



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS  
MOLECULAR**

**Evaluación del efecto antiviral de diferentes  
análogos de metformina y fenformina en la  
infección por el virus del dengue**

**TESIS**

Que presenta:

**RICARDO JIMÉNEZ CAMACHO**

Para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS  
MOLECULAR**

Directora de Tesis:

**DRA. ROSA MARÍA DEL ÁNGEL NÚÑEZ DE CÁCERES**

Ciudad de México

Agosto, 2022

## **CRÉDITOS INSTITUCIONALES**

El presente proyecto de investigación se desarrolló en el laboratorio 8 de virología en el departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) bajo la dirección de la Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres y la asesoría de la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano y el Dr. Juan Ernesto Ludert León.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado mediante la asignación de la beca con número **775711**.

### **DIRECTORA DE TESIS:**

Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres. Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

### **ASESORES:**

Dr. Juan Ernesto Ludert León. Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano. Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Rosa María por aceptarme en su laboratorio y permitirme colaborar en su grupo de trabajo. Gracias por otorgarme todos los recursos para realizar mi proyecto de investigación, su confianza, paciencia, asesoría, enseñanzas y apoyo incondicional.

Al Dr. Juan Ernesto Ludert León por brindarme su asesoría, atención, recursos y material necesario para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano por acceder a contribuir en el desarrollo de este proyecto. Gracias por brindarme los recursos necesarios, asesoría, consejos, enseñanzas y su gran apoyo en todo momento.

Gracias a mis compañeros del laboratorio 8 por brindarme todas las herramientas para desarrollar este proyecto. En especial a Noé, Carlos, Selvin, Magda y Rodolfo, por apoyarme en todo momento, brindarme su amistad y hacer mi estancia en el laboratorio muy agradable.

## **DEDICATORIA**

Es para mí un honor dedicar este proyecto de investigación que con mucho esfuerzo, trabajo y perseverancia, me llena de satisfacción haber logrado.

Quiero dedicar este trabajo a cada uno de mis seres queridos y mi familia, que durante toda mi vida han sido la motivación para seguir adelante y cumplir todas mis metas.

A mis padres Federico Jiménez Roldán y Cristina Camacho Bocanegra porque ellos han sido mi ejemplo, motivación y la razón de cada paso que doy en la vida. Gracias por todas sus enseñanzas, su incesante amor que me han brindado, por siempre creer en mí y por su invaluable apoyo en mi formación personal y profesional. Gracias por tanto, ustedes son mi inspiración.

A mis hermanos Israel Jiménez Camacho y Noé Jiménez Camacho por siempre confiar en mis aptitudes y ofrecerme su apoyo incondicional. Gracias por estar en mi vida.

A mis amigos y seres queridos que han participado en cada etapa de mi vida y me han ayudado a ser la persona que hoy en día soy. Gracias por llenarme de amor, brindarme su amistad, estar a mi lado y darme su apoyo absoluto.

## INDICE

|                                                            |    |
|------------------------------------------------------------|----|
| LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....                             | 7  |
| LISTA DE ABREVIATURAS .....                                | 9  |
| RESUMEN.....                                               | 11 |
| ABSTRACT .....                                             | 12 |
| I. INTRODUCCIÓN.....                                       | 13 |
| I.I Dengue.....                                            | 13 |
| I.II DENV .....                                            | 14 |
| I.II.I Estructura del DENV .....                           | 15 |
| I.II.I.I Proteínas estructurales.....                      | 16 |
| I.II.I.II Proteínas no estructurales .....                 | 17 |
| I.II.II Genoma del DENV.....                               | 20 |
| I.II.III Ciclo replicativo del DENV.....                   | 22 |
| I.III Epidemiología.....                                   | 25 |
| I.III.I Incidencia y Mortalidad.....                       | 25 |
| I.IV Transmisión .....                                     | 27 |
| I.IV Patogénesis.....                                      | 28 |
| I.V Características clínicas .....                         | 30 |
| I.VI Diagnóstico .....                                     | 31 |
| I.VII Tratamiento .....                                    | 31 |
| I.VIII Vacunas .....                                       | 32 |
| II. ANTECEDENTES .....                                     | 35 |
| II.I Desarrollo de fármacos antivirales .....              | 35 |
| II.I.I Compuestos dirigidos a componentes virales .....    | 36 |
| II.I.II Compuestos dirigidos a factores del hospedero..... | 37 |

|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| II.II Lípidos como blanco terapéutico en la infección por DENV ..... | 38 |
| II.III Biguanidas .....                                              | 39 |
| II.III.I Metformina.....                                             | 40 |
| II.III.II Análogos de metformina y fenformina.....                   | 45 |
| III. JUSTIFICACIÓN .....                                             | 50 |
| IV. HIPÓTESIS .....                                                  | 50 |
| V. OBJETIVO GENERAL .....                                            | 51 |
| VI. OBJETIVOS PARTICULARES .....                                     | 51 |
| VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....                                    | 52 |
| VIII. MATERIALES Y MÉTODOS .....                                     | 55 |
| VIII.I Línea Celular Huh-7.....                                      | 55 |
| VIII.II Virus del dengue .....                                       | 55 |
| VIII.III Compuestos Químicos y Fármacos .....                        | 55 |
| VIII.IV Infección con DENV-2 y Tratamiento.....                      | 56 |
| VIII.V Ensayo MTT .....                                              | 56 |
| VIII.VI Citometría de Flujo.....                                     | 57 |
| VIII.VII Western Blot.....                                           | 57 |
| VIII.VIII Unidades Formadoras de Placa (UFP).....                    | 58 |
| VIII.IX Análisis Estadístico.....                                    | 59 |
| IX. RESULTADOS .....                                                 | 60 |
| X. DISCUSIÓN .....                                                   | 84 |
| XI. CONCLUSIONES.....                                                | 97 |
| XII. PERSPECTIVAS .....                                              | 98 |
| XIII. BIBLIOGRAFÍA .....                                             | 99 |

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

|                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Fig.1 Criterios de clasificación del dengue .....                                                                                                   | 14 |
| Fig.2 Descripción general de las partículas de DENV .....                                                                                           | 16 |
| Fig.3 Estructura general del genoma del DENV .....                                                                                                  | 22 |
| Fig.4 Representación esquemática de las diferentes conformaciones del genoma de DENV .....                                                          | 22 |
| Fig.5 Ciclo de replicación del DENV .....                                                                                                           | 24 |
| Fig.6 Ciclo de transmisión del DENV .....                                                                                                           | 28 |
| Fig.7 Estructura química de la metformina .....                                                                                                     | 42 |
| Fig.8 Estructura química de la fenformina .....                                                                                                     | 46 |
| Tabla 1. Análogos de metformina y fenformina de 1 <sup>a</sup> generación .....                                                                     | 48 |
| Tabla 2. Análogos de metformina y fenformina de 2 <sup>a</sup> generación .....                                                                     | 49 |
| Fig. 9 Viabilidad de las células Huh-7 a los análogos de metformina y fenformina .....                                                              | 62 |
| Fig. 10 Concentración Citotóxica 50 de los análogos de metformina y fenformina .....                                                                | 64 |
| Fig. 11 Efecto de los análogos de metformina y fenformina en la infección con DENV-2.....                                                           | 70 |
| Fig. 12 Eficiencia de inhibición de la infección por los análogos de metformina y fenformina .....                                                  | 72 |
| Fig. 13 Concentración Inhibitoria 50 de los análogos de metformina y fenformina .....                                                               | 75 |
| Tabla.3 Índice de selectividad .....                                                                                                                | 76 |
| Fig. 14 Comparación del efecto antiviral de los análogos y la metformina con respecto a metformina mediante los niveles de proteína viral NS3 ..... | 78 |

|                                                                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Fig. 15 Comparación del efecto antiviral de los análogos y la metformina con respecto a metformina mediante la determinación del título viral. ....                                   | 80 |
| Fig. 16 Comparación del efecto antiviral de los análogos de metformina y fenformina con respecto a la metformina mediante la determinación del porcentaje de células infectadas. .... | 82 |
| Fig. 17 Análisis de Consenso Farmacológico. ....                                                                                                                                      | 83 |



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ADE:** Aumento de la Infección Dependiente de Anticuerpos

**AMPK:** Proteína Cinasa Activada por AMP

**C:** Proteína de Cápside

**CC<sub>50</sub>:** Concentración Citolóxica 50

**COFEPRIS:** Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios

**CR:** Complejo de Replicación

**DENV:** Virus Dengue

**DF:** Fiebre del Dengue

**DHF:** Fiebre Hemorrágica del Dengue

**DMEM:** Medio Eagle Modificado de Dulbecco

**DSS:** Síndrome de Shock por Dengue

**E:** Proteína de Envoltura

**ELISA:** Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas

**FDA:** Administración de Drogas y Alimentos

**HMGCR:** 3-Hidroxi-3-Metilglutaril-Coenzima A

**Huh-7:** Línea Celular de Hepatocarcinoma Humano

**IC<sub>50</sub>:** Concentración Inhibitoria 50

**M:** Proteína de Membrana

**MOI:** Multiplicidad de Infección

**MTT:** Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

**NS:** Proteína No Estructural

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PBS:** Buffer Fosfato Salino

**prM:** Proteína Precursora de Membrana

**RE:** Retículo Endoplasmático

**RdRp:** ARN Polimerasa Dependiente de ARN

**RT-PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa

**SI:** Índice de Selectividad

**SINAVE:** Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica

**ssARN (+):** Ácido Ribonucleico de Cadena Sencilla en Sentido Positivo

**SFB:** Suero Fetal Bovino

**UFP:** Unidades Formadoras de Placas

**UTR:** Región No Traducida

**WNV:** Virus del Nilo Occidental

**YFV:** Virus de la Fiebre Amarilla

**ZIKV:** Virus del Zika

## RESUMEN

El dengue es la enfermedad causada por el virus del dengue (DENV), y se encuentra asociada con una importante morbilidad, mortalidad y costo económico a nivel mundial. A pesar de su relevancia, en la actualidad no existe tratamiento farmacológico específico, seguro y eficaz contra esta enfermedad. Debido a esto, es necesario seguir en la búsqueda, identificación y desarrollo de nuevos compuestos con potencial terapéutico. Una de las estrategias empleadas para lograrlo, consiste en la producción de fármacos dirigidos a factores del hospedero que son clave para el ciclo replicativo viral y la patogénesis de la enfermedad. Nuestro grupo, logró demostrar el efecto anti-DENV de la metformina tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, la actividad terapéutica de la metformina puede estar limitada por su farmacocinética. En este sentido, se logró el desarrollo de nuevos análogos estructurales y funcionales de metformina y fenformina, que buscan mejorar la lipofilicidad de la metformina, así como sus propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas, farmacodinámicas y toxicológicas.

En el presente trabajo analizamos el efecto de 10 diversos análogos de metformina y fenformina en la infección por DENV-2, de los cuales, todos mostraron efecto antiviral. También se determinó el índice de selectividad como predictor del potencial terapéutico de los compuestos, donde se encontró que los compuestos EGL-2, MCC-1 y MCC-6 mostraron un mejor perfil de citotoxicidad y eficiencia de inhibición de la infección. Por último, se realizó una comparación de los análogos con la metformina mediante diversos parámetros de infección, mostrando así; EGL-1, EGL-2, EGL-4, EGL-7 y MCC-3 mejor efecto anti-DENV en al menos un parámetro. En conjunto, estos resultados demuestran que los análogos de metformina y fenformina son agentes antivirales eficaces para inhibir la infección por DENV-2 en células Huh-7. Además, los análogos EGL-1 y EGL-2 poseen el mejor potencial terapéutico y pueden representar una alternativa a la metformina, la única biguanida disponible en la actualidad.

## **ABSTRACT**

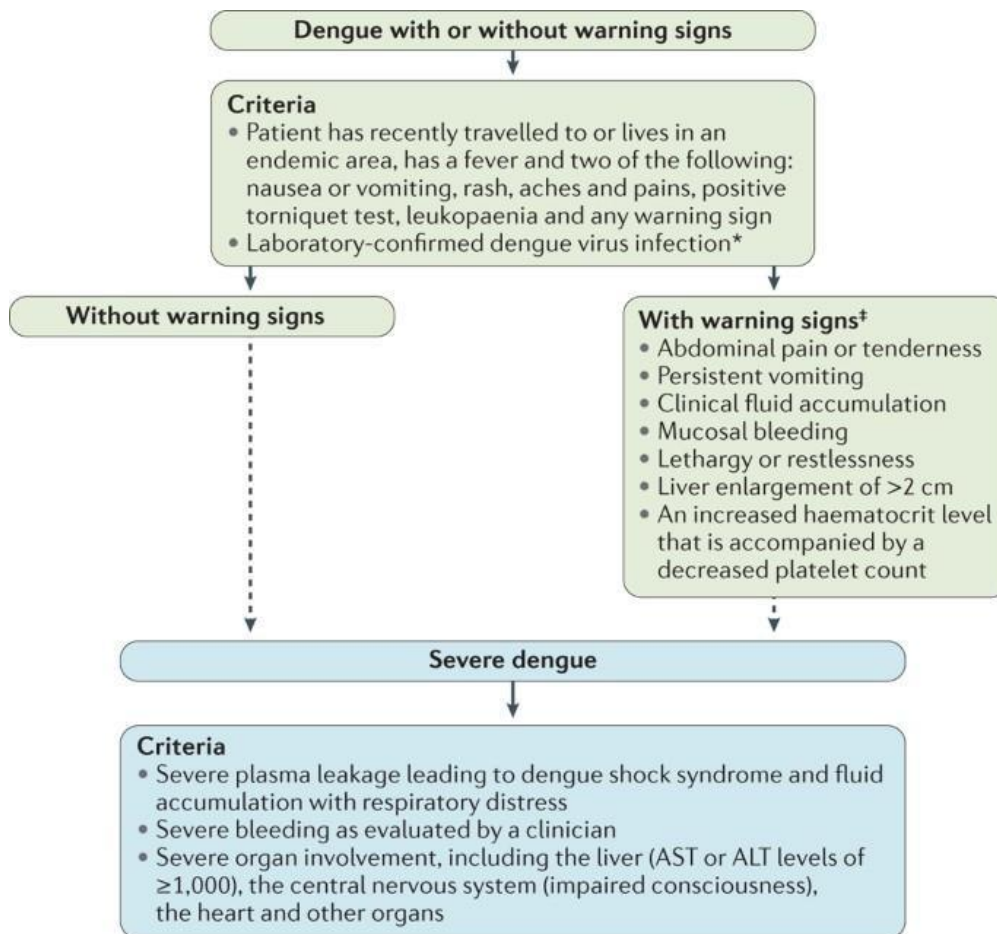
Dengue is the disease caused by dengue virus (DENV), and is associated with significant morbidity, mortality and economic cost worldwide. Despite its relevance, there is currently no specific, safe and effective pharmacological treatment against this disease. Because of this, it is necessary to continue the search, identification and development of new compounds with therapeutic potential. One of the strategies used to achieve this consists of the production of drugs that target host factors that are key to the viral replicative cycle and the pathogenesis of the disease. Our group was able to demonstrate the anti-DENV effect of metformin in both in vitro and in vivo models. However, the therapeutic activity of metformin may be limited by its pharmacokinetics. In this sense, the development of new structural and functional analogues of metformin and phenformin, which seek to improve the lipophilicity of metformin, as well as its physicochemical, pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicological properties, was achieved.

In the present work we analyzed the effect of 10 different metformin and phenformin analogues on DENV-2 infection, of which all showed antiviral effect. We also determined the selectivity index as a predictor of the therapeutic potential of the compounds, where it was found that the compounds EGL-2, MCC-1 and MCC-6 showed a better cytotoxicity profile and efficiency of inhibition of the infection. Finally, a comparison of the analogues with metformin was performed using various infection parameters, thus showing; EGL-1, EGL-2, EGL-4, EGL-7 and MCC-3 better anti-DENV effect in at least one parameter. Taken together, these results demonstrate that metformin and phenformin analogs are effective antiviral agents in inhibiting DENV-2 infection in Huh-7 cells. Furthermore, the EGL-1 and EGL-2 analogs possess the best therapeutic potential and may represent an alternative to metformin, the only biguanide currently available.

## I. INTRODUCCIÓN

### I.I Dengue

El dengue es la enfermedad viral transmitida por mosquitos más prevalente en el mundo y se encuentra asociada con una importante morbilidad, mortalidad y costo económico en servicios de salud, particularmente en los países en desarrollo.(1,2) Esta enfermedad tiene como agente causal a cualquiera de los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV), por lo que, una persona podría infectarse hasta cuatro veces en su vida.(1,2) La infección es transmitida por la picadura de mosquitos del género *Aedes* y principalmente por las especies *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*.(1,2) La Organización Mundial de la Salud (OMS) hasta el año 2008 recomendaba distinguir clínicamente al dengue en: fiebre del dengue (DF), fiebre hemorrágica del dengue (DHF) y síndrome de shock por dengue (DSS) dependiendo de las manifestaciones clínicas presentadas por los pacientes, así como su gravedad.(1,3–5) No obstante, en el año 2009 la OMS presentó una clasificación alternativa con el propósito de mejorar el manejo clínico de los pacientes, la cual incluye: dengue sin signos de alarma , dengue con signos de alarma y dengue grave, como se muestra en la figura 1.(1,2,6,7) Sin embargo, en diversos ámbitos la clasificación DF/DHF/DSS continúa siendo ampliamente utilizada.



**Fig.1** Criterios de clasificación del dengue conforme al *Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control 2009*. World Health Organization. Tomado.(3)

## I.II DENV

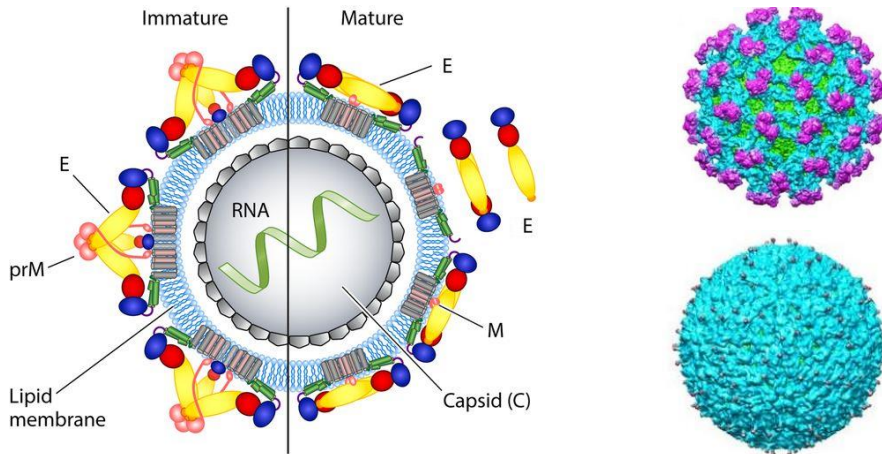
El DENV pertenece al grupo de los arbovirus, el cual, está compuesto de virus biológicamente diversos que comparten la capacidad de ser transmitidos entre vectores artrópodos y hospederos vertebrados.(1) Dentro de los arbovirus clínicamente más importantes se encuentran los integrantes del género *Flavivirus* (miembro de la familia *Flaviviridae*).<sup>(1,2)</sup> En el género *Flavivirus* se encuentra: el virus del dengue (DENV), el virus del Zika (ZIKV), el virus del Nilo Occidental (WNV), y el virus de la Fiebre Amarilla (YFV), entre otros. El DENV agrupa cuatro virus estrechamente relacionados a nivel genético (homología de secuencia de nucleótidos del 65-70%) y antigénico, que son

conocidos como serotipo 1, 2, 3 y 4 (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4), cada uno de ellos, a su vez, incluye varios genotipos.(2,3) Los genotipos se pueden definir como un grupo de aislados de DENV que no poseen más del 6% de divergencia en su secuencia de nucleótidos dentro de un solo serotipo.(8) En el DENV-1 se pueden diferenciar cinco genotipos (I, II, III, IV y V), en el DENV-2, seis (Asiático I, Asiático II, Cosmopolita, Americano, Asiático/Americano y Selvático), en el DENV-3, cuatro o cinco (I, II, III, IV/V) y en el DENV-4, cuatro genotipos (I, II, III, Selvático).(9) Adicionalmente, en Octubre de 2013 se informó de un quinto serotipo (DENV-5) que se obtuvo mediante aislamiento y análisis de secuencia genética en Sarawak, Malasia.(2,10) Este último serotipo sigue un ciclo selvático (transmisión a hospederos primates no humanos por mosquitos *Aedes* “selváticos” de diversas especies que viven principalmente en árboles) a diferencia de los otros cuatro serotipos que siguen el ciclo humano (transmisión a hospederos humanos en áreas urbanas por el mosquito "domesticado", generalmente *Aedes aegypti*), aunque los humanos que viven o trabajan en el bosque o alrededores se pueden infectar ocasionalmente de DENV selvático.(10,11) La causa probable de la aparición del nuevo serotipo podría ser la recombinación genética, la selección natural y los cuellos de botella genéticos.(10)

### **I.II.I Estructura del DENV**

El DENV es una partícula esférica envuelta por una membrana lipídica, que en su forma madura asemeja una “superficie lisa” de aproximadamente 50 nm de diámetro, mientras que la partícula inmadura tiene un diámetro de aproximadamente 60 nm con una apariencia de “superficie puntiaguda”, como se muestra en la figura 2.(1–3) Al interior de la partícula viral se encuentra un genoma de ARN de cadena sencilla en sentido positivo (ssARN(+)) que asemeja estructuralmente al ARNm de las células hospederas.(3) El genoma codifica tres proteínas estructurales que conforman la estructura del virión y participan en la unión y entrada del virus a la célula, incluyendo: la proteína de la cápside (C), la proteína de pre-membrana/membrana (prM/M) y la proteína de

envoltura (E). Por otro lado, el genoma también codifica siete proteínas no estructurales (NS), conocidas como: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5; involucradas principalmente en la replicación del genoma viral, el ensamblaje de nuevas partículas virales, la patogénesis de la enfermedad y la evasión inmune.(3)



