1131 (2002).
219. Krukemyer, J. J. & Talbert, R. L. Lovastatin: a new cholesterol-lowering agent. *Pharmacotherapy* **7**, 198–210 (1987).
220. Moghadasian, M. H. Clinical pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Life Sci.* **65**, 1329–1337 (1999).
221. Owen, M. R., Doran, E. & Halestrap, A. P. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem. J.* **348**, 607–614 (2000).
222. Fontaine, E. Metformin-Induced Mitochondrial Complex I Inhibition: Facts, Uncertainties, and Consequences. *Front. Endocrinol.* **9**, (2018).
223. Martín-Acebes, M. A., Vázquez-Calvo, Á. & Saiz, J.-C. Lipids and flaviviruses, present and future perspectives for the control of dengue, Zika, and West Nile viruses. *Prog. Lipid Res.* **64**, 123–137 (2016).
224. Diop, F. *et al.* Zika virus infection modulates the metabolomic profile of microglial cells. *PLOS ONE* **13**, e0206093 (2018).
225. Singh, P. K. *et al.* Determination of system level alterations in host transcriptome due to Zika virus (ZIKV) Infection in retinal pigment epithelium. *Sci. Rep.* **8**, 11209 (2018).
226. Coyaud, E. *et al.* Global Interactomics Uncovers Extensive Organellar Targeting by Zika Virus. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **17**, 2242–2255 (2018).
227. Ha, J., Daniel, S., Broyles, S. S. & Kim, K. H. Critical phosphorylation sites for acetyl-CoA carboxylase activity. *J. Biol. Chem.* **269**, 22162–22168 (1994).
228. Lazear, H. M. *et al.* A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. *Cell Host Microbe* **19**, 720–730 (2016).
229. Hundal, R. S. *et al.* Mechanism by Which Metformin Reduces Glucose Production in Type 2 Diabetes. *Diabetes* **49**, 2063–2069 (2000).
230. Klein, S. L. & Flanagan, K. L. Sex differences in immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 626–638 (2016).
231. Scully, E. P., Haverfield, J., Ursin, R. L., Tannenbaum, C. & Klein, S. L. Considering how biological sex impacts immune responses and COVID-19 outcomes. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 442–447 (2020).

232. Chakravarti, A., Roy, P., Malik, S., Siddiqui, O. & Thakur, P. A study on gender-related differences in laboratory characteristics of dengue fever. *Indian J. Med. Microbiol.* **34**, 82 (2016).
233. Ananth, S. *et al.* Clinical Symptoms of Arboviruses in Mexico. *Pathogens* **9**, (2020).
234. Snyder-Keller, A., Kramer, L. D., Zink, S. & Bolivar, V. J. Mouse Strain and Sex-Dependent Differences in Long-term Behavioral Abnormalities and Neuropathologies after Developmental Zika Infection. *J. Neurosci.* **39**, 5393–5403 (2019).
235. Mankouri, J. *et al.* Enhanced hepatitis C virus genome replication and lipid accumulation mediated by inhibition of AMP-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 11549–11554 (2010).
236. Yu, J.-W. *et al.* Hepatitis C virus core protein induces hepatic metabolism disorders through down-regulation of the SIRT1–AMPK signaling pathway. *Int. J. Infect. Dis.* **17**, e539–e545 (2013).
237. Lo, A. K.-F., Lo, K.-W., Ko, C.-W., Young, L. S. & Dawson, C. W. Inhibition of the LKB1–AMPK pathway by the Epstein–Barr virus-encoded LMP1 promotes proliferation and transformation of human nasopharyngeal epithelial cells. *J. Pathol.* **230**, 336–346 (2013).
238. Singh, S. *et al.* AMP-Activated Protein Kinase Restricts Zika Virus Replication in Endothelial Cells by Potentiating Innate Antiviral Responses and Inhibiting Glycolysis. *J. Immunol.* **204**, 1810–1824 (2020).
239. Thaker, S. K. *et al.* Differential Metabolic Reprogramming by Zika Virus Promotes Cell Death in Human versus Mosquito Cells. *Cell Metab.* **29**, 1206-1216.e4 (2019).