**Fig.2** Descripción general de las partículas de DENV en sus formas madura e inmadura. Se indica a la izquierda, un esquema dividido por un eje mostrando la partícula viral madura e inmadura. Se indica la membrana lipídica con las proteínas estructurales: proteína E, proteína prM o M y la proteína C. A la derecha se muestran diferentes perspectivas de la superficie viral inmadura “puntiaguda” y madura “lisa”. Tomada y modificada.(12)

### **I.II.I.I Proteínas estructurales**

#### **Proteína de la cápside (C)**

Proteína homodimérica altamente básica con peso molecular aproximado de 12 kDa, que posee en cada monómero: cuatro  $\alpha$ -hélices, un dominio N-terminal intrínsecamente desordenado, una región plegada intermedia flexible corta y una región plegada conservada que estabiliza el dímero.(1,13) La función de esta proteína consiste en modular la formación de las nucleocápsides (encapsidación) durante el empaquetamiento del genoma viral y el ensamblaje de nuevas partículas virales.(1,13) Además, cabe destacar que las proteínas C se unen a las gotas lipídicas de las células, dicha interacción es necesaria para la replicación, ensamblaje y morfogénesis viral.(13)



### **Proteína pre-membrana y membrana (prM/M)**

La proteína prM está conformada por 166 aminoácidos (aproximadamente 26 kDa), mientras que la proteína M consta de 75 aminoácidos (aproximadamente 8 kDa).(1,14) La participación de prM se centra en el proceso de maduración de la partícula viral, ya que funciona como una chaperona que protege al péptido de fusión de la proteína E con el objetivo de evitar una fusión prematura del virión antes de su liberación al espacio extracelular.(14) Posteriormente, la prM es procesada por la endoproteasa furina del aparato de Golgi para dar lugar a los fragmentos pr y a M que al salir al ambiente extracelular se disocian y genera partículas maduras que poseen únicamente la proteína M asociada.(1,15)

### **Proteína de envoltura (E)**

Proteína que forma un homodímero N-glicosilado con una longitud de 493 a 495 aminoácidos, cuyo peso molecular es de aproximadamente 50-53 kDa y posee tres dominios: dominio I N-terminal pero estructuralmente central; dominio II que posee una región de fusión hidrófoba y el dominio III responsable de la unión a los receptores celulares del hospedero.(1,16) En la partícula viral madura, la proteína E se encuentra en forma de 90 homodímeros (180 copias) que se colocan planos con respecto a la superficie del virus formando una capa de proteína lisa.(16) En la partícula inmadura, E forma 90 heterodímeros junto a prM, los cuales se extienden como 60 picos triméricos desde la superficie, dando una apariencia “puntiaguda” a los viriones.(16) Debido a lo mencionado anteriormente, E es una proteína que está fuertemente implicada en el rango de hospederos que pueden ser infectados, la eficiencia de replicación, el tropismo y la virulencia.(1,3,14)

### **I.II.I.II Proteínas no estructurales**

#### **NS1**

Es una glicoproteína con un peso molecular aproximado de 45-55 kDa (dependiendo del nivel de glicosilación).(1,17) Esta proteína puede existir en 3

formas: alojada en el retículo endoplásmico (RE), anclada a la membrana o secretada al espacio extracelular.(17,18) NS1, se produce como monómero y, después de procesarse en el RE forma homodímeros que se asocian con las membranas de los organelos celulares, a través de anclajes de glicosilfosfatidilinositol.(1,17) También se secreta al espacio extracelular y la sangre (por lo que es un importante marcador de diagnóstico de la infección por DENV) como una partícula similar a una lipoproteína de alta densidad, constituida por 3 dímeros NS1 con una cavidad central hidrófoba cargada con lípidos.(17) Las funciones principales de NS1 son: participar en el complejo de replicación del ARN viral cuando interactúa con el precursor NS4A-4B, contribuir por diferentes mecanismos a la permeabilidad vascular en la infección e inhibir la activación del sistema del complemento del hospedero.(1,17,18)

### **NS2A**

Proteína hidrófoba con un peso molecular de aproximadamente 22 kDa. Posee cinco segmentos transmembranales que atraviesan la membrana del RE y dos segmentos que interactúan con el RE sin atravesar su membrana.(14,16) Esta proteína viral, en general, promueve el ensamblaje y la replicación viral ya que participa de algún modo en la coordinación del cambio entre el empaquetamiento de ARN sintetizado para formar nuevas partículas virales y la replicación del ARN para seguir generando copias del genoma viral.(14,16) Por otro lado, NS2A también participa antagonizando la respuesta celular al interferón de tipo I (IFN I).(14,16)

### **NS2B**

Proteína de 130 aminoácidos con un peso molecular de 14 kDa que se encuentra asociada a la membrana.(1) Con respecto a su función, NS2B sirve como cofactor en la regulación de la actividad serina proteasa de NS3, debido a que se asocia con su región central a la proteína NS3 para formar el complejo de proteasa. (14,16)

### **NS3**

Proteína de 618 aminoácidos con un peso molecular de 70 kDa.(14,16) Esta proteína es una enzima multifuncional que funciona como serina proteasa de tipo quimotripsina, ARN helicasa y ARN trifosfatasa/nucleósido trifosfatasa (RTPasa/NTPasa).(16) NS3 posee un dominio de proteasa N-terminal (1-180 aminoácidos) que participa en la escisión de la poliproteína viral, una región interdominio que funciona como enlazador y un dominio helicasa que se encuentra en los residuos 181-618.(16) Además, NS3 se somete a autoescisión en dos sitios ubicados en la unión NS2B-NS3 y dentro de la región helicasa C-terminal.(16) Por otro lado, se ha demostrado que NS3 produce el ambiente lipídico apropiado alrededor del RE para la replicación eficiente de DENV, al reclutar enzimas celulares como la sintasa de ácidos grasos.(14) Todas las funciones que desempeña NS3 son esenciales para la correcta replicación del genoma viral.

#### **NS4A**

Pequeña proteína integral de membrana altamente hidrofóbica que está conformada por 150 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 16 kDa.(16) La función principal de NS4A es inducir las alteraciones necesarias en la membrana que son esenciales para la replicación eficiente del DENV.(1,16)

#### **NS4B**

Es una pequeña proteína integral de membrana hidrofóbica que está conformada por aproximadamente 245 a 249 aminoácidos con un peso molecular de 27 kDa.(1,16) NS4B interactúa directamente con NS3 mejorando la actividad de helicasa de NS3 al estimular la disociación del ARN monocatenario, modulando así, la replicación viral.(16) NS4B al igual que NS2A, participa antagonizando la respuesta celular al interferón de tipo I (IFN I).(19)

#### **NS5**

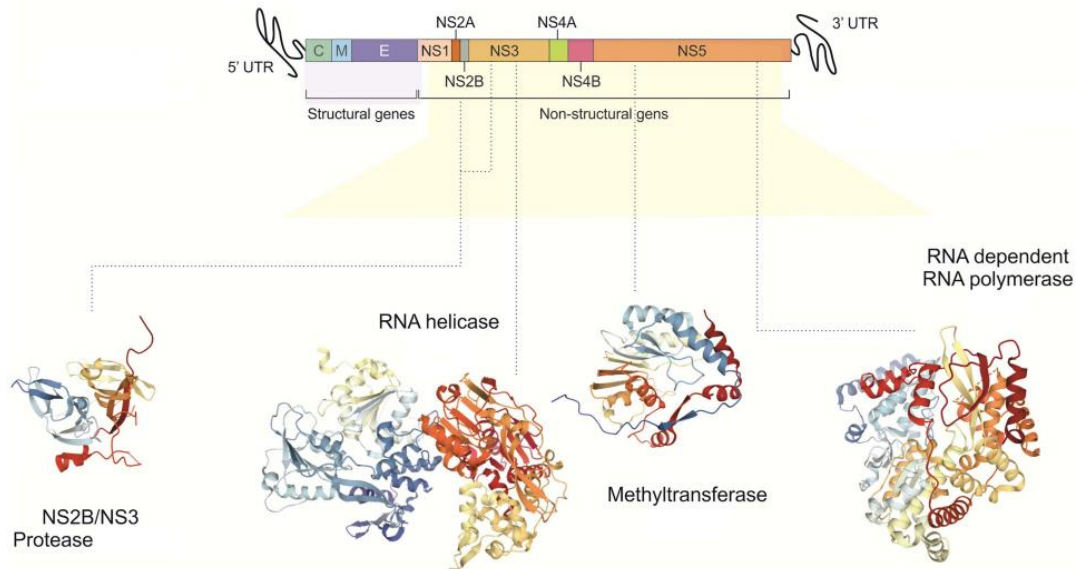
Proteína viral, que es la más conservada entre los DENV y consta de 900 aminoácidos con un peso molecular de 104 kDa.(1,14,16) La NS5 al igual que la

NS3 posee actividad catalítica multifuncional debido a que posee un dominio N-terminal de metiltransferasa y guanidiltransferasa que abarca la región 1-269 y que son las encargadas del cap del ARN viral. También, posee un dominio C-terminal de ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) que se encuentra en los aminoácidos 270-900 y que es necesaria para la replicación del genoma viral.(1,14) Por lo mencionado anteriormente, NS5 cumple funciones esenciales para la replicación del virus.

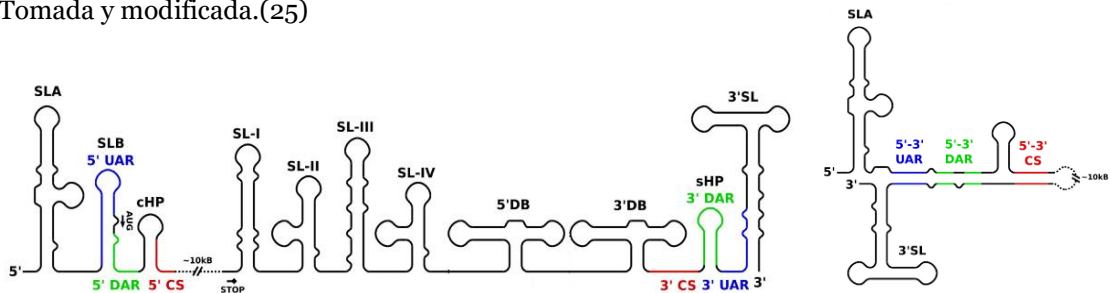
### **I.II.II Genoma del DENV**

El genoma del DENV contiene toda la información genética necesaria para la replicación del virus.(20) El DENV posee un genoma de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva (ssARN(+)) de una longitud aproximada de 11 kb y que tiene una alta tasa de mutación.(11) El genoma del DENV está conformado por un único marco de lectura abierto que codifica para una sola poliproteína transmembranal en el retículo endoplásmico.(20) El genoma viral tiene un cap tipo 1 (m<sup>7</sup>GpppAmpN<sub>2</sub>) en su extremo 5´-UTR y carece de una cola poli-A en el extremo 3´-UTR a diferencia de los ARNm de las células hospederas, como se muestra en la figura 3.(1) El ARN viral posee en sus extremos 5´ y 3´ una región no traducida denominada 5´-UTR (de aproximadamente 100 nucleótidos) y 3´-UTR (de longitud variable), respectivamente, las cuales están altamente estructuradas.(1,20) Dentro de estas dos regiones se encuentran diversas estructuras secundarias de ARN muy importantes para la replicación y traducción viral, que tienen distinto grado de conservación, como se muestra en la figura 4.(21,22) En el 5´UTR a 95-101 nucleótidos de longitud, se encuentra: un elemento de tallo y burbuja o *stem loop A* (SLA) que interactúa con NS5 y, por lo tanto, promueve la replicación viral, además, regula la adición del cap 5´; un *stem loop B* (SLB) importante para la circularización del genoma viral; un tallo o *hairpin* de cápside (cHP), el cual regula el proceso de traducción y circularización.(21) Por otro lado, en la región 3´UTR se encuentran a menudo dos estructuras en forma de mancuerna

(5' DB y 3' DB), que son importantes para la traducción y replicación eficiente; un *stem loop* 3' (3' SL) que es esencial para la replicación pero que no influye en la traducción; un *hairpin* corto (sHP o SSL) importante para la circularización del genoma; y una variable combinación de *stem loops* de 1 a 4 (SL-I, SL-II, SL-III y SL-IV) que participan activamente en la replicación viral.(21,23) A su vez, las regiones 5' UTR y 3' UTR dentro de las estructuras antes mencionadas se encuentran secuencias conservadas.(21) En el 3' UTR existe una secuencia (3' CS) río arriba del 3' SL, que contiene nucleótidos altamente conservados que se conoce como secuencia de circularización o ciclación (3' CYC).(21) También en la estructura sHP se encuentra una secuencia denominada río arriba de la región AUG (3' UAR) y río arriba del 3' SL se encuentra otra secuencia denominada río abajo de la región AUG (3' DAR).(21,24) Por su lado, el 5' UTR posee dentro del SLB la región río arriba de la región AUG (5' UAR), el sitio de inicio de traducción AUG y la secuencia río abajo de la región AUG (5' DAR). Por último, la estructura cHP posee una secuencia conservada (5' CS). Asimismo, para el DENV y otros flavivirus se ha demostrado que el genoma viral se circulariza y es un proceso esencial para la replicación del virus.(21) Para ello, las secuencias DAR/UAR/CS 5' y 3' juegan un papel muy importante, ya que guardan complementariedad y son las encargadas de producir la estructura cíclica para la síntesis del intermediario de cadena negativa que sirve como molde para la producción de nuevos genomas virales ssARN(+).(20,21)



**Fig.3** Estructura general del genoma del DENV. Se indican las diferentes regiones que codifican las proteínas estructurales y no estructurales, así como las regiones 5´UTR y 3´UTR. También se muestran estructuras 3D de algunos dominios de proteínas no estructurales. Tomada y modificada.(25)



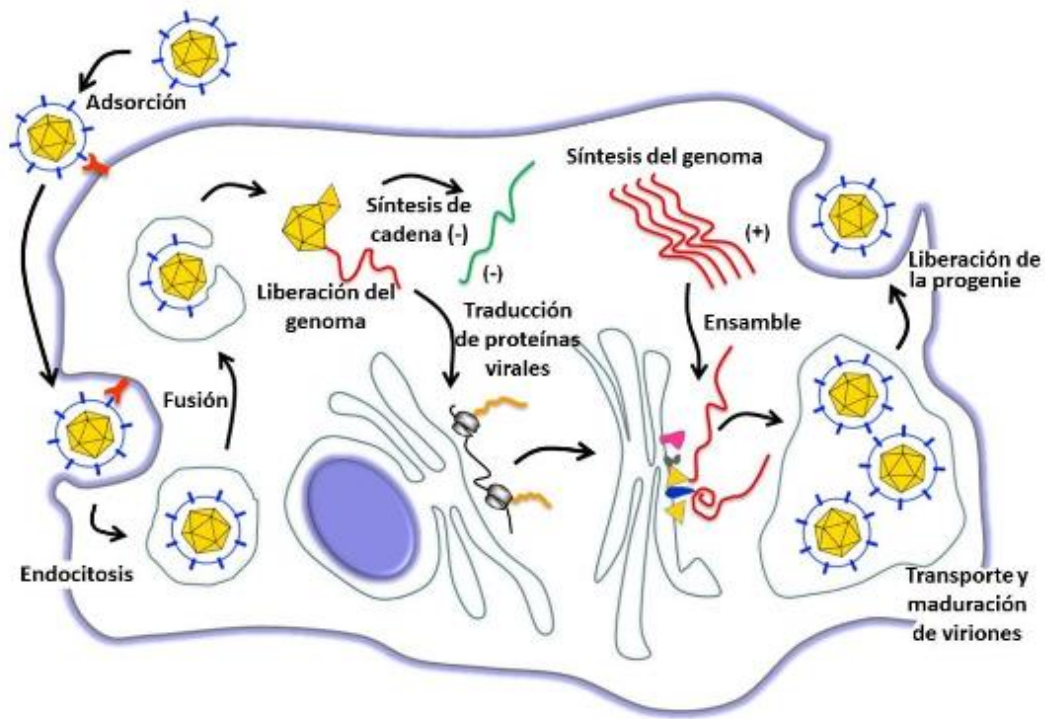
**Fig.4** Representación esquemática de las diferentes conformaciones del genoma de DENV. A la izquierda se muestran las estructuras secundarias del genoma que componen las regiones 5´UTR y 3´UTR. A la derecha se indica una representación de la complementariedad de secuencias DAR/UAR/CS para la circularización del genoma. Tomada y modificada.(21)

### I.II.III Ciclo replicativo del DENV

El ciclo replicativo de DENV en el hospedero humano comienza cuando las partículas virales que ingresan por la picadura del mosquito, se unen mediante el dominio III de la proteína E a los receptores que se encuentran sobre la superficie de las células.(1,14) Entre los receptores y moléculas asociadas a la

entrada del virus a las células hospederas que se han postulado, se encuentran: glicosaminoglicanos (heparán sulfato), la proteína regulada por glucosa 78 (GRP78), proteína disulfuro isomerasa (PDI), el receptor de laminina de alta afinidad, TIM-1, TIM-3, TIM-4, TAM (AXL, Tyro3), CD300a, claudina-1, proteínas de choque térmico 90 y 70 (HSP90 y 70), glucoesfingolípidos (neolactotetraosilceramida), la glicoproteína CD14 y lectinas de tipo C (miembro A de la familia 5 del dominio de lectina tipo C (CLEC5A), la lectina no integrina capturadora de la molécula de adhesión intercelular 3 específica de células dendríticas (DC-SIGN) y los receptores de manosa).(1,26,27) Posteriormente, la partícula viral asociada a los receptores es internalizada a través de endocitosis dependiente de clatrina.(14) Después de la internalización de la partícula viral, el endosoma temprano madura a un endosoma tardío que por su pH bajo provoca un cambio conformacional en la proteína E viral que conduce a la exposición del péptido de fusión del dominio II, el cual se encarga de inducir la fusión de la membrana lipídica viral con la membrana del endosoma, permitiendo el desensamblaje del virus y la liberación de la nucleocápside en el citoplasma.(14) A continuación, la nucleocápside se disocia estructuralmente, liberando al genoma viral que inmediatamente puede ser traducido por los ribosomas de la célula hospedera. El ssARN(+) se traduce en una sola poliproteína que es procesada co y postraduccionalmente (escisión, plegamiento y glucosilación) por la proteasa viral NS2B/NS3, la peptidasa señal celular en el RE y otras proteínas celulares, para dar lugar a las tres proteínas estructurales y las siete proteínas no estructurales.(14) Después de la traducción y procesamiento de las diversas proteínas virales, el genoma viral puede servir como molde para la producción de nuevos genomas virales de ARN. Para ello, en la membrana del RE se ensamblan múltiples proteínas virales y celulares para formar vesículas especializadas en la replicación del genoma viral de DENV denominadas complejos de replicación (CR).(14) En los CR el ssARN(+) se circulariza y NS5 sintetiza un intermediario de ARN en sentido negativo, que a su vez es utilizado como molde por la misma NS5 para producir nuevas copias de ssARN(+) virales.(1) Los ARNs virales recién sintetizados pueden producir más proteínas virales, generar más copias de

ARN o encapsidarse como genoma de la progenie viral. Para esto último, en la membrana del RE, el ARN viral y las proteínas estructurales se ensamblan en nuevos viriones inmaduros, que son transportados por la red trans-Golgi donde el virión que tiene a la proteína prM-E dispuesta en forma de picos sufre un cambio de conformación provocado por la variación de pH, que proporciona una apariencia lisa a la partícula viral, luego, el virión inmaduro es procesado por la furina localizada en el aparato de Golgi para escindir a la proteína prM.(1,14) En esta última partícula viral todavía inmadura con apariencia lisa, la región pr escindida permanece asociada a la proteína M, hasta que en el paso final, los viriones se liberan de las células hospederas y la región pr es separada de la proteína M por acción del pH extracelular, dando lugar a la partícula viral madura infecciosa, como se muestra en la figura 5.(14,15)



**Fig.5** Ciclo de replicación del DENV. Se muestran las diferentes etapas del ciclo replicativo, incluyendo: unión (adsorción) y entrada (endocitosis), liberación del genoma, traducción de proteínas virales, replicación del genoma, ensamblaje, maduración y morfogénesis y liberación de partículas virales. Tomada.(28)



## **I.III Epidemiología**

### **I.III.I Incidencia y Mortalidad**

El dengue es frecuente en regiones tropicales y subtropicales, por lo que es endémica en más de 100 países, incluyendo diversas regiones de América, África, el sudeste de Asia, Europa, el Pacífico Occidental y el Mediterráneo Oriental; donde las condiciones geográficas, demográficas, y epidemiológicas son favorables para la transmisión por el mosquito vector.(1–3) Debido a la incidencia y mortalidad del dengue, esta ha sido clasificada como la segunda enfermedad más grave transmitida por vectores, solo por debajo de la malaria.(29) Con respecto a la incidencia mundial de esta enfermedad, se debe hacer notar que se ha multiplicado más de 30 veces en los últimos 50 años coincidiendo evidentemente con la expansión geográfica de los mosquitos vectores y el DENV.(1,29) Además, se ha estimado que anualmente el número de personas a nivel mundial que se infectan por DENV se encuentra en el rango de 284 a 528 millones, de las cuales 96 millones son casos que presentan síntomas con distintos niveles de gravedad y 2 millones de casos desarrollan enfermedad grave.(1,2,29) Por otro lado, se han realizado diversos estudios para conocer los factores asociados con la alta incidencia o el surgimiento de brotes en determinadas regiones. Dentro de estos factores se encuentra: el uso discontinuo de agentes químicos de control de mosquitos, escasa información en la población sobre la enfermedad del dengue; mayor índice de depósitos larvarios e índice larval; regiones de menor altitud, menor temperatura, mayor humedad y mayor precipitación; índice de población sesgado a mayor edad; viviendas ubicadas cerca de comercios o cerca de áreas con alcantarillado descubierto; presencia de criaderos de mosquitos en jardines o patios, incluidas latas desechadas, contenedores de plástico, llantas, estanques, canaletas para recolectar agua de lluvia y en general, contenedores de almacenamiento de agua; viviendas con gran cantidad de personas, falta o inadecuada recolección de desechos, almacenamiento deficiente de agua en el hogar, falta de aire acondicionado y descarga de aguas residuales directamente

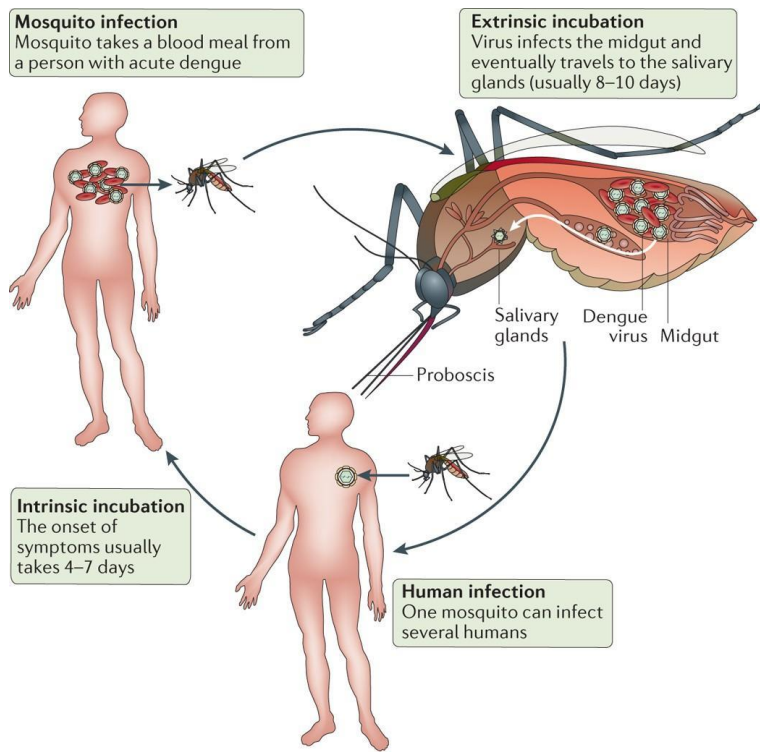
en estanques o desagües de la calle; entre otras.(1) Por su parte, la mortalidad se ha estimado en años recientes, con cifras de aproximadamente 20,000-22,000 muertes cada año.(1,3,30) Aunado a esto, más de 3 mil millones de personas que viven en más de 100 países tienen riesgo de contraer la enfermedad al infectarse con DENV.(3) El dengue se ha identificado como una enfermedad con pronóstico incierto debido a las tendencias hacia el aumento de la urbanización, la escasez de agua y posiblemente, el cambio ambiental en el planeta.(3) En México, al igual que en todo el continente Americano, el dengue ha sido reportado en personas de todas las edades (principalmente en la población adulta). Sin embargo, existe una tendencia de aumento en la población infantil y juvenil, como lo que sucede en países del continente asiático donde el dengue afecta principalmente a personas menores de 15 años.(31) De acuerdo al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), hasta la semana 33 de vigilancia epidemiológica en México, que comprende hasta el 21 de agosto de 2021 se han reportado 1756 casos confirmados de dengue (dengue sin signos de alarma= 1085, dengue con signos de alarma= 573 y dengue grave=98). En 2020, hasta la semana de vigilancia epidemiológica número 33 se confirmaron 7,278 casos de dengue y con un total al final del año de 24,313 personas enfermas de dengue. Por otro lado, en 2019 se confirmaron hasta esa semana, 8,973 casos y un total al final del año de 41,505 casos de dengue.(32,33) Como se puede observar, la incidencia de casos de dengue en México en 2021 tiene una tendencia a la baja con respecto a los años anteriores e igualmente ha sido identificada en otros países del continente asiático. Sin embargo, este comportamiento posiblemente no refleja la verdadera naturaleza de la propagación de la enfermedad y podría deberse a la detección y notificación insuficiente de casos de dengue en los sistemas médicos afectados por la pandemia de COVID-19, así como a los bloqueos sociales por dicha causa. De igual modo, la OMS basa estos resultados en un control de vectores más proactivo, sistemas nacionales de vigilancia más sólidos y una mejor comunicación con la comunidad. En el panorama nacional, prácticamente todas las regiones del país han reportado casos de dengue, no obstante, estados como: Veracruz, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Tabasco,

Nuevo León y San Luis Potosí, entre otros, son los más afectados, mientras que Tlaxcala y Ciudad de México son los únicos que no han reportado casos de dengue.(33)

#### **I.IV Transmisión**

El DENV se transmite a las personas a través de las picaduras (para obtener alimento de sangre) de mosquitos hembra del género *Aedes* que están infectados.(6) *Aedes aegypti*, el principal vector, es un mosquito tropical y subtropical diurno, capaz de picar a muchas personas en un corto período de tiempo (en promedio el mosquito hembra vive entre 1 y 2 semanas), reproducirse en varios tipos de recipientes con agua en su interior y vivir en hábitats urbanos.(16) Los mosquitos se infectan cuando pican a una persona infectada con DENV en fase de viremia, aunque, también puede ocurrir transmisión vertical de la mosquito hembra infectada a su descendencia, siendo un proceso esencial para mantener los ciclos de transmisión durante los períodos entre pandemias y brotes.(6) Después, el DENV ingresa y se replica en las células del intestino del mosquito en donde las partículas virales son liberadas y diseminadas al hemocele y otros tejidos secundarios, incluyendo las glándulas salivales.(14,34) El período de incubación en el mosquito que transcurre desde la ingestión del DENV y la transmisión a otro humano es de aproximadamente 8-10 o hasta 12 días en condiciones ambientales de 25°C-28°C, como se observa en la figura 6.(3,34) Sin embargo, no debe olvidarse la influencia de factores virales sobre la replicación en el mosquito, y consecuentemente en su transmisión, como el serotipo, genotipo y carga viral.(34) Posterior al tiempo de incubación, los mosquitos infectados son capaces de transmitir el DENV a otras personas. Cabe destacar que una vez que el mosquito hembra ha contraído al DENV es capaz de transmitir al virus durante toda su vida.(34) También, se conocen rutas de transmisión al humano sin la participación de vectores, incluidas la transfusión de sangre, el trasplante de médula ósea y la transmisión vertical durante el parto.(29) En el humano,

la infección por DENV tiene un período de incubación que se encuentra en el rango de 4 a 7 días.(1,2)



**Fig.6** Ciclo de transmisión del DENV entre mosquitos *Aedes* y humanos. Tomada.(3)

## I.IV Patogénesis

La evidencia científica propone que *in vivo*; los monocitos, macrófagos, células dendríticas, hepatocitos y células endoteliales esplénicas son los principales blancos de la infección por el DENV.(14,26,35) También se ha encontrado que en muestras de autopsias, en células como queratinocitos, mastocitos, linfocitos, células endoteliales linfáticas y fibroblastos, hay presencia de DENV, aunque no se ha demostrado que exista replicación viral.(35) La patogénesis del dengue está influenciada por diversos factores del hospedero y del virus, incluyendo: el antígeno NS1, serotipo o genotipo, el ARN subgenómico, el Aumento de la Infección Dependiente de Anticuerpos (ADE), las células T de memoria con reactividad cruzada, anticuerpos anti-NS1 y autoinmunidad.(1,2) Actualmente se conoce que cuando una persona logra

recuperarse de la infección por algún serotipo de DENV, el sistema inmune le otorga protección durante toda la vida específicamente contra ese serotipo.(36) Sin embargo, si esa persona llega a infectarse en un período mayor a 2 años con un serotipo distinto (infección secundaria) al de la primera infección se ha observado que el riesgo de tener dengue grave aumenta (aunque se puede desarrollar dengue grave en la infección primaria).(14) Este tipo de manifestación de dengue grave puede ser explicado por el proceso ADE, debido a que durante la infección primaria, se producen anticuerpos neutralizantes de larga duración específicos de serotipo, los cuales pueden tener reactividad cruzada contra otros serotipos de DENV a pesar de que no son neutralizantes (subneutralizantes).(37) Posteriormente, en la infección secundaria con un serotipo diferente de DENV, los anticuerpos subneutralizantes interactúan con las partículas virales formando complejos que pueden unirse a los receptores Fc gamma (Fc $\gamma$ R) expresados principalmente en células como: monocitos, macrófagos y células dendríticas, y que permiten que sean internalizados, provocando que las partículas virales ingresen más fácilmente a la célula sin ser eliminados (hay una mejora en la eficiencia de fusión de las membranas virales y celulares).(1,2) Por lo tanto, se contribuye directamente a la replicación, producción viral y al aumento de la infección. Además, la evidencia sugiere que la supresión de la respuesta inmune por el DENV, mediante la alteración de factores como la producción de IFN I, óxido nítrico, citocinas proinflamatorias, inhibición de la señalización por los receptores tipo Toll (TLR) y el aumento de citocinas antiinflamatorias puede apoyar los efectos causados por la ADE, ya que pueden prolongar la vida de las células infectadas y seguir produciendo la progenie viral.(1,2) En contraparte, también se cree que la infección por ADE puede estimular excesivamente la activación celular de linfocitos y macrófagos, induciendo la liberación de citocinas “tormenta de citocinas” que promueven, entre otros aspectos, la permeabilidad vascular, lo que facilita la fuga plasmática y así la gravedad de la enfermedad.(14) Sin embargo, no todos están de acuerdo con esta afirmación, ya que se ha observado que en la infección secundaria por otro serotipo de DENV con respecto a la infección primaria, no siempre aumenta la gravedad del

dengue.(1) Por otro lado, factores del hospedero también pueden contribuir a la patogénesis y gravedad de la enfermedad, como: polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en genes del antígeno leucocitario humano (HLA) y polimorfismos en: genes del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Fc $\gamma$ RII, antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4), factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1), DC-SIGN, transportador asociado con el procesamiento de antígenos (TAP) y la cinasa 1 de Janus (JAK1).(2,14)

### **I.V Características clínicas**

El dengue es una enfermedad sistémica y dinámica con un amplio espectro clínico que va desde una infección asintomática hasta manifestaciones clínicas leves y graves.(6) Las personas que presentan dengue sintomático pueden desarrollar 3 fases clínicas. En la fase aguda se presenta un cuadro clínico similar a la gripe caracterizado por fiebre y carga viral elevada, donde los pacientes desarrollan una fiebre repentina de alto grado junto a náuseas, vómito, pérdida de apetito, erupción cutánea, dolor retroocular, dolor muscular, dolor en los huesos y dolor en las articulaciones, que pueden durar de 2 hasta 7 días.(3,38) En la fase crítica un sector de la población infectada puede mostrar disminución temporal de la fiebre acompañada de manifestaciones graves como la hemorragia y pérdida de plasma debido a la alteración del proceso de coagulación, al aumento de la fragilidad vascular y al aumento de la permeabilidad vascular.(1,2) Estas manifestaciones graves pueden conducir a hemoconcentración, shock hipovolémico y consiguientemente a disfunción multiorgánica que pone en riesgo la vida del paciente.(1,2) En el mejor de los casos los pacientes se recuperarán si logran sobrevivir a las primeras 24 a 48 h de la fase crítica.(3) La recuperación comprende la última etapa donde ya no hay más pérdida de plasma y los líquidos filtrados a las cavidades extravasculares se reabsorben gradualmente, lo que le permite al paciente superar la enfermedad en las siguientes 48 a 72 h.(1,3,6,39) Cabe mencionar que el serotipo y el genotipo de DENV pueden

influir significativamente en la gravedad de la enfermedad, debido a su capacidad infectiva y replicativa, distintiva.(40) La evidencia sugiere que los serotipos 2 y 3 de DENV, en la infección secundaria, están más relacionados con casos graves de dengue. Ahora bien, los cuatro serotipos pueden causar dengue grave.(6)

## **I.VI Diagnóstico**

La enfermedad del dengue no sólo debe basarse en la identificación de los síntomas, ya que su amplio espectro e inespecificidad pueden dar resultados erróneos.(39) En la actualidad, se encuentran disponibles diversas herramientas de diagnóstico que son muy útiles durante ciertas fases de la enfermedad. Durante los primeros días de la infección (antes de 5 días), el dengue puede diagnosticarse a través del aislamiento y detección del genoma de ARN viral en muestras de sangre, líquido cefalorraquídeo o biopsia hepática, con pruebas de amplificación de ARN, entre las que se incluye: RT-PCR, Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle, etc., o mediante la detección de antígenos virales como la proteína NS1 con técnicas como ELISA.(38,41) Después de los primeros 5 días de la infección, es posible que el genoma viral y los antígenos de DENV ya no sean detectables, probablemente porque ha disminuido la viremia y la enfermedad se encuentra gobernada por la respuesta inmune donde específicamente los anticuerpos aumentan. Debido a esto, la detección de anticuerpos específicos mediante métodos serológicos como ELISA es la mejor opción en esta etapa.(39) Sin embargo, en las regiones geográficas en donde circula más de un flavivirus, la reactividad cruzada reduce la precisión del diagnóstico.(42)

## **I.VII Tratamiento**

El tratamiento actual para el dengue consiste en atención de apoyo y terapia adyuvante que tienen como objetivo limitar las

complicaciones y la gravedad de los síntomas.(38,43) Dentro de la atención de apoyo se encuentra la prescripción de reposo en cama y la fluidoterapia oral o intravenosa (equilibrio del volumen y la composición de los líquidos corporales) que es esencial en el manejo clínico del dengue.(3) Por otro lado, la terapia adyuvante consiste principalmente de analgésicos y antipiréticos, como el paracetamol, que pueden ser prescritos en dosis habituales.(3) Sin embargo, debe evitarse el uso de ácido acetilsalicílico y otros antiinflamatorios no esteroideos debido a sus efectos sobre la coagulación sanguínea.(3) Además, es importante recordar que el aislamiento es una medida que debe adoptarse en estos casos, con el objetivo de evitar la velocidad de transmisión y, con ello, la incidencia de la enfermedad.(29) Con respecto a la terapia farmacológica, al día de hoy, no hay medicamentos específicos, seguros y eficaces que la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) haya aprobado para el tratamiento de dengue, pero se están realizando grandes esfuerzos para desarrollar compuestos antivirales dirigidos a bloquear el ciclo replicativo viral o a factores del hospedero que sean factibles para su uso.(37)

## **I.VIII Vacunas**

Debido al problema de salud tan importante que es el dengue a nivel mundial, es necesario y urgente el desarrollo de una vacuna que pueda estimular las respuestas inmunitarias contra todos los serotipos de DENV y sea efectiva para la prevención de las formas graves de la enfermedad.(40) Se han explorado a lo largo de los últimos 50 años diversas estrategias para el desarrollo de vacunas para el dengue, que van desde emplear la atenuación e inactivación del DENV hasta el uso de proteínas recombinantes, vacunas de ADN, vacunas basadas en partículas similares a virus y vacunas de vectores virales.(3,29,40) Las vacunas atenuadas son las que mejores resultados han demostrado, entre ellas, se encuentra la vacuna tetravalente quimérica viva atenuada CYD-TDV de *Sanofi Pasteur* (Dengvaxia®) que en 2016 completó los ensayos clínicos de fase III demostrando protección moderada contra DENV-1,3 y 4, pero baja



eficacia para el serotipo 2, y fue aprobada para su uso en México, Brasil, Salvador, Paraguay, Filipinas y otros países.(3) Sin embargo, pronto fueron apareciendo problemas de seguridad cuando las personas que recibieron la vacuna no tenían antecedentes de infección con dengue y solo benefició a aquellos que tenían exposición previa al patógeno.(29,37) Debido a esto, aunque en la actualidad es la única vacuna que está autorizada en 20 países para la prevención del dengue, su uso está limitado. Por ejemplo, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) en México, autorizó su empleo únicamente en personas de 9 a 45 años que habitan en zonas endémicas y que hayan tenido exposición previa al DENV. En su caso, la FDA en Estados Unidos, la ha autorizado en personas de 9 a 16 años que hayan tenido infección por dengue previa y habiten en zonas endémicas.(43) De lo contrario, fuera de estas especificaciones, las personas vacunadas corren el riesgo de presentar dengue grave al infectarse después de la vacunación. Para la vacunación con Dengvaxia® se necesitan tres dosis con intervalos de 6 meses.(43) Un candidato a vacuna atenuada que se encuentra en ensayos clínicos es denominada TAK-003 (conocida como DENVax) de *Takeda Pharmaceutical Company*, esta ha demostrado una eficacia variable según el serotipo: DENV-2 (97,7%), DENV-1 (73,7%) y DENV-3 (62,6%) y obtuvo resultados no concluyentes contra DENV-4.(44) Además, durante la 8ª Conferencia del Norte de Europa sobre Medicina del Viajero (NECTM8) realizada en junio del 2022, Takeda informó que TAK-003, previno el 84% de las hospitalizaciones por dengue y el 61% de los casos de dengue sintomático, sin que se hayan identificado riesgos importantes para la seguridad en la población general. Los resultados indican que TAK-003 podría ser una herramienta muy importante para prevenir el dengue, sin embargo, sigue en marcha la evaluación de la seguridad y eficacia a largo plazo. TAK-003 se encuentra actualmente en fase de revisión regulatoria para la prevención del dengue en niños y adultos en la Unión Europea y en algunos países, como: Argentina, Brasil, Colombia, Indonesia, Malasia, México, Singapur, Sri Lanka y Tailandia, donde la enfermedad es endémica.(44,45) Adicionalmente, TV003/TV005 (conocida como LATV Δ30) del *National Institutes of Health* es

una candidato a vacuna tetravalente atenuada, la cual se está probando en un ensayo clínico de fase III, con resultados esperados para 2025.(44) Asimismo, hay otros candidatos a vacunas desarrollados con diversas estrategias, que están siendo evaluados en ensayos de fase I, incluyendo: una vacuna tetravalente de virus purificado inactivado con formalina realizada por *GlaxoSmithKline* y el *Walter Reed Army Institute of Research*; una vacuna de ADN con prM-E monovalente de DENV-1 y prM-E tetravalente administrado con biojector sin aguja desarrollada por el *Naval Medical Research Center*; V180, una vacuna de subunidad recombinante de la proteína E producida por *Hawaii Biotech Inc.* y *Merck*; y por último, una vacuna heteróloga basada en una primera dosis de vacuna tetravalente atenuada viva seguida de un refuerzo con virus purificado inactivado con formalina desarrollada por el *U.S. Army Medical Research and Development Command*.(46) Fundamentalmente, la vacuna ideal para dengue tiene que poseer las siguientes características: su uso debe ser seguro en toda la población, debe evitar los efectos provocados por la ADE y el desarrollo de la enfermedad, que las dosis necesarias no sean mayores a dos, que induzca un equilibrio entre reactogenicidad e inmunogenicidad, que sea genéticamente estable, que estimule la producción de anticuerpos neutralizantes rápidamente e inmunidad polarizada a células Th1, que promueva inmunidad de larga duración para todos los serotipos, que pueda ser almacenada y transportada fácilmente, y que sea viable económicamente.(40) Aunque se han estado desarrollando diversas vacunas que cumplan con los requisitos antes mencionados, actualmente, ninguna vacuna contra el dengue ha logrado tener éxito total, principalmente por varios desafíos importantes como: la variación genética entre los serotipos y genotipos que dificulta el desarrollo de una vacuna tetravalente, protección contra los cuatro serotipos para disminuir la probabilidad de provocar ADE, escasa inmunidad de larga duración en todos los serotipos y la falta de modelos animales con gran similitud de infección para estudios de inmunidad, etc.(3,29,40)

## II. ANTECEDENTES

### II.I Desarrollo de fármacos antivirales

Aunque actualmente no hay un tratamiento farmacológico específico, seguro y eficaz para el dengue, la búsqueda y desarrollo de nuevos agentes que puedan tener un efecto terapéutico sigue siendo una prioridad en la investigación de esta enfermedad.(1) En general, el descubrimiento y desarrollo de fármacos antivirales se puede abordar de dos formas: las estrategias dirigidas a componentes virales y las enfocadas a factores del hospedero.(27) Los compuestos dirigidos a los componentes virales tienen la ventaja de que la toxicidad y efectos secundarios son mínimos para el hospedero, debido a que la acción no es directa sobre los componentes celulares.(27) Sin embargo, tiene la desventaja de que puede perder efecto debido a las rápidas mutaciones que sufren las partículas virales, produciendo un efecto de selección sobre los virus generando variantes más resistentes a los medicamentos.(27,37) Por otro lado, los compuestos dirigidos a factores del hospedero poseen la ventaja de evitar la resistencia a los fármacos, debido a que la tasa de mutación del hospedero es menor.(27) Aunque, la desventaja de utilizar este enfoque puede estar en el aumento de la probabilidad de causar toxicidad y efectos secundarios, ya que se afecta directamente a la homeostasis celular.(27) Adicionalmente, las terapias dirigidas al hospedero tienen el inconveniente en la correlación *in vitro* e *in vivo*, por la falta de un modelo animal representativo de la enfermedad.(27) De igual modo, tanto las estrategias dirigidas al hospedero y a las proteínas virales pueden seguir un sistema de reposicionamiento de fármacos ya aprobados o el desarrollo de nuevos compuestos.(47) En general, los tratamientos ideales deberían cumplir con las siguientes características: actividad antiviral contra los cuatro serotipos, capacidad de resolver rápidamente los síntomas del dengue, mínima toxicidad e interacción con otros compuestos, producción a gran escala, bajos costos y tolerabilidad en un amplio rango de la población, como en mujeres embarazadas y pacientes con comorbilidades.(1)

### **II.I.I Compuestos dirigidos a componentes virales**

Los compuestos dirigidos a los factores virales, tienen como objetivo molecular a las proteínas estructurales y no estructurales del DENV. Particularmente, la proteína E (debido a su participación en la entrada y liberación del genoma viral), la proteína NS3 y la proteína NS5 (por su actividad enzimática multifuncional) han sido los objetos de mayor estudio para el desarrollo de agentes antivirales.(27) Cabe desatacar que todas las proteínas virales tienen una función esencial para la replicación, por lo que su estudio puede ayudar a encontrar candidatos a fármacos contra dengue. A su vez, los compuestos antivirales pueden ser clasificados en: fármacos peptídicos, moléculas pequeñas no peptídicas y fármacos de origen natural.(27) Los fármacos peptídicos han demostrado ser más seguros, selectivos, eficaces y específicos, aunque, además de ser muy hidrofílicos, no pueden ser administrados por vía oral debido a su vida corta en el tracto gastrointestinal.(27) Entre los fármacos peptídicos que se han desarrollado y estudiado para dengue, se incluyen: pep 14-23, AS1411, y PC-D2C/SN que tienen como diana molecular a la proteína C; DV413-447/DV419-447, DN59, DET2, DET4, DN57opt, 1OAN1 y MLH40 que tienen actividad sobre la proteína E.(27) Con respecto a los fármacos de moléculas pequeñas no peptídicas, las cuales tiene naturaleza sintética, poseen la ventaja de ser fáciles de producir y almacenar, además, pueden ser administradas por vía oral y tienen menos capacidad inmunogénica, con respecto a los péptidos.(27) Sin embargo, tiene la desventaja de que por su tamaño pueden ser inespecíficos y pueden acumularse en el hospedero con mayor facilidad.(27) Los fármacos que se han desarrollado con esta estrategia, incluyen: ST-148, VGTI-A3/VGTI-A3-03 que están dirigidos a la proteína C; 1662G07, condroitín sulfato E, compuesto 7, heparina, polisulfato de pentosán y suramina, ácido glucurónico 3-O-sulfatado, rolitetraciclina/doxiciclina, NITD448, SA-17, sulfato de curdlan, compuesto-3e/3h, compuesto-6, PO2, HHA/GNA/UDA/pradimicina-S, polisacárido sulfatado K5, BP34610, A5, LCTA-949 y ácido zostérico/CF238 con actividad contra la proteína E viral; AT-752, NITD-1, NITD-2, sofosbuvir, HeE1-2Tyr, DMB220, 4-HPR y 66E2 con

actividad en NS5; compuestos 1a y 14a con actividad sobre NS4B y los compuestos 7, 8, 14, 16, 19, 104, 4e, 4j, policresuleno, NSC135618, ST-610, suramina, SK-12, 23i y MB21 con actividad en NS3.(27,48) Del mismo modo, balapiravir y ribavirina con actividad sobre la polimerasa NS5 lograron llegar hasta ensayos clínicos, aunque, el primero no demostró beneficio clínico contra dengue y los resultados no se publicaron para el segundo.(1,27) Por último, los fármacos de origen natural que se han estudiado y han demostrado acción sobre la replicación viral, incluyen: geranina, fosfolipasa A2, fucoidan, carragenano, PI-88, galactomananos sulfatados, ácido chebulínico y punicalagina, las cuales se dirigen a la proteína E inhibiendo sus funciones, y la antraquinona dirigida a la proteína NS3.(27) Además de estos fármacos, el uso de anticuerpos para inhibir la infección por DENV ha sido ampliamente investigado, por ejemplo, hoy en día los anticuerpos monoclonales denominados AV-1 y Dengushield están en fase de reclutamiento en ensayos clínicos para evaluar su seguridad como posible tratamiento para el dengue.(49)

## **II.I.II Compuestos dirigidos a factores del hospedero**

Los compuestos antivirales dirigidos al hospedero tienen como objetivo molecular a aquellos factores celulares involucrados y necesarios para que el DENV pueda infectar, replicarse y causar enfermedad.(37) Dentro de estos factores que han sido explorados, se encuentra: el receptor DC-SIGN y TIM-1, la vía de la ubiquitina-proteasoma, la furina, la vía endocítica, la  $\alpha$ -glucosidasa, la inosina monofosfato deshidrogenasa, mediadores de la permeabilidad vascular, la sintasa de ácidos grasos (FAS), la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMGCR) y la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), entre otros.(27) Algunos agentes terapéuticos que siguen esta estrategia han llegado a ser probados en ensayos clínicos, como: lovastatina, cloroquina, sulfonato sódico de carbazocromo, prednisolona, celgosivir, UV-4B y ketotifeno.(1,47) Sin embargo, ninguno de ellos demostró diferencia en marcadores virales,

beneficio clínico en pacientes con dengue o los ensayos no fueron completados.(1,47) Actualmente los fármacos zanamivir y montelukast que tiene como objetivo disminuir la permeabilidad vascular asociada al dengue grave se encuentran en fase de reclutamiento de ensayo clínico, mientras que la metformina dirigida a la activación de AMPK celular se encuentra en curso un ensayo clínico, con el objetivo de evaluar su potencial como tratamiento para el dengue.(49)

## **II.II Lípidos como blanco terapéutico en la infección por DENV**

Entre los factores del hospedero que han sido más estudiados, es importante destacar a los lípidos de la células hospedera, ya que la infección por diversos flavivirus (incluyendo el DENV) se encuentra directamente asociado con ellos. Diversos ensayos han demostrado que los lípidos, incluyendo el colesterol, cumplen una función crucial durante el ciclo viral del DENV.(50,51) Además, se ha identificado que la infección por DENV es capaz de regular y reprogramar el metabolismo de los lípidos en la célula, creando un entorno favorable para modular correctamente el ciclo replicativo del virus.(50) Esto, no es de sorprender dado que la partícula viral posee en su estructura una membrana lipídica que adquiere de la célula hospedera durante la infección. Otros descubrimientos que sustentan esta evidencia, consisten en que: los distintos receptores para la entrada del virus a la célula se encuentran en regiones ricas en lípidos denominadas balsas lipídicas; la replicación del genoma viral se desarrolla en complejos de replicación, los cuales, son compartimientos especializados generados en el RE que requieren, entre otros, ácidos grasos, colesterol, fosfolípidos y esfingolípidos.(50) Con respecto a ello, la proteína viral NS3 recluta a la enzima sintasa de ácidos grasos en el RE incrementando su actividad. Por otro lado, la proteína C se acumula en las gotas de lípidos para contribuir junto a los CR como andamio en el empaquetamiento del genoma viral y la formación de las nucleocápsides.(50) Los lípidos también forman parte importante de la patogénesis y evasión inmune del DENV, ya que,

la proteína NS1 puede ser secretada como un hexámero con forma de barril abierto y con un canal central rico en lípidos, contribuyendo directamente a sus funciones deletéreas. También, se ha demostrado que los niveles altos de colesterol inducen una respuesta defectuosa al IFN tipo I, conduciendo a un estado deficiente de la respuesta inmune ante la infección por DENV.(50) Concretamente, nuestro grupo de trabajo encontró que durante la infección por DENV existe un incremento en los niveles de colesterol intracelular debido al aumento de su captación mediante los receptores de lipoproteínas de baja densidad en la superficie celular y por la biosíntesis intracelular.(50) Este último proceso está regulado entre otras, por la actividad de la enzima limitante HMGCR encargada de catalizar el paso de HMGC a ácido mevalónico para posteriormente dar lugar a la formación de colesterol. De esta manera, nuestro grupo de investigación informó de un aumento en la actividad de la HMGCR durante la infección por DENV. Más adelante, se demostró que dicho aumento en la actividad de HMGCR durante la infección por DENV está regulado por la inhibición de la actividad enzimática de la AMPK, la cual, es un importante regulador metabólico de diferentes rutas celulares.(50–52) Debido a esto, la evidencia sugirió que la AMPK podría ser un nuevo objetivo antiviral contra la infección por DENV y que fármacos como la metformina que tienen la capacidad de activar a la AMPK podrían ser buenos candidatos terapéuticos. Referente a lo último, se logró probar que los fármacos que reducen la biosíntesis de colesterol disminuyen la infección por DENV, lo cual, validó la oportunidad de desarrollar y probar estrategias anti-DENV con fármacos como los activadores de la AMPK, incluyendo la metformina.(50,53)

### **II.III Biguanidas**

Las biguanidas son un grupo de moléculas con actividad biológica que están compuestas estructuralmente por la fusión de dos moléculas de guanidina y se ha observado que es una fracción molecular terapéuticamente importante. Los compuestos derivados de la biguanida presentan un amplio espectro de

diversas actividades biológicas, como: antidiabéticos (metformina, fenformina y buformina), antipalúdicos (proguanil y cicloguanil), antivirales (moroxidina) y antisépticos (clorhexidina, alexidina, picloxidina y polihexanida).(54) Entre todas las biguanidas, la metformina es el fármaco que ha obtenido mayor éxito como agente terapéutico. Sin embargo, se están investigando muchas aplicaciones terapéuticas nuevas para diversos derivados de biguanida.

### **II.III.I Metformina**

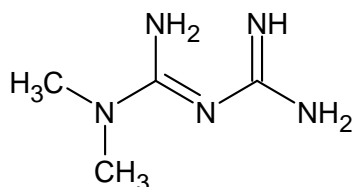
La metformina (1,1-dimetilbiguanida) es el fármaco antihiper glucemiante oral más recetado a nivel mundial, que ha sido ampliamente usado por su perfil de efectos secundarios leves, accesibilidad y facilidad de administración durante más de 60 años para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.(55,56) La historia del desarrollo de la metformina proviene desde 1772 donde la planta *Galega officinalis* se usaba para tratar los síntomas de la diabetes. Después, entre 1844 y 1861 se identificó y sintetizó la guanidina, mientras que en 1878-1879 se logró sintetizar la biguanida. Posteriormente, en 1918, se descubrió que la guanidina (presente en grandes cantidades en *G. officinalis*) tenía la capacidad de reducir la glucosa en sangre.(55,57) Luego, en 1922 Werner y Bell, sintetizaron algunos derivados de guanidina (incluida la metformina).(55) Más tarde, entre 1926 y 1928 se identificaron la Galegina y la Sintalina como compuestos de *Galega officinalis* que de igual manera disminuían la glucosa en animales y humanos, y se comenzaron a emplear para el tratamiento de la diabetes. Sin embargo, surgieron problemas de salud en los pacientes, por lo que se tuvo que suspender su uso debido a su toxicidad y a la reciente disponibilidad de insulina.(54,55) Tuvo que pasar más de una década para que en 1944-1947, en el desarrollo independiente de un agente antipalúdico a base de guanidina denominado proguanil, se informó su capacidad de reducir los niveles de glucosa en sangre. Gracias a esto, en 1949-1950 se siguieron buscando otros antipalúdicos a base de guanidina y se redescubrió la metformina. El médico filipino Eusebio García usó metformina para tratar la



influenza e informó que este compuesto podía tener un efecto reductor de la glucosa en la sangre de los pacientes.(55) Pasaron algunos años, hasta que en 1957, el médico francés Jean Sterne publicó el empleo de metformina para el tratamiento de la diabetes, aunque su uso no fue generalizado y su alcance terapéutico era opacado por otras biguanidas (fenformina y buformina).(54,55) En 1995 la metformina fue objeto de múltiples estudios y fue aprobada e introducida en los Estados Unidos, con lo cual, recibió más atención.(54,55) En 1998, el uso de la metformina se hizo más extenso, debido en gran parte al informe de efectos metabólicos a largo plazo de la metformina y a su efecto en la reducción del riesgo cardiovascular.(54,55) En 2011, finalmente la metformina se incluye en la lista de medicamentos esenciales de la OMS.(55)

La metformina es una molécula derivada de la biguanida con una región no-polar compuesta principalmente de dos grupos metilo, como se muestra en la figura 7. Es una base catiónica (monoprotonada), hidrofílica a pH fisiológico, relativamente plana y posee diversas configuraciones tautoméricas.(54,55) Las dosis habituales de la metformina son de 500, 850 y 1000 mg/8-12h y la dosis diaria máxima es de 3000 mg.(55) La formulación estándar se absorbe rápidamente aunque incompletamente en el intestino delgado, por lo que su biodisponibilidad es limitada (~45%) y alcanza aproximadamente a las 2 horas y media posteriores a la administración la concentración plasmática máxima que no supera los 2 µg/mL.(54,55) La metformina puede unirse a proteínas plasmáticas; sin embargo, este valor resulta insignificante. Además, el volumen de distribución de la metformina es de aproximadamente 65 L y su vida media de eliminación es de aproximadamente 5 horas en condiciones normales.(54,55) Este fármaco no se metaboliza y se excreta en la orina sin cambios, en gran parte por su naturaleza hidrofílica.(54,55) Con respecto a su farmacodinamia, a la metformina se le han asignado diversos efectos en el ser humano debido a su naturaleza pleiotrópica, incluyendo: mejoría en el control glucémico en la diabetes tipo 2, compensación de la resistencia a la insulina, disminución de la hiperinsulinemia en ayunas, estabilización del peso corporal, mejoría en los niveles de lípidos, en mujeres embarazadas con síndrome de

ovario poliquístico la metformina se ha asociado a una disminución del riesgo de aborto precoz, disminución de los niveles de proteína C reactiva, adipocitocinas inflamatorias y diversas citocinas inflamatorias, actividad antitrombótica y efecto reductor del infarto de miocardio, además de mostrar efecto protector contra ciertos cánceres en personas con diabetes tipo 2.(55,56)



**Fig.7** Estructura química de la metformina. Realizada en el software ACD/ChemSketch.

Los mecanismos de acción por los cuales la metformina ejerce sus efectos antihiperoglucemiantes siguen sin estar de todo claros, sobre todo porque se cree que tiene múltiples efectos moleculares que inciden directamente en los niveles de glucosa y otros factores metabólicos relacionados o no con la diabetes.(54) Se ha informado que la metformina necesita del transporte pasivo facilitado por diversos transportadores para su absorción, distribución y eliminación, como: OCT1, OCT2, OCT3, MATE1, MATE2, PMAT, OCTN1, THTR-2 y SERT. Posterior a la absorción, se conoce que tiene su efecto predominante al inhibir la producción de glucosa hepática por gluconeogénesis.(54,56) Esto, lo logra, bloqueando la vía de señalización del glucagón e inhibiendo algunas enzimas gluconeogénicas en las mitocondrias como la glicerolfosfato deshidrogenasa.(56) Además, la metformina tiene un efecto inhibitor específico sobre el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, esta inhibición aumenta los niveles de AMP y disminuye los de ATP, causando la activación de la AMPK, el cual es un sensor de energía celular y componente principal de la regulación metabólica.(56,58) La activación de la AMPK, permite, entre otras actividades, la redirección del metabolismo a vías catabólicas, incluyendo el transporte de glucosa, la glucólisis y la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, además de inhibir vías anabólicas, como la síntesis de proteínas y la gluconeogénesis.(56,57) Asociado a ello, se demostró que la

metformina aumenta el número y actividad de los receptores de insulina y por tanto, la captación y transporte de glucosa.(56) También, se cree que la metformina puede disminuir la captación intestinal de glucosa.(56) La evidencia indica que este fármaco tiene un efecto sobre la composición del microbioma intestinal, lo que sugiere una posible contribución a su efecto reductor de peso y al rescate de la disbiosis causada con la diabetes mellitus tipo 2.(56,57) Adicionalmente, la metformina puede aumentar, después de las comidas, los niveles del péptido similar al glucagón tipo 1 (así como de su receptor) el cual tiene funciones importantes como: aumentar la secreción de insulina e inhibir la secreción de glucagón.(54,56)

Además de ser indicada ampliamente para el tratamiento de la diabetes, la metformina ha sido objeto de investigación, debido a que los datos experimentales y clínicos revelan propiedades novedosas, que le confieren posibles efectos y aplicaciones terapéuticas adicionales sobre otras enfermedades diferentes a la diabetes.(55,59) Particularmente, para este trabajo, es de interés conocer que la metformina se le ha atribuido y demostrado actividad antiviral, por ejemplo; lo informado desde su desarrollo, cuando en 1950, a la metformina se le consideró como un potencial tratamiento de la influenza en un brote en Filipinas.(55) Aunque entonces no se realizó alguna investigación adicional, hoy en día hay evidencia que respalda el efecto antiviral que puede tener este fármaco. Diversos estudios se han realizado para conocer este efecto potencial, por ejemplo: se demostró que la metformina cuando se administraba con IFN- $\alpha$ 2b o lamivudina aumentaba el efecto inhibitorio sobre los niveles de expresión del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, así como su replicación, provocando un efecto antiviral mayor contra ese patógeno.(57) Posteriormente, un ensayo adicional realizado por los mismos autores indicó que la metformina, ayuda al efecto antiviral debido a que reprime los promotores y *enhancers* del genoma viral, causando la inhibición de la transcripción.(57) Por esto, se postuló a la metformina como un candidato como adyuvante en el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis B.(57) Por otro lado, otro estudio mostró en ensayos *in vitro* que la

metformina aumentaba los marcadores de muerte celular y administrado con simvastatina se inhibía el crecimiento celular y la infección por el virus de la hepatitis C sugiriendo que el tratamiento con estos dos fármacos puede tener un papel protector en el desarrollo de carcinoma hepatocelular causado por el virus de la hepatitis C.(57) Actualmente, se ha propuesto a la metformina como un posible tratamiento de apoyo para los pacientes con COVID-19, debido a que este fármaco ha demostrado reducir los niveles de citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$ , aumentar el pH endosómico e interferir con el proceso de endocitosis necesario para que la partícula viral de SARS-CoV2 ingrese a la célula, contribuyendo así a la inhibición de la replicación viral e infección.(57,58) También se ha identificado específicamente que la metformina por activación de la AMPK tiene un efecto antiviral, por ejemplo: en un estudio se demostró que la sobreexpresión de AMPK activa inhibió la expresión de proteínas líticas y la replicación del virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi, además, estos hallazgos fueron validados con el tratamiento de metformina (que activa AMPK) observando los mismos resultados antes descritos.(58) Otro estudio encontró que la inhibición de la actividad de AMPK está presente en la infección por el virus Cocksackie B3 y sugiere que el tratamiento con metformina puede inhibir la replicación viral.(58)

Conforme a esto, nuestro grupo de trabajo demostró en estudios *in vitro* e *in vivo* que la metformina tiene efecto antiviral contra el DENV, al activar la AMPK y regular la vía de síntesis de colesterol por la enzima HMGCR.(52,53) Además, un estudio retrospectivo realizado en adultos diabéticos con dengue en Singapur asoció a la metformina con un menor riesgo (33-40%) de desarrollar dengue grave de acuerdo a los criterios de clasificación de 2009 de la OMS.(60) Actualmente, se encuentra en curso un ensayo clínico en Vietnam para evaluar el efecto de la metformina en pacientes con sobrepeso y obesidad que tienen dengue.(49)

### II.III.II Análogos de metformina y fenformina

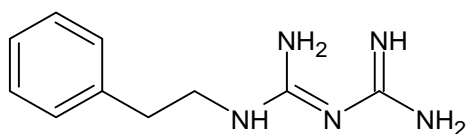
La metformina ha demostrado ser un potencial candidato para el tratamiento de dengue debido a que es un fármaco ampliamente utilizado con resultados y beneficios clínicamente probados. Sin embargo, no está exento de poseer limitaciones, por ejemplo: si bien, no es tan común, la metformina puede causar acidosis láctica en pacientes con enfermedad renal crónica, enfermedad hepática crónica, insuficiencia hepática aguda e insuficiencia cardíaca aguda.(54) Además, este fármaco se absorbe incompletamente debido a sus características hidrofílicas, afectando su biodisponibilidad, posología y sus efectos variables entre individuos.(54)

Por lo tanto, existe la oportunidad de desarrollar enfoques novedosos para mejorar las propiedades fisicoquímicas (lipofilidad), farmacocinéticas (absorción y biodisponibilidad), farmacodinámicas (efecto terapéutico) y toxicológicas (seguridad) de la metformina.(54) Una de estas estrategias es el desarrollo de *me too drugs*, los cuales son compuestos farmacológicamente activos que están relacionados estructuralmente con un compuesto de referencia, perteneciente a la misma clase terapéutica y utilizado para los mismos fines terapéuticos. Sin embargo, pueden diferir en algunos aspectos, como la especificidad de la acción farmacológica, el perfil de reacciones adversas, las interacciones fármaco-fármaco, etc. Para la producción de estos compuestos son necesarias pequeñas modificaciones químicas en la estructura del fármaco original. Las ventajas de los fármacos *me too* pueden incluir: mayor especificidad del objetivo, menores riesgos de reacciones adversas e interacciones fármaco-fármaco fuera del objetivo, disponibilidad en escasez de medicamentos, mayor posibilidad de beneficio en algunos pacientes con diversas morbilidades o pacientes embarazadas, mejor administración del fármaco, y desarrollo de formulaciones novedosas.

En el laboratorio de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos han desarrollado y caracterizado con la estrategia de *me too drugs* diversos análogos de metformina y

fenformina que tienen como objetivo principal mejorar la lipofilidad de la molécula de metformina e impactar directamente en sus características farmacocinéticas, farmacodinámicas y toxicológicas.(61,62) Para el diseño y síntesis de estos análogos fue importante considerar como fármacos base, tanto a la metformina como a la fenformina.

La fenformina también es un derivado de biguanida, pero que ofrece características diferentes, como: baja polaridad, mayor lipofilidad, mejor absorción y biodisponibilidad, en comparación a la metformina. En su estructura se puede resaltar la presencia de un grupo bencilo que es el causante de la menor polaridad y que se encuentra unido al esqueleto de biguanida, como se puede observar en la figura 8. Además, este último ha demostrado mayor actividad biológica que la metformina debido a que es un inhibidor más potente del complejo I mitocondrial.(63) No obstante, la fenformina fue retirada del mercado a finales de la década de 1970 debido a su mayor riesgo de causar acidosis láctica.(64) Considerando las propiedades de la metformina y la fenformina antes mencionadas, los análogos intentan rescatar las ventajas de cada uno de ellos, con el propósito de obtener compuestos con gran potencial terapéutico y con diversas características que permitan su empleo seguro.



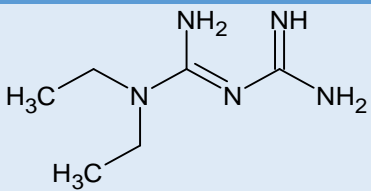
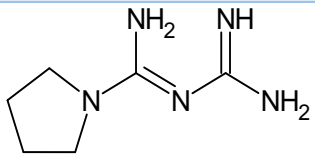
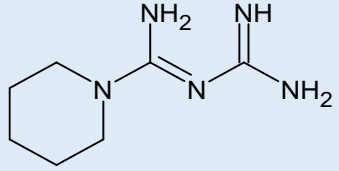
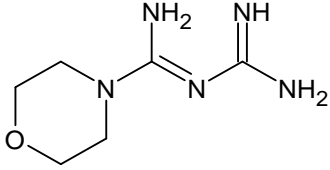
**Fig.8** Estructura química de la fenformina. Realizada en el software ACD/ChemSketch.

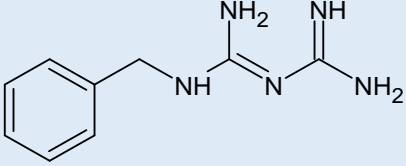
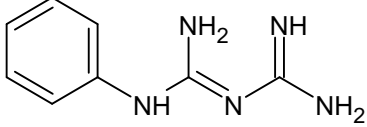
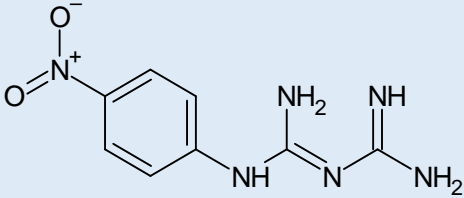
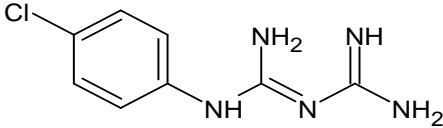
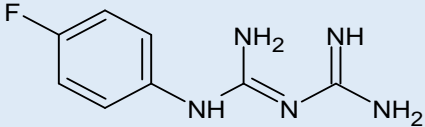
La producción de los diversos análogos de metformina y fenformina se alcanzó mediante estrategias como: cierre de cadena en los sustituyentes de la estructura de biguanida de la metformina, reemplazo bioisostérico donde se realizan sustituciones de átomos que presentan una distribución electrónica y disposición espacial similar al original, estrategias de homologación inferior o superior en la fenformina y metformina, respectivamente, con el objetivo de eliminar o adicionar grupos funcionales de tipo alquilo a las moléculas

originales. También se realizaron diversas sustituciones con diferentes átomos en los anillos aromáticos de benceno.

En la tabla 1 se muestran los análogos de primera generación de metformina y fenformina que fueron desarrollados y amablemente obsequiados por el Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez del laboratorio de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Los compuestos EGL 1-4 fueron diseñados considerando principalmente la molécula de metformina, donde se produjeron sustituyentes de mayor volumen y carácter lipofílico. Los compuestos 6-10, sobre todo, surgieron de un análisis de la molécula de fenformina donde el grupo bencílico da lugar a moléculas con mayores propiedades lipofílicas y la eliminación de un carbono próximo a la estructura de biguanida disminuye la toxicidad.

### Generación 1

| Análogo de metformina | Estructura química                                                                   |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>EGL-1</b>          |  |
| <b>EGL-2</b>          |  |
| <b>EGL-3</b>          |  |
| <b>EGL-4</b>          |  |

|               |                                                                                     |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>EGL-6</b>  |   |
| <b>EGL-7</b>  |   |
| <b>EGL-8</b>  |   |
| <b>EGL-9</b>  |   |
| <b>EGL-10</b> |  |

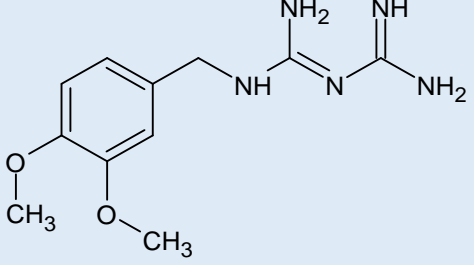
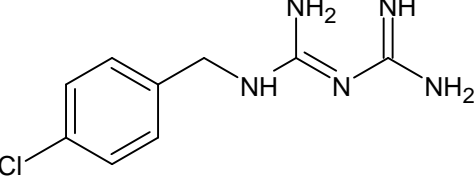
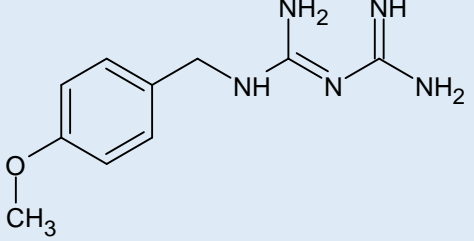
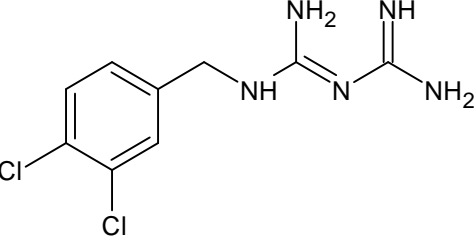
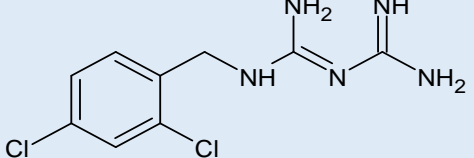
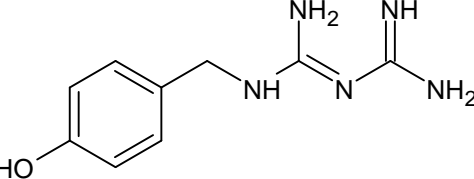
**Tabla 1.** Análogos de metformina y fenformina de 1<sup>a</sup> generación y sus estructuras químicas realizadas en el software ACD/ChemSketch.

Posteriormente, con las mismas estrategias químicas se obtuvo una segunda generación de análogos de metformina y fenformina empleando como referencia o cabeza de serie al compuesto EGL-6, el cual, en ensayos *in vitro* realizados por el grupo de trabajo del Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez, mostró la mejor activación de la enzima AMPK, con respecto a los demás compuestos y, que curiosamente, fue mayor a la activación de AMPK *in vitro* de la metformina.

La tabla 2 muestra los análogos de segunda generación de metformina y fenformina. En estas nuevas estructuras, fueron agregados grupos funcionales en el anillo bencílico con el propósito de mejorar su perfil metabólico, toxicológico y lipofílico.



## Generación 2

| Análogo de metformina | Estructura química                                                                   |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| MCC-1                 |    |
| MCC-2                 |    |
| MCC-3                 |   |
| MCC-4                 |  |
| MCC-5                 |  |
| MCC-6                 |  |

**Tabla 2.** Análogos de metformina y fenformina de 2<sup>a</sup> generación y sus estructuras químicas realizadas en el software ACD/ChemSketch.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

El dengue es una enfermedad causada por cualquiera de los cuatro serotipos del DENV, que, en un sector de la población, puede evolucionar hasta formas clínicas graves, siendo un importante problema de salud a nivel mundial. Sin embargo, en la actualidad no existe tratamiento farmacológico específico, seguro y eficaz que pueda ser empleado. Debido a esto, es necesaria la búsqueda, identificación y desarrollo de nuevos compuestos con actividad antiviral en la infección por DENV. Nuestro grupo de trabajo describió el efecto anti-DENV de la metformina en modelos *in vitro* e *in vivo*, y actualmente, este fármaco está siendo evaluado en un estudio clínico realizado por la Unidad de Investigación Clínica de la Universidad de Oxford y el Hospital de Enfermedades Tropicales de Vietnam como un prometedor tratamiento para el dengue. No obstante, la actividad terapéutica de la metformina puede estar limitada por su farmacocinética, dada su baja absorción y biodisponibilidad, así como su eliminación renal rápida. Una estrategia utilizada para mejorar las propiedades de la metformina es el desarrollo de análogos químicos de este fármaco. En este sentido, se tiene conocimiento del desarrollo de nuevos análogos de metformina y fenformina, que poseen propiedades antihiper glucémicas semejantes a la metformina, sugiriendo que estos compuestos pueden tener actividad antiviral sobre el DENV. Por lo tanto, es importante que los análogos de metformina y fenformina sean evaluados por su posible efecto antiviral en la infección por DENV.

### **IV. HIPÓTESIS**

Debido a su similitud estructural y funcional con la metformina, los análogos de metformina y fenformina poseen actividad antiviral en la infección por DENV-2 en células Huh-7.

## **V. OBJETIVO GENERAL**

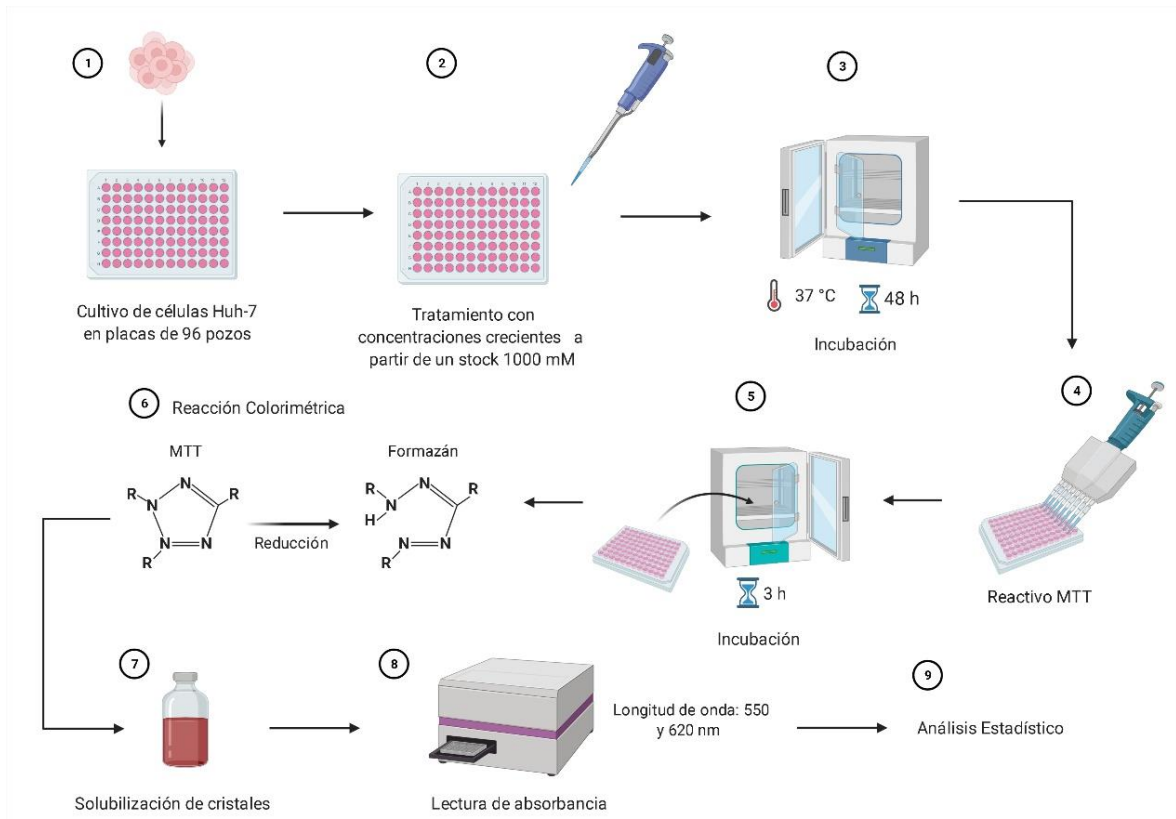
1. Estudiar el efecto de los análogos de metformina y fenformina durante la infección por DENV-2 en células Huh-7 .

## **VI. OBJETIVOS PARTICULARES**

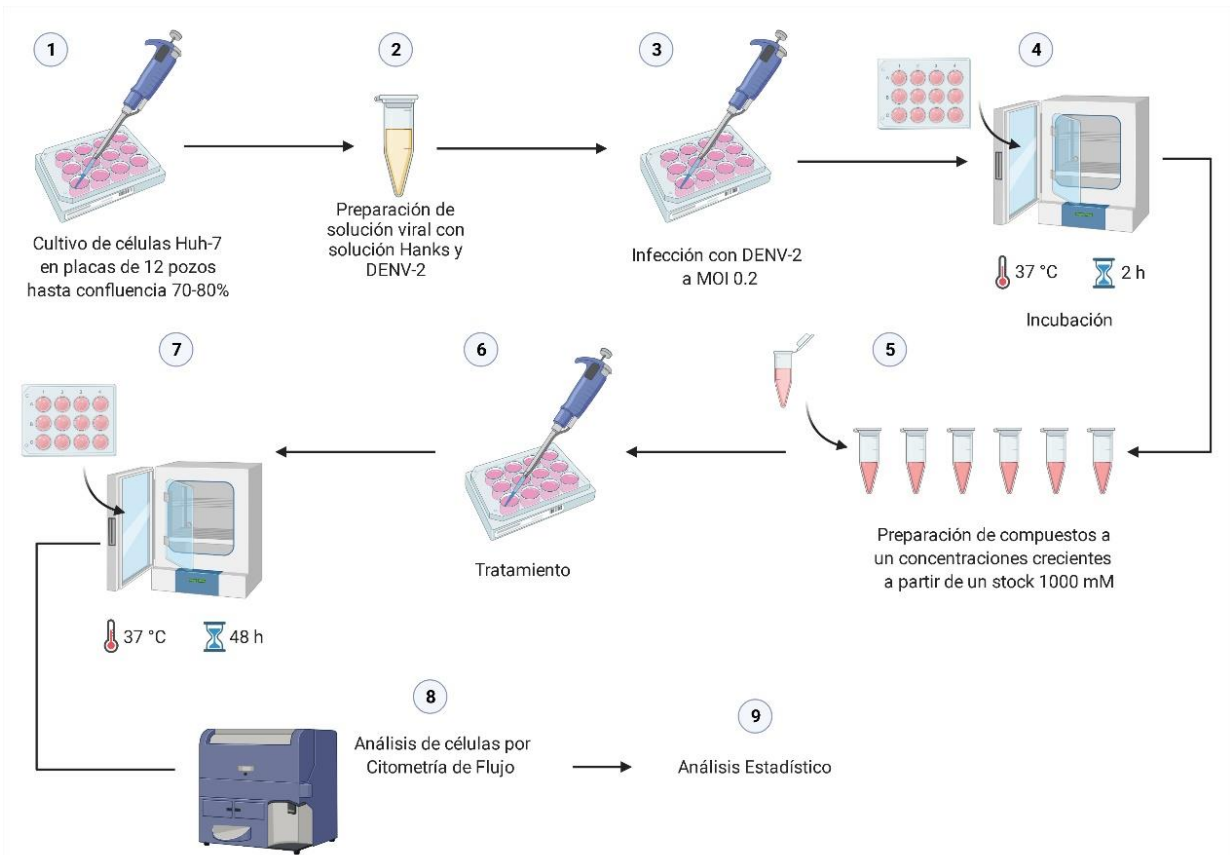
1. Determinar el potencial citotóxico de los diferentes análogos de metformina y fenformina en células Huh-7.
2. Evaluar el efecto antiviral de los análogos de metformina y fenformina en células Huh-7 infectadas con DENV-2.
3. Comparar el efecto antiviral entre la metformina y sus análogos en células Huh-7 infectadas con DENV-2.

## VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

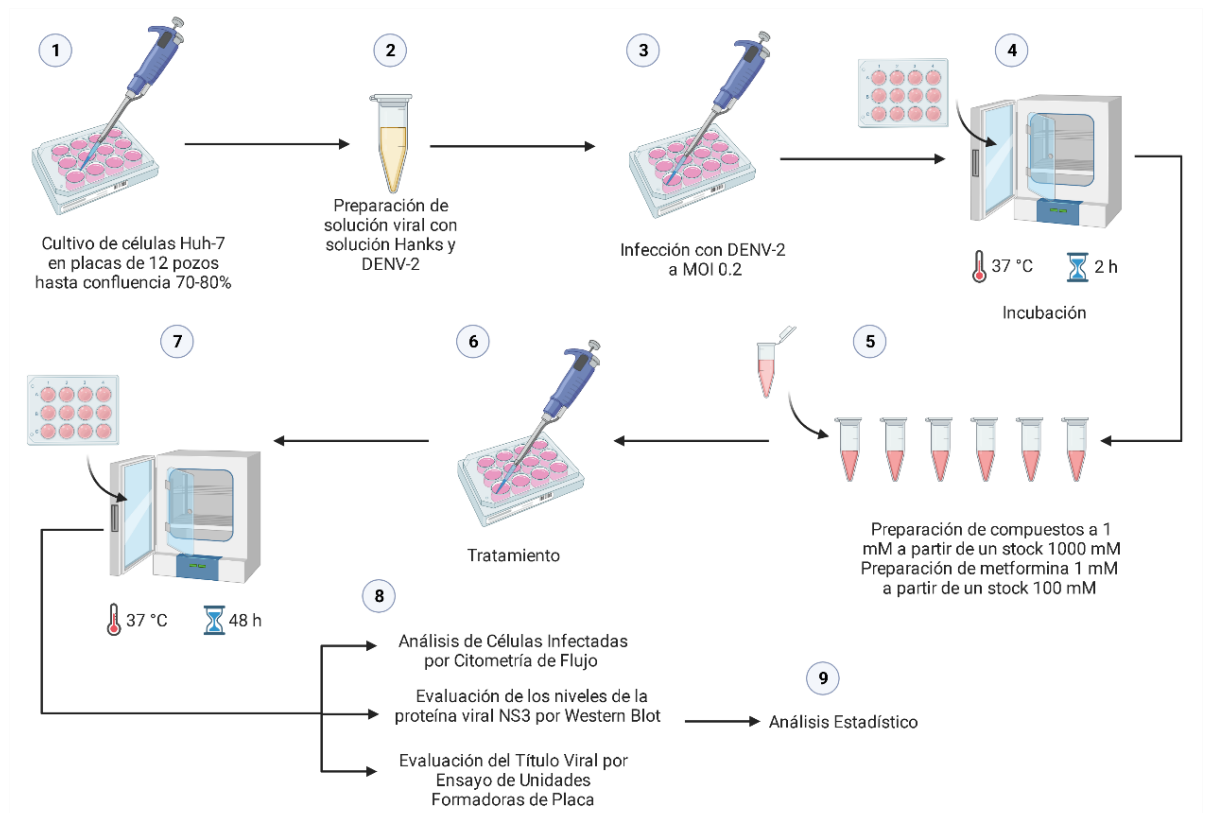
### Objetivo 1. Determinar el potencial citotóxico de los diferentes análogos de metformina y fenformina en células Huh-7



## Objetivo 2. Evaluar el efecto antiviral de los análogos de metformina y fenformina en células Huh-7 infectadas con DENV-2



### Objetivo 3. Comparar el efecto antiviral entre los análogos y la metformina en células Huh-7 infectadas con DENV-2



## **VIII. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **VIII.I Línea Celular Huh-7**

Los ensayos de este trabajo se realizaron en una línea celular de hepatocarcinoma humano (Huh-7), la cual fue amablemente donada por la Dra. Ana María Guadalupe Rivas Estilla de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Las células fueron cultivadas en placas con medio DMEM advanced Gibco™ suplementado con SFB al 7% Gibco™, glutamina 2 mM Gibco™, penicilina (5x10<sup>4</sup> U/mL), estreptomina (50 µg/mL) Sigma-Aldrich® y 1 mL/L de anfotericina B Gibco™ a 37°C a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **VIII.II Virus del dengue**

Para la infección de las células fue utilizado el DENV-2 de la cepa Nueva Guinea, el cual, fue propagado en cerebros de ratones lactantes de la cepa CD1 con 2 a 3 días de nacidos y que fueron proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV. A los 4 a 5 días después de la inoculación, los ratones fueron sacrificados, y los cerebros fueron diseccionados y tratados para la obtención de los virus. Los títulos virales fueron determinados mediante ensayo de unidades formadoras de placa (UFP) en células BHK-21. Como controles fueron empleados cerebros de ratones lactantes CD1 no infectados.

### **VIII.III Compuestos Químicos y Fármacos**

Los análogos de metformina descritos en la tabla 1 y 2 fueron gentilmente obsequiados por el Dr. Juan Gabriel Navarrete Vazquez del Laboratorio de Química Farmacéutica de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. El clorhidrato de metformina con número de catálogo ab120847 fue adquirido de Abcam. Para su uso en los ensayos, los análogos de metformina fueron disueltos en DMSO para preparar una solución stock a 1000 mM, mientras que

la metformina fue disuelta en agua destilada para preparar una solución stock a 100 mM.

#### **VIII.IV Infección con DENV-2 y Tratamiento**

Las células Huh-7 fueron sembradas en multiplacas hasta alcanzar una confluencia del 70-80% (de 24 a 36 h) y fueron infectadas con DENV-2 a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.2 en solución Hanks durante 2h a 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. A continuación, el medio fue retirado y las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los análogos de metformina y fenformina durante 48h a 37 ° C con 5% CO<sub>2</sub>. Para la preparación de las diferentes concentraciones, una alícuota de cada stock fue diluida en medio DMEM advanced suplementado.

#### **VIII.V Ensayo MTT**

En placas de 96 pozos fueron cultivadas células Huh-7 hasta una confluencia del 70-80%, donde fue realizado el ensayo de MTT para determinar la viabilidad celular cuando la monocapa celular era tratada con diversas concentraciones crecientes de análogos de metformina y fenformina. Para ello, después de los tratamientos, fue retirado el medio de las células y se agregaron 100 uL de solución MTT al 0.5% a cada uno de los pozos. Las placas se incubaron durante 3 horas a 37 °C. A continuación, el medio con MTT fue retirado y los cristales producidos en cada pozo fueron disueltos con 100 uL de DMSO. Después, las células fueron incubadas a temperatura ambiente y protegidas de la luz durante 1 hora. Por último, la lectura de las placas de 96 pozos fue realizada en un lector de microplacas ELISA a una longitud de onda de 560 nm. Para eliminar el fondo, se realizó la lectura de las placas a una longitud de onda de 630 nm. En el análisis de los datos, se restaron las absorbancias obtenidas a 630 nm a las absorbancias dadas a 560 nm. La viabilidad celular fue determinada normalizando los valores obtenidos con las células tratadas con los diferentes análogos frente a los de las células no



tratadas. El límite mínimo de viabilidad para ser considerado como no citotóxico se fijó en el 80 %.

#### **VIII.VI Citometría de Flujo**

Las células infectadas y tratadas fueron analizadas mediante citometría de flujo para determinar el porcentaje de infección. Para este ensayo, las células fueron cultivadas en placas de 12 pozos. En primer lugar, la monocapa celular fue tratada con solución de tripsina para la recolección de las células., las cuales se centrifugaron a 800 RPM durante 8 minutos y se decantó el sobrenadante. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS 1X y centrifugadas a 800 RPM durante 8 minutos. Después, fueron fijadas con formaldehído 4% e incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos en agitación. A continuación, fueron lavadas con PBS 1X y centrifugadas a 2,200 RPM por 8 minutos. Al término de este tiempo, fueron permeabilizadas con saponina 0.2% durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Las células fueron marcadas con el anticuerpo primario anti-prM de ratón (2H2) a una dilución 1:50 e incubadas durante la noche a 4°C en agitación. Enseguida, fueron lavadas con PBS 1X y centrifugadas a 2,200 RPM durante 8 minutos. Luego, fue utilizado el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa 488 a una dilución 1:1000 durante 2 horas en agitación, protegido de la luz y a temperatura ambiente. Fueron lavadas de la misma forma con PBS 1X y se centrifugaron a 2200 RPM durante 8 minutos. Por último, las células fueron analizadas por citometría de flujo en el equipo BD LSRFortessa™. Los datos obtenidos fueron analizados en el programa FlowJo versión 10.8.1.

#### **VIII.VII Western Blot**

El ensayo de Western Blot fue realizado para evaluar los niveles de expresión de la proteína NS3 en células Huh-7 infectadas y tratadas con los diferentes análogos de metformina y fenformina. A partir de placas de 12 pozos cultivadas,

infectadas y tratadas, la monocapa celular fue lavada con PBS 1X frío. Las células se lisaron con 50 uL de buffer de lisis RIPA que contenía inhibidor de proteasas. Posteriormente, el lisado celular fue centrifugado durante 15 minutos a 14000 x g y el sobrenadante fue rescatado. A continuación, se realizó la cuantificación de proteína total por el método de BCA con el *kit Pierce BCA protein assay* (Life technologies). Después, fue realizada la electroforesis en gel de poliacrilamida con 10% SDS (SDS-PAGE), por lo que, se cargaron 18 ug de cada lisado celular. Las proteínas separadas en el gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa para su marcaje. La membrana fue bloqueada con leche al 5%, el inmunomarcaje fue realizado con el anticuerpo monoclonal de conejo dirigido contra la proteína NS3 a una dilución 1:5000 y fueron incubadas durante la noche a 4°C en agitación. Después, fue lavada la membrana 3 veces durante 5 minutos con PBS 1X/Tritón 0.01%, fue empleado el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con la enzima HRP y la membrana fue incubada durante 1 hora a 4°C en agitación. Por último, la membrana fue lavada 6 veces con la misma solución de PBS 1X/Tritón 0.01% durante 5 minutos y la reacción fue revelada por quimioluminiscencia utilizando el *kit Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Pierce). Como control de carga fue utilizada la proteína GAPDH. El análisis densitométrico para determinar la intensidad relativa de las bandas correspondientes a la proteína NS3 fue estimada con el software ImageJ y los datos fueron normalizados respecto al control de carga.

### **VIII.VIII Unidades Formadoras de Placa (UFP)**

El ensayo de unidades formadoras de placa fue realizado para determinar el título viral cuando las células infectadas fueron tratadas con los diversos análogos de metformina y fenformina, con respecto a las células falsamente infectadas (MOCK). Para ello, fueron empleadas placas de 24 pozos cultivadas con células BHK21 a una confluencia del 100% a las 24 h después de su siembra. Por otro lado, fueron preparadas diluciones seriadas con los sobrenadantes

recolectados previamente de placas de 12 pozos con células Huh-7, que fueron infectadas y tratadas con diversas concentraciones de análogos de metformina y fenformina. Para realizar el ensayo, fue retirado el medio de cultivo de las células BHK21 y fueron agregados 200 uL de cada dilución problema a cada pozo. Las células fueron incubadas durante 2 horas a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub>. Después, fue agregado 1 mL de medio de soporte (medio MEM 2X con 0.8% de carboximetilcelulosa) a cada pozo y fueron incubadas durante 5 días a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub>. Cumplido el tiempo, fueron decantados los sobrenadantes de cada pozo, fueron agregados 500 uL de solución Naftol Blue-Black y fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego, las células fueron lavadas 3 veces con agua y las placas fueron contadas visualmente con una fuente de luz blanca. El número de placas fue ajustado por dilución y el título viral fue expresado como unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL).

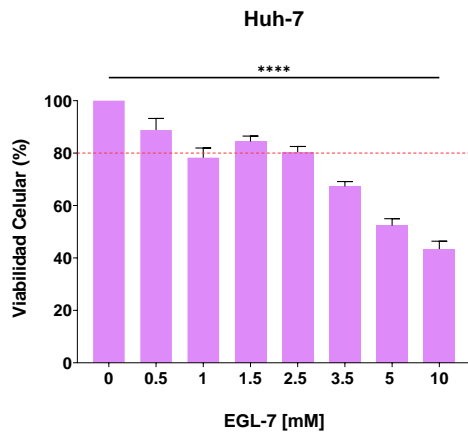
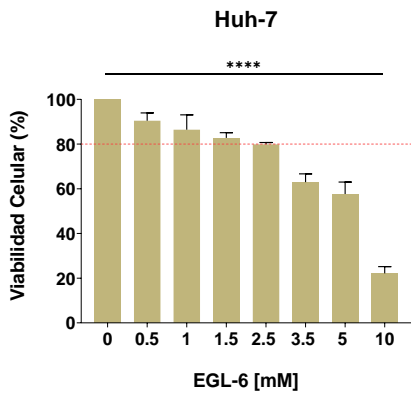
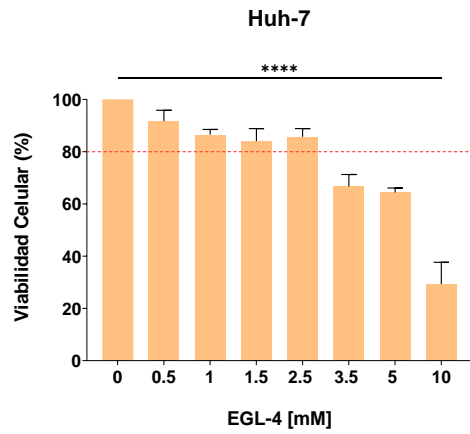
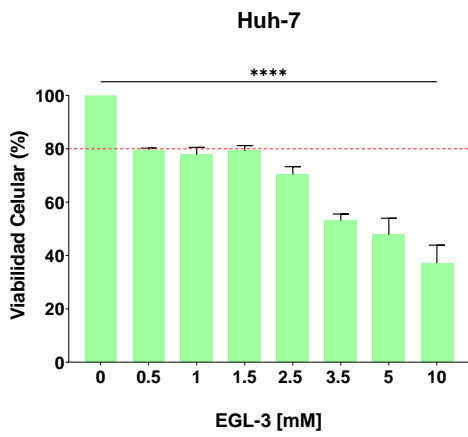
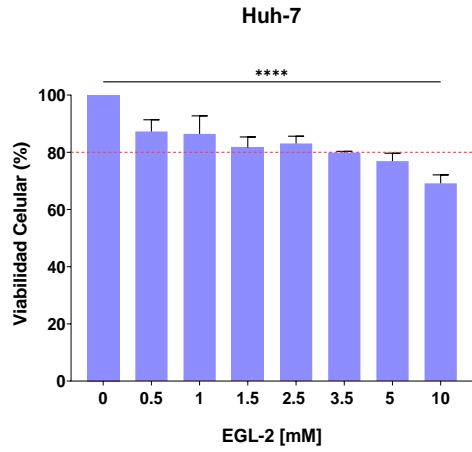
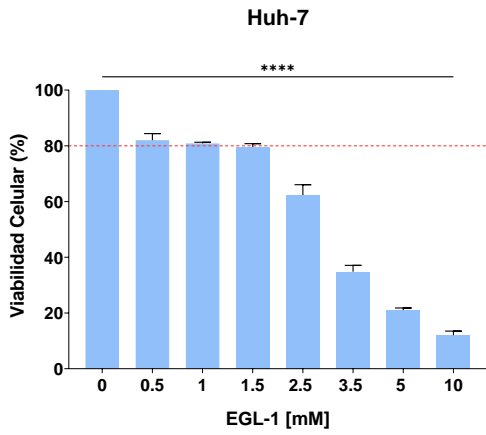
#### **VIII.IX Análisis Estadístico**

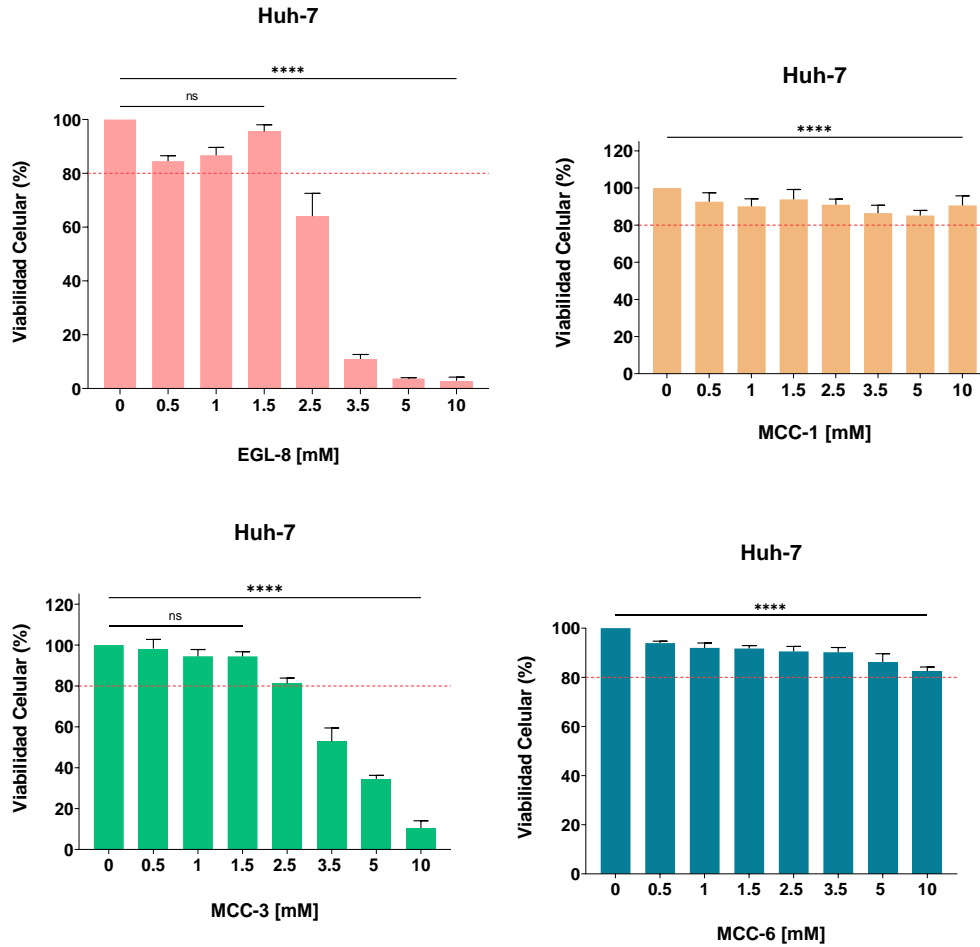
El análisis estadístico fue realizado con el software GraphPad Prism versión 9. Los datos fueron expresados con el valor de la media y desviación estándar. Para determinar diferencias entre los distintos tratamientos y controles utilizados en los ensayos de citometría de flujo y en los ensayos de unidades formadoras de focos fue realizado análisis de varianza (ANOVA) unidireccional seguida de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples. Para determinar la CC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub>, los datos del ensayo de MTT y citometría de flujo, respectivamente, fueron analizados por regresión no lineal de una curva concentración-respuesta de cuatro parámetros. Asimismo, en los ensayos de comparación de los análogos de metformina y fenformina con respecto a la metformina fue empleado análisis de varianza (ANOVA) unidireccional seguida de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

## IX. RESULTADOS

### IX.I Potencial Citotóxico de los análogos de metformina y fenformina

Para determinar la toxicidad de los análogos de metformina y fenformina (EGL-1, EGL-2, EGL-3, EGL-4, EGL-6, EGL-7, EGL-8, EGL-9, EGL-10, MCC-1, MCC-2, MCC-3, MCC-4, MCC-5 y MCC-6) sobre las células, se utilizaron concentraciones crecientes de 0.5, 1, 1.5, 2.5, 3.5, 5 y 10 mM de cada compuesto durante 48 h. Después de los tratamientos, las células fueron analizadas por el ensayo de MTT para determinar la viabilidad celular. El análogo EGL-1 mostró actividad citotóxica dependiente de la concentración empleada sobre las células Huh-7, causando la reducción de la viabilidad celular al 80% desde 1 mM hasta 1.5 mM. En tanto que, el análogo EGL-2 causó la reducción de la viabilidad celular al 80% a 3.5 mM. El análogo EGL-3 causó la reducción de la viabilidad celular al 80% desde 0.5 mM hasta 1.5 mM. Mientras que, el análogo EGL-4, EGL-6, EGL-7, MCC-3 provocó la reducción mayor al 80% con una concentración de 3.5 Mm y el análogo EGL-8 a una concentración de 2.5 mM. Por otro lado, los compuestos MCC-1 y MCC-6 mostraron un comportamiento con menor toxicidad logrando conservar más del 80% de viabilidad celular a concentraciones de hasta 10 mM, como se muestra en la **fig.9**. Finalmente, los compuestos: EGL-9, EGL-10, MCC-2, MCC-4 y MCC-5 causaron el desprendimiento y disrupción total de la monocapa celular a la concentración de 1 mM y por lo tanto, esto fue utilizado como criterio de exclusión para estos compuestos (datos no mostrados).

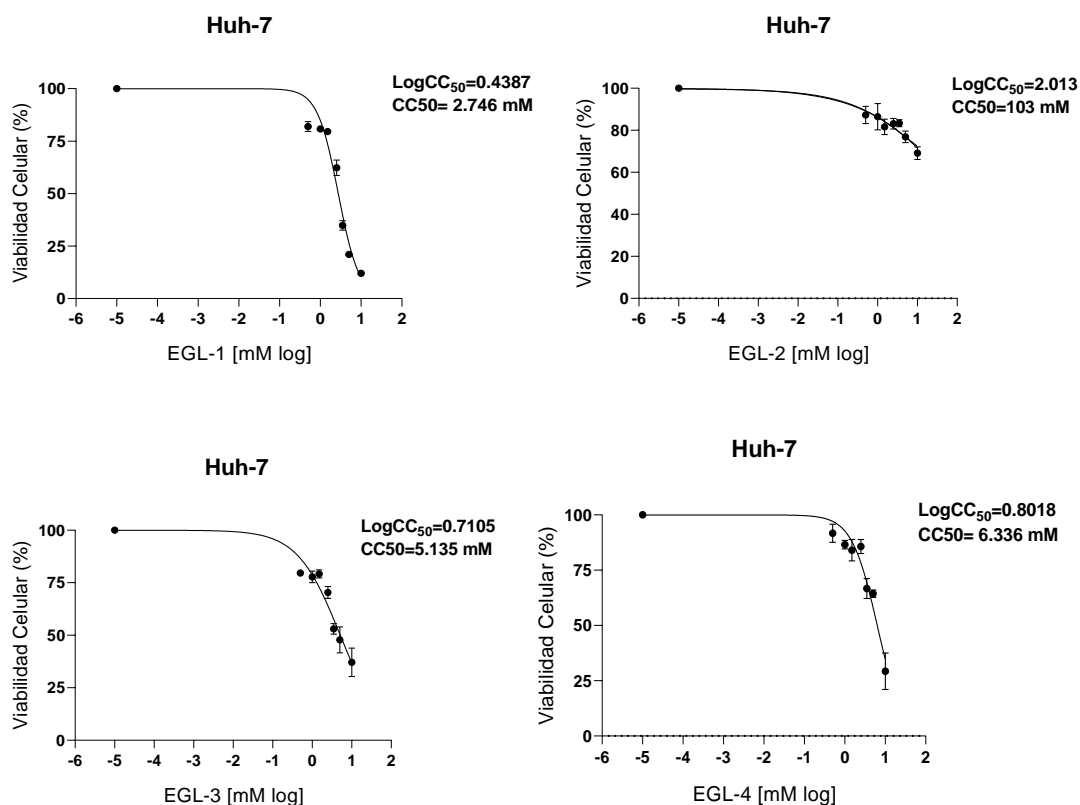


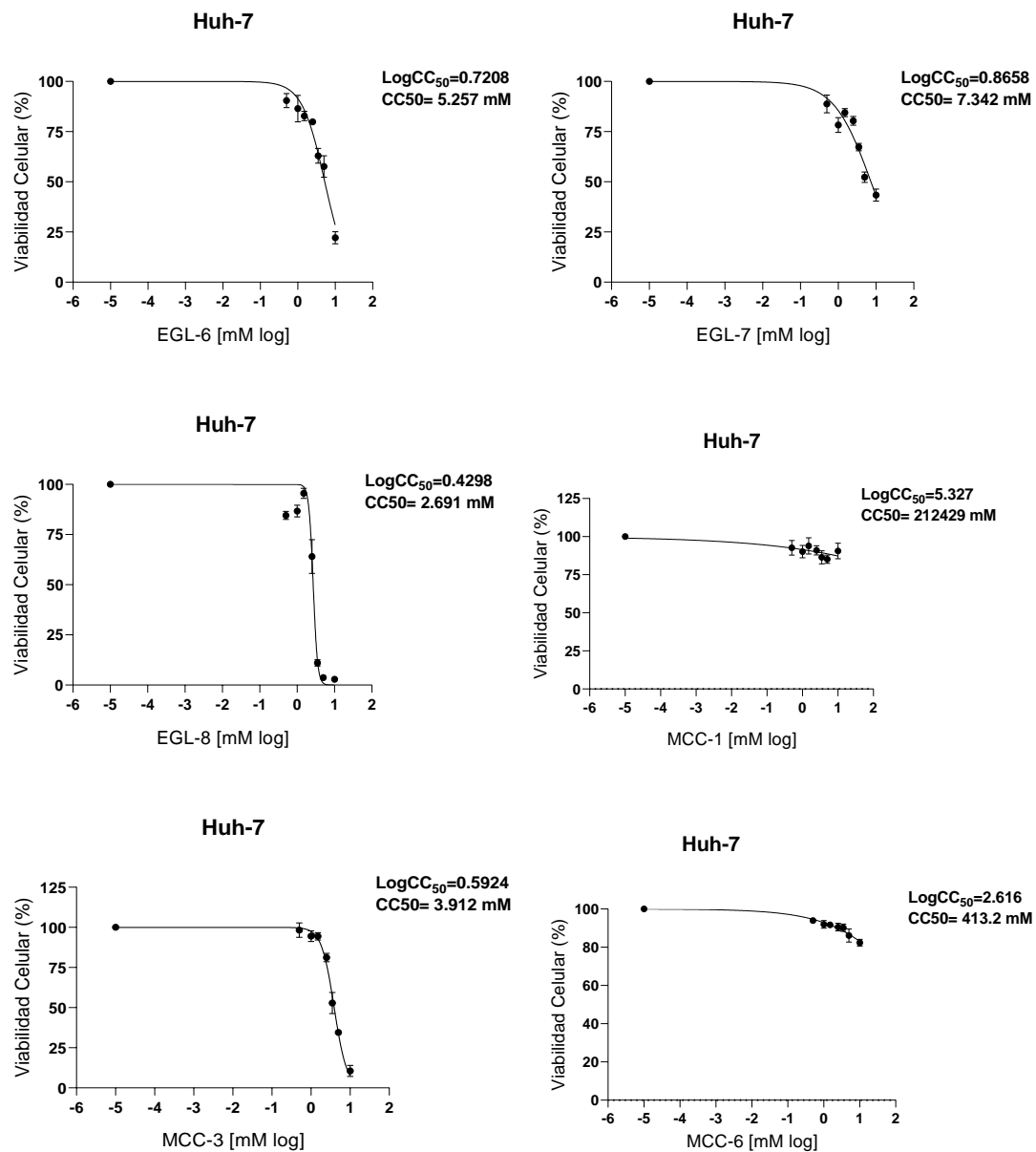


**Fig. 9** Viabilidad de las células Huh-7 a los análogos de metformina y fenformina. Las células Huh-7 fueron tratadas con concentraciones crecientes (0.5, 1, 1.5, 2.5, 3.5, 5 y 10 mM) de los análogos de metformina y fenformina (EGL-1, EGL-2, EGL-3, EGL-4, EGL-6, EGL-7, EGL-8, MCC-1, MCC-3 y MCC-6) durante 48 h. La viabilidad celular se determinó mediante ensayo de MTT. La viabilidad celular relativa de las células tratadas con los análogos de metformina y fenformina se normalizó frente al control de células no tratadas y el límite mínimo de viabilidad celular para ser considerado como no citotóxico se fijó en 80% (línea horizontal roja punteada). Los resultados se presentan en porcentajes considerando al control de células sin tratar como el 100%. Las gráficas representan las medias +/- SD de n= 3 experimentos realizados por duplicado. La significancia estadística se estableció en un valor de probabilidad menor del 5% (\*\*\*\*p<0.05).

## IX.II Concentración Citológica 50% (CC<sub>50</sub>)

Después de determinar la viabilidad celular en las células Huh-7, se estimó la concentración citotóxica que produce la muerte del 50% de las células cuando eran tratadas a concentraciones crecientes con los análogos de metformina y fenformina. Este parámetro fue establecido mediante regresión no lineal de una curva concentración-respuesta de cuatro parámetros. Para el compuesto EGL-1 la CC<sub>50</sub> fue de 2.746 mM (95% CI= 2.557 a 2.946), EGL-2= 103 mM (95% CI= 52.17 a 300.8), EGL-3= 5.135 mM (95% CI= 4.569 a 5.870), EGL-4= 6.336 mM (95% CI= 5.767 a 7.054), EGL-6= 5.257 mM (95% CI= 4.873 a 5.704), EGL-7= 7.342 mM (95% CI= 6.476 a 8.538), EGL-8= 2.691 mM (95% CI= 2.598 a 2.789), MCC-1= 212,429 mM (95% CI=1667 a 63,643,216,803), MCC-3= 3.912 mM (95% CI= 3.777 a 4.056) y MCC-6= 413.2 mM (95% CI=196.1 a 1190), como se muestra en la **fig.10**.





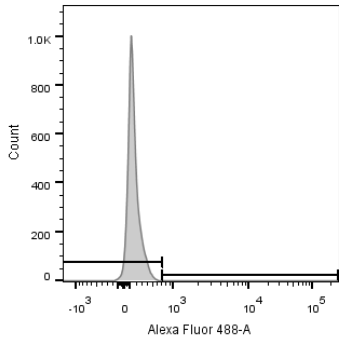
**Fig. 10** Concentración Citotóxica 50 de los análogos de metformina y fenformina. Las células Huh-7 fueron infectadas a una MOI de 0.2 y tratadas con concentraciones crecientes (0.5, 1, 1.5, 2.5, 3.5, 5 y 10 mM) de los análogos de metformina y fenformina (EGL-1, EGL-2, EGL-3, EGL-4, EGL-6, EGL-7, EGL-8, MCC-1, MCC-3 y MCC-6) durante 48 h. Con los porcentajes de viabilidad celular se determinó la concentración citotóxica 50, mediante regresión no lineal de una curva concentración-respuesta de cuatro parámetros. Las gráficas representan las medias  $\pm$  SD de  $n=3$  experimentos realizados por duplicado.



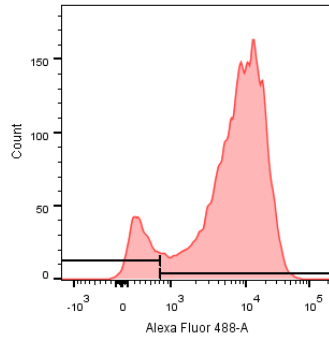
### **IX.III Efecto antiviral de los análogos de metformina y fenformina**

Las células Huh-7 se usaron para determinar el efecto de los 10 diversos análogos de metformina y fenformina en la infección por DENV-2. Para ello, se seleccionó una concentración de 1 mM de cada uno de los compuestos para tratar durante 48 horas las células infectadas. Al término de los tratamientos las células fueron recuperadas para determinar el porcentaje de células infectadas mediante análisis de citometría de flujo. Con este primer ensayo, se determinó, que los tratamientos con los compuestos: EGL-1, EGL-2, EGL-3, EGL-4, EGL-6, EGL-7, EGL-8, MCC-1, MCC-3 y MCC-6 disminuyeron el porcentaje de células infectadas (30.58%, 70.87%, 74.3%, 64.76%, 74.97%, 64.53%, 78.71%, 77.49%, 68.01%, 81.59%; respectivamente), mostrando diferencia estadísticamente significativa con respecto al control de infección sin tratamiento (**Fig.11**).

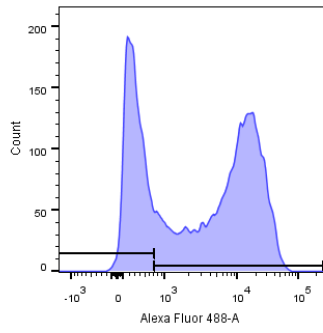
**A)**



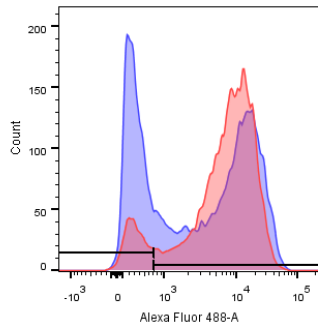
**MOCK**



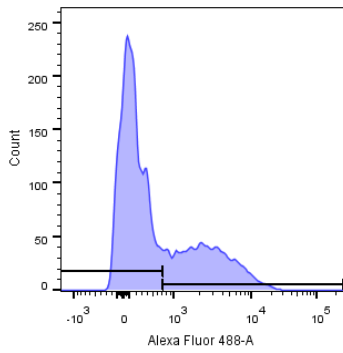
**CI**



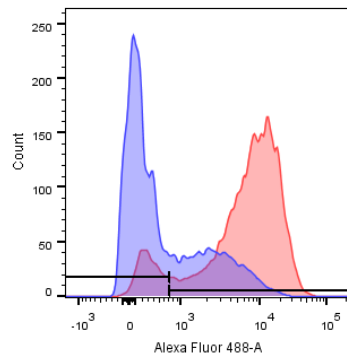
**MET**



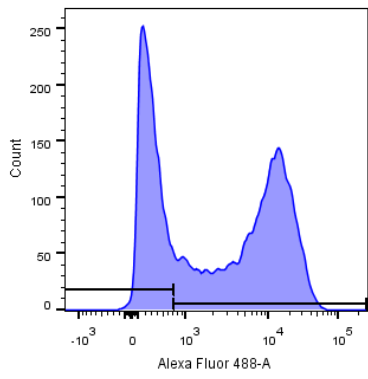
**MET/CI**



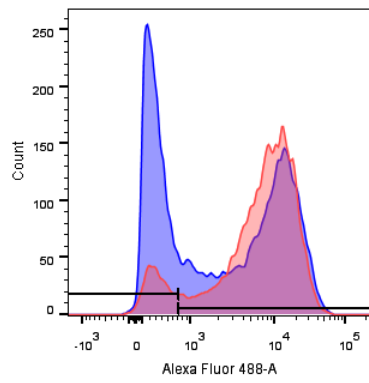
**EGL-1**



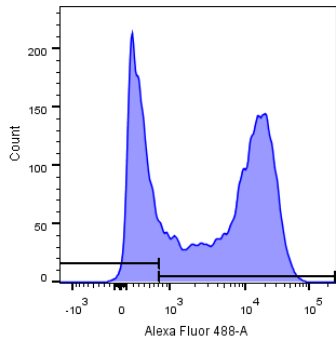
**EGL-1/CI**



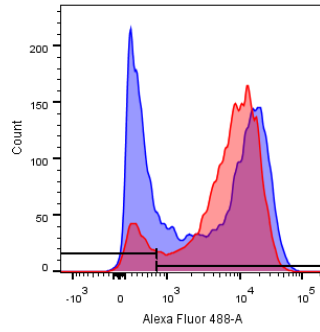
**EGL-2**



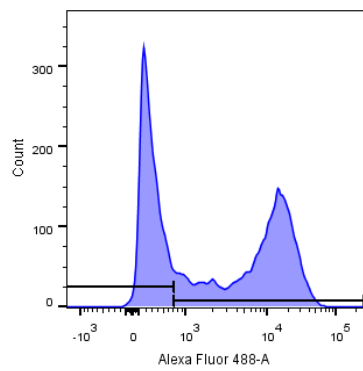
**EGL-2/CI**



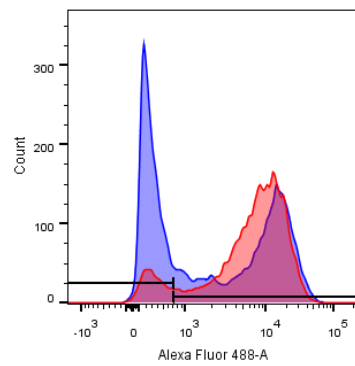
**EGL-3**



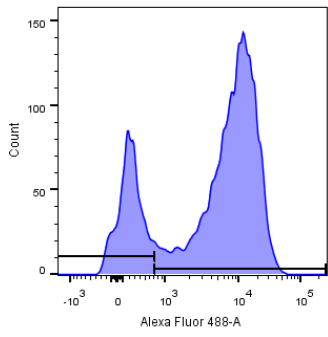
**EGL-3/CI**



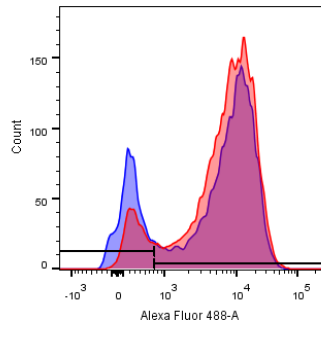
**EGL-4**



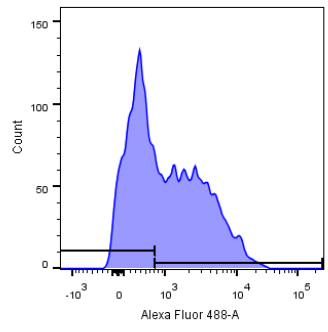
**EGL-4/CI**



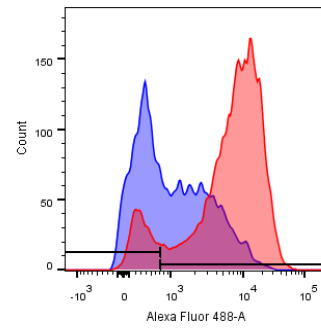
**EGL-6**



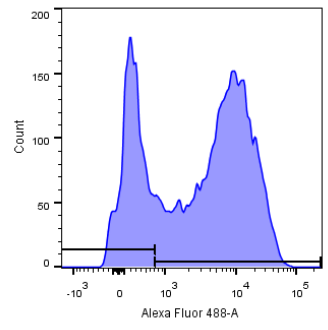
**EGL-6/CI**



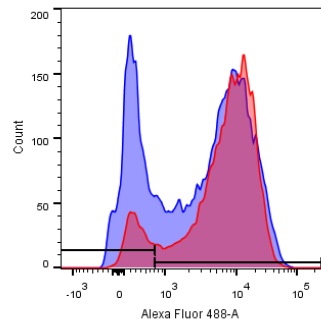
**EGL-7**



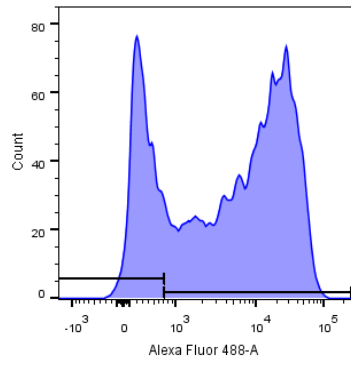
**EGL-7/CI**



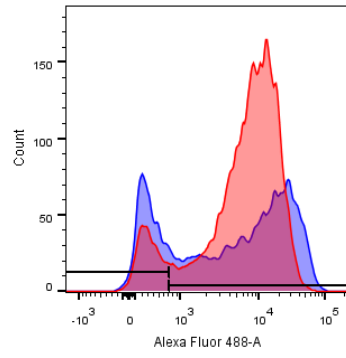
**EGL-8**



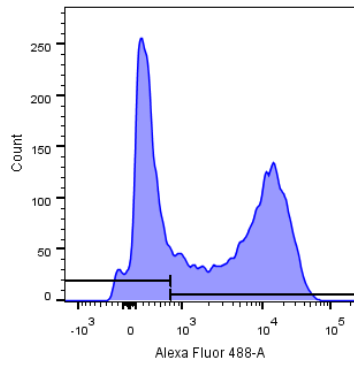
**EGL-8/CI**



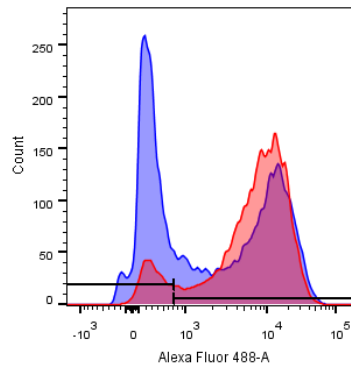
**MCC-1**



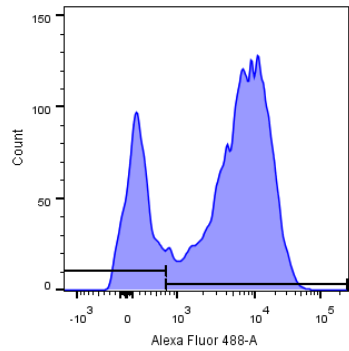
**MCC-1/CI**



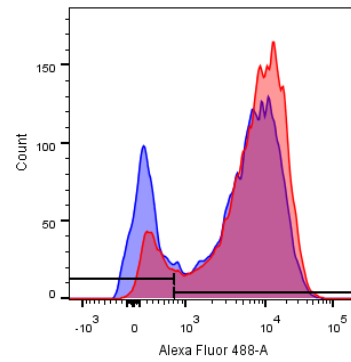
**MCC-3**



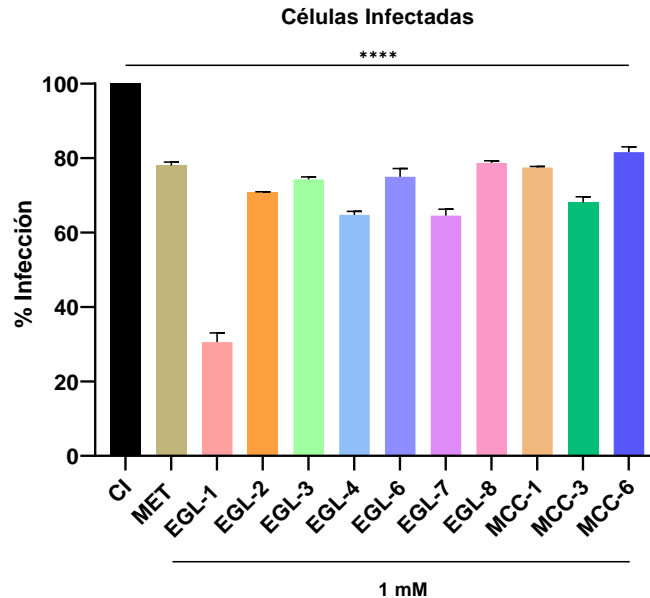
**MCC-3/CI**



**MCC-6**



**MCC-6/CI**

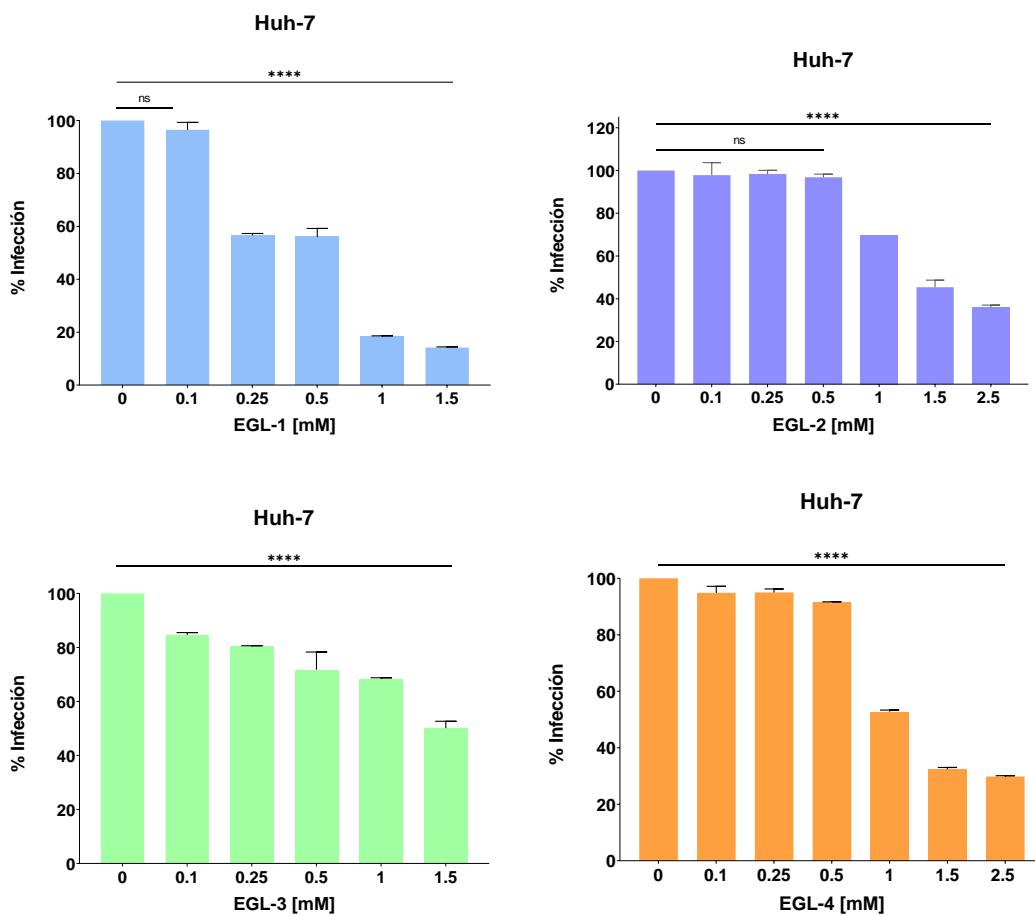
**B)**

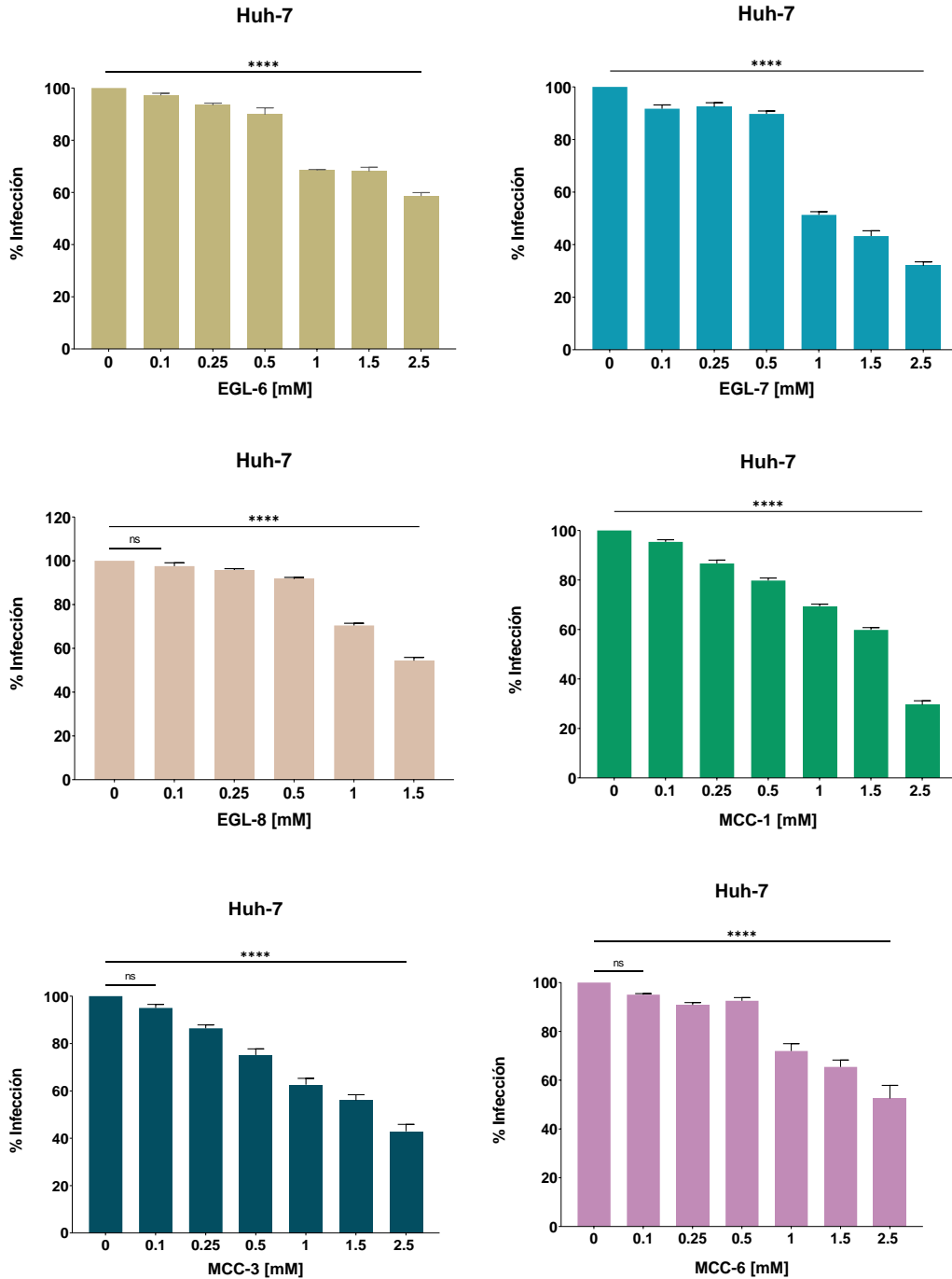
**Fig. 11** Efecto de los análogos de metformina y fenformina en la infección con DENV-2. Las células Huh7 infectadas a una MOI de 0.2 fueron tratadas con los diversos análogos de metformina a una concentración de 1 mM durante 48 h. Las células infectadas se analizaron mediante citometría de flujo. **A)** Se muestran los diferentes histogramas, se incluye: MOCK (color gris), control de infección (color rojo) y los diferentes tratamientos (color azul). Asimismo, se presenta la superposición de los histogramas de los diferentes tratamientos (color azul) con el control de infección (color rojo). **B)** Los resultados se presentan en porcentajes considerando al control de células infectadas sin tratar como el 100%. Los histogramas representan una imagen representativa de 3 experimentos realizados por duplicado. La gráfica representa las medias  $\pm$  SD de n=3 experimentos realizados por duplicado. La significancia estadística se estableció en un valor de probabilidad menor del 5% (\*\*\*\* $p < 0.05$ ). MET: metformina, CI: Control de Infección.

#### **IX.IV Potencial del efecto antiviral de los análogos de metformina y fenformina**

Como parámetro de la actividad antiviral de los diferentes análogos de metformina y fenformina, se determinó la concentración mínima para producir el efecto antiviral mostrado anteriormente. Para ello, se evaluó mediante citometría de flujo el porcentaje de infección en células Huh-7 tratadas durante

48 h a concentraciones crecientes de los compuestos: EGL-1, EGL-2, EGL-3, EGL-4, EGL-6, EGL-7, EGL-8, MCC-1, MCC-3 y MCC-6. Las concentraciones empleadas se determinaron usando rangos no citotóxicos, por lo que, las seleccionadas fueron: 0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5 y 2.5 Mm, para los análogos EGL-2, EGL-4, EGL-6, EGL-7, MCC-1, MCC-3 y MCC-6. Por otro lado, para los análogos EGL-1, EGL-3 y EGL-8 se seleccionaron las mismas concentraciones pero se omitió la de 2.5 mM. Los resultados indican que el compuesto EGL-1, presentó la mayor eficiencia en la inhibición de la infección como se muestra en la **fig. 12**.





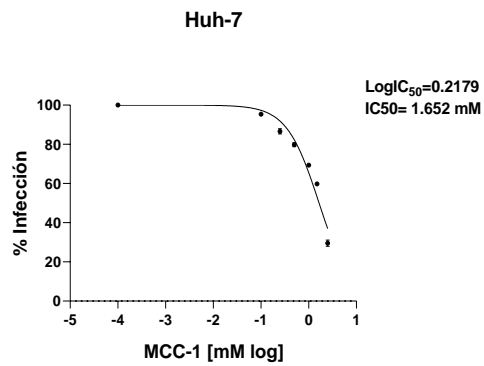
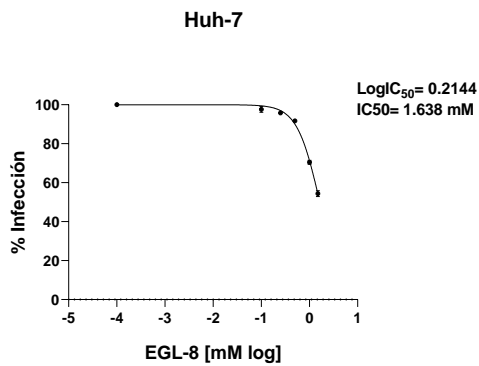
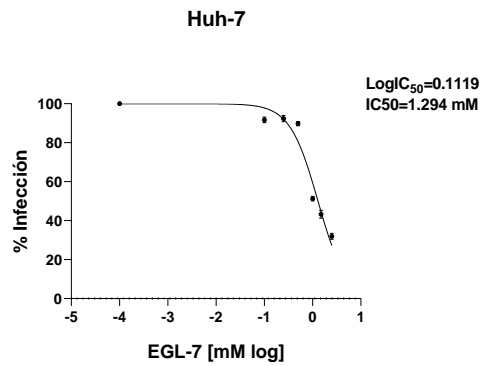
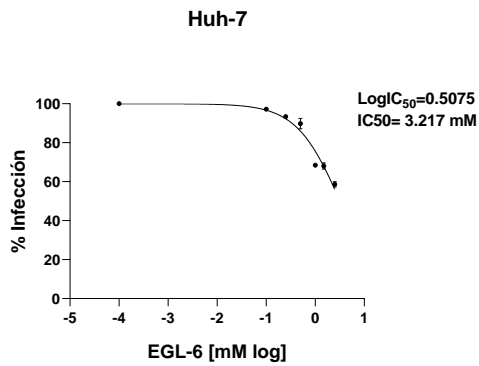
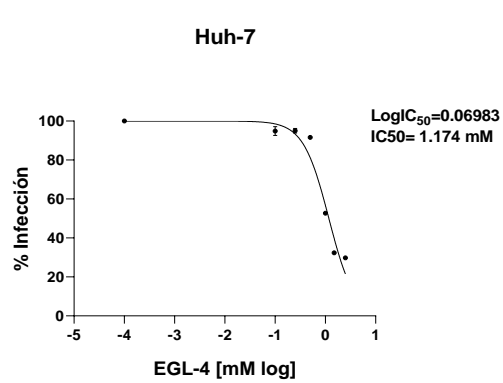
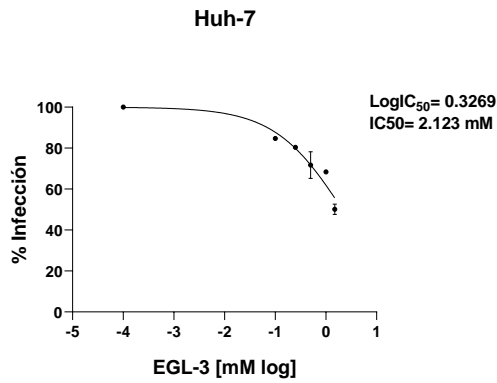
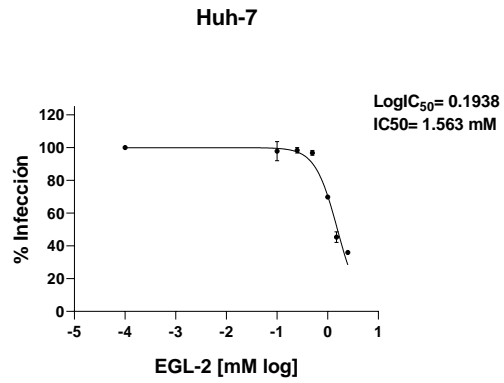
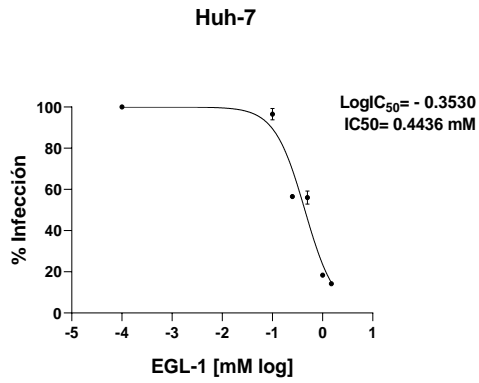
**Fig. 12** Eficiencia de inhibición de la infección por los análogos de metformina y fenformina. Las células Huh-7 fueron infectadas a una MOI de 0.2 y tratadas a concentraciones crecientes (0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5 y 2.5 mM o 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 1.5 mM) con los análogos de metformina y fenformina (EGL-1, EGL-2, EGL-3, EGL-4, EGL-6, EGL-7, EGL-8, MCC-1, MCC-3 y MCC-6) durante 48 h. El porcentaje de infección se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados se presentan en porcentajes considerando al control de células sin tratar como el 100%. Las gráficas representan las medias  $\pm$  SD de  $n = 3$  experimentos realizados por

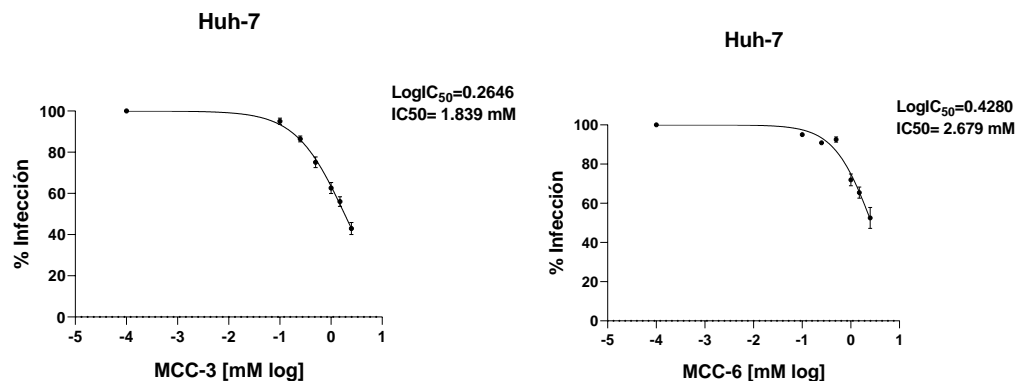


duplicado. La significancia estadística se estableció en un valor de probabilidad menor del 5% (\*\*\*\* $p < 0.05$ ).

### **IX.V Concentración Inhibitoria 50% (IC<sub>50</sub>)**

Con los valores de porcentajes de infección del ensayo anterior, se estimó la concentración inhibitoria que produce el efecto antiviral en el 50% de las células Huh-7 cuando eran tratadas a concentraciones crecientes con los análogos de metformina y fenformina. Este parámetro fue establecido mediante regresión no lineal de una curva concentración-respuesta de cuatro parámetros. Para el compuesto EGL-1 la IC<sub>50</sub>% fue de 0.4436 mM (95% CI= 0.3688 a 0.5350), EGL-2= 1.563 mM (95% CI= 1.436 a 1.711), EGL-3= 2.123 mM (95% CI=1.548 a 3.520), EGL-4= 1.174 mM (95% CI= 1.058 a 1.300), EGL-6= 3.217 mM (95% CI= 2.720 a 3.991), EGL-7=1.294 (95% CI= 1.176 a 1.430), EGL-8= 1.638 mM (95% CI=1.581 a 1.704), MCC-1= 1.652 mM (95% CI= 1.508 a 1.826), MCC-3= 1.839 mM (95% CI= 1.731 a 1.963), MCC-6=2.679 mM (95% CI= 2.388 a 3.092) como se muestra en la **fig.13**.





**Fig. 13** Concentración Inhibitoria 50 de los análogos de metformina y fenformina. Las células Huh-7 fueron infectadas a una MOI de 0.2 y fueron tratadas a concentraciones crecientes (0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5 y 2.5 Mm o 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 1.5 mM) con los análogos de metformina y fenformina (EGL-1, EGL-2, EGL-3, EGL-4, EGL-6, EGL-7, EGL-8, MCC-1, MCC-3 y MCC-6) durante 48 h. Con los porcentajes de infección se determinó la concentración inhibitoria 50%, mediante regresión no lineal de una curva concentración-respuesta de cuatro parámetros. Las gráficas representan las medias +/- SD de n= 3 experimentos realizados por duplicado.

## IX.VI Índice de Selectividad (SI)

Con los valores antes determinados, se estimó el índice de selectividad de los diversos análogos de metformina y fenformina en células Huh-7. Este parámetro, sirve como valor predictor del potencial terapéutico que pueden llegar a tener estos compuestos y se basa en la relación de la concentración citotóxica 50 y la concentración inhibitoria 50 ( $\text{CC}_{50}/\text{IC}_{50}$ ). Los valores obtenidos se muestran en la **tabla 3**. Los resultados indican que los compuestos EGL-2 (65.90), MCC-1 (128,588.98) y MCC-6 (154.24) a pesar de presentar los valores de SI más altos pueden ser considerados como no determinados ya que con esos compuestos no pudimos determinar la concentración citotóxica 50. Por otro lado, los compuestos EGL-1, EGL-4 y EGL-7 tuvieron los índices más altos sugiriendo que pueden ser buenos candidatos para su estudio posterior.

| Análogo | CC <sub>50</sub><br>(mM) | IC <sub>50</sub><br>(mM) | Índice de Selectividad<br>$SI = \frac{CC_{50}}{IC_{50}}$ |
|---------|--------------------------|--------------------------|----------------------------------------------------------|
| EGL-1   | 2.746                    | 0.4436                   | 6.19                                                     |
| EGL-2   | 103                      | 1.563                    | 65.90*                                                   |
| EGL-3   | 5.135                    | 2.123                    | 2.42                                                     |
| EGL-4   | 6.336                    | 1.174                    | 5.40                                                     |
| EGL-6   | 5.257                    | 3.217                    | 1.63                                                     |
| EGL-7   | 7.342                    | 1.294                    | 5.68                                                     |
| EGL-8   | 2.691                    | 1.638                    | 1.64                                                     |
| MCC-1   | 212,429                  | 1.652                    | 128,588.98*                                              |
| MCC-3   | 3.912                    | 1.839                    | 2.13                                                     |
| MCC-6   | 413.2                    | 2.679                    | 154.24*                                                  |

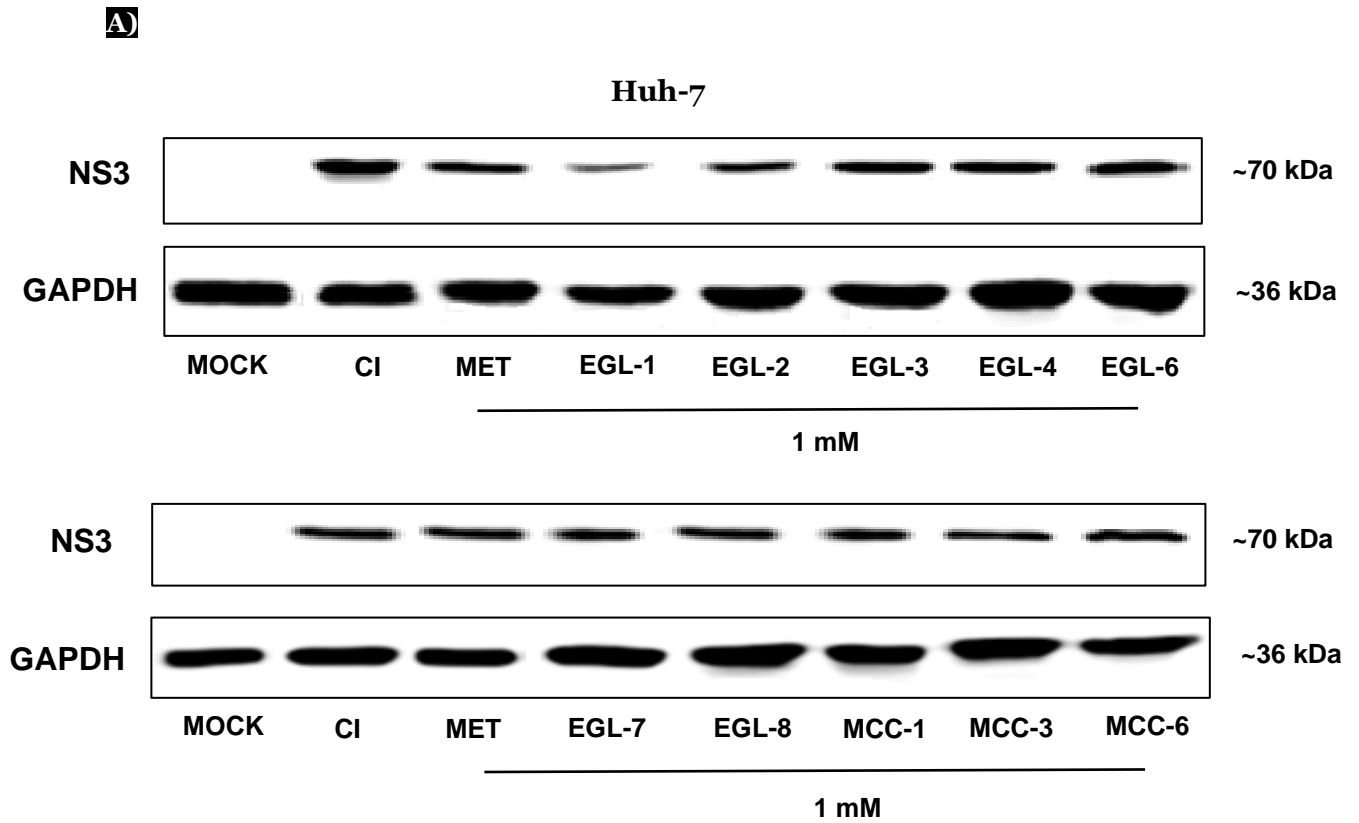
**Tabla.3** Índice de selectividad de los análogos de metformina y fenformina (EGL-1, EGL-2, EGL-3, EGL-4, EGL-6, EGL-7, EGL-8, MCC-1, MCC-3 y MCC-6) en células Huh-7. \* Valor indeterminado.

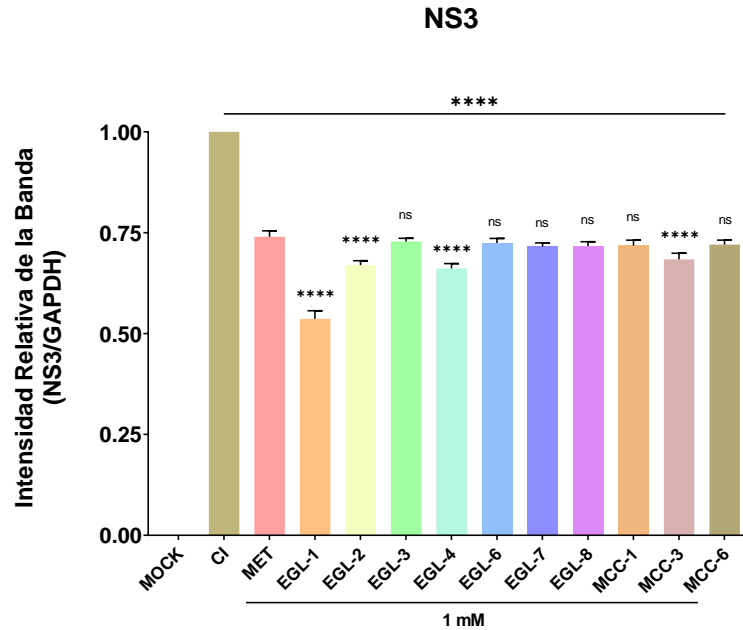
### **IX.VII Comparación del efecto antiviral de los análogos y la metformina**

Se estableció una comparación del poder inhibitorio anti-DENV-2 en células Huh-7 entre la metformina y los análogos de metformina y fenformina. Para ello, se determinaron los niveles de la proteína NS3, la progenie viral y el porcentaje de células infectadas después del tratamiento con una concentración de 1 mM con los diferentes análogos y la metformina.

Primero, para evaluar los niveles de la proteína NS3, se prepararon lisados de células tratadas y no tratadas durante 48 h y se sometieron a ensayos de Western Blot usando anticuerpos anti-NS3 y anti-GAPDH como control. Los niveles de expresión de proteína NS3 se determinaron mediante densitometría. A la concentración de 1 mM se encontró disminución significativa con respecto

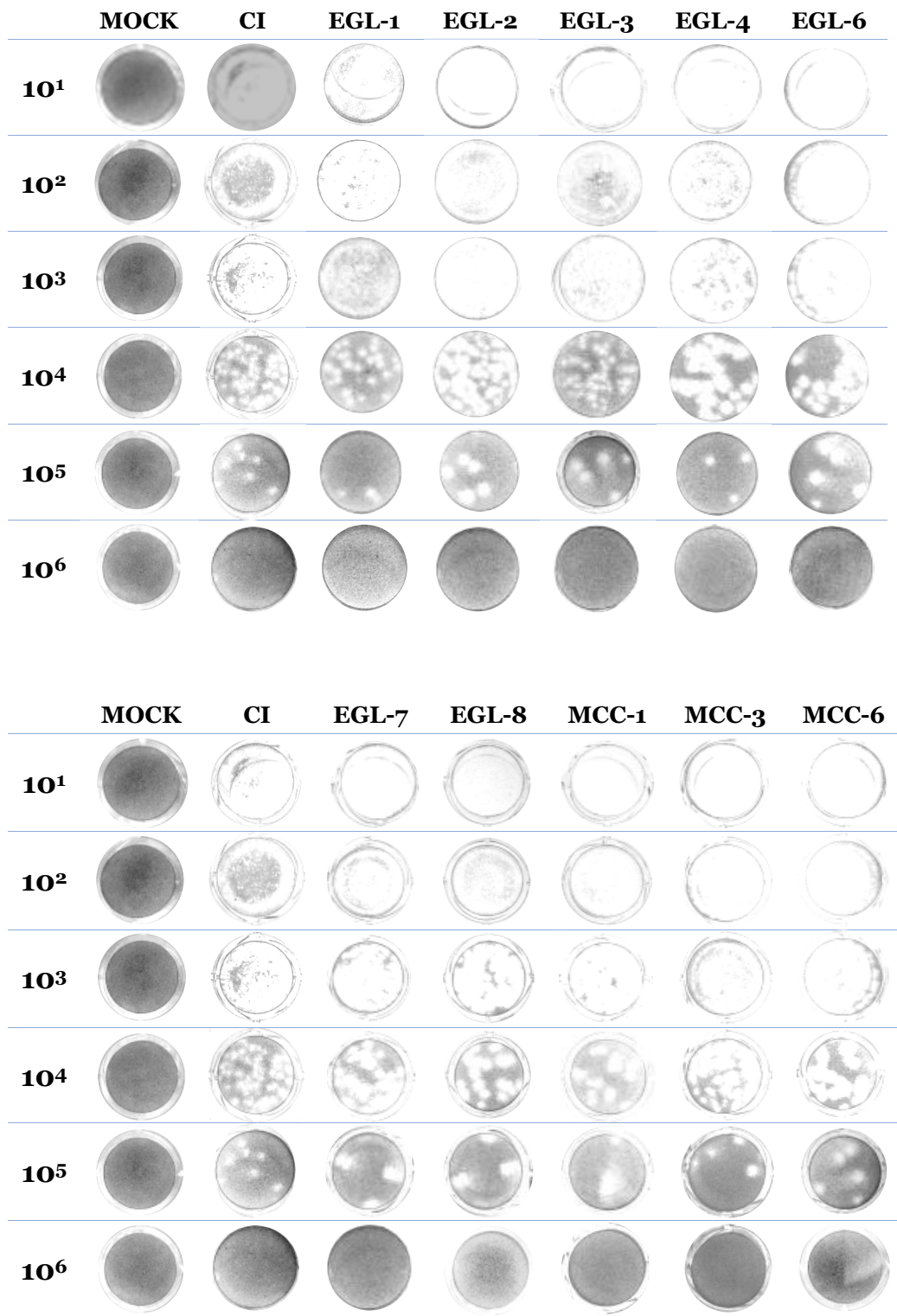
a metformina de los niveles de la proteína viral NS3 con el tratamiento con EGL-1. Hubo también reducción significativa de los niveles de NS3 con EGL-2, EGL-4 y MCC-3, sin embargo la diferencia no fue significativa con respecto a metformina (**fig.14**).

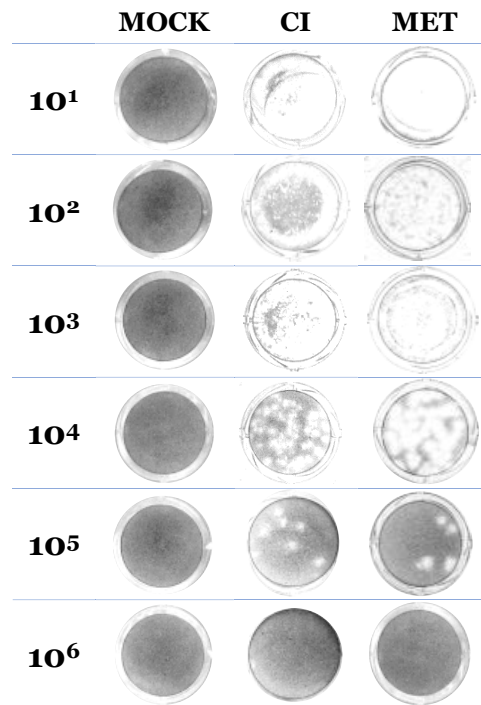


**B)**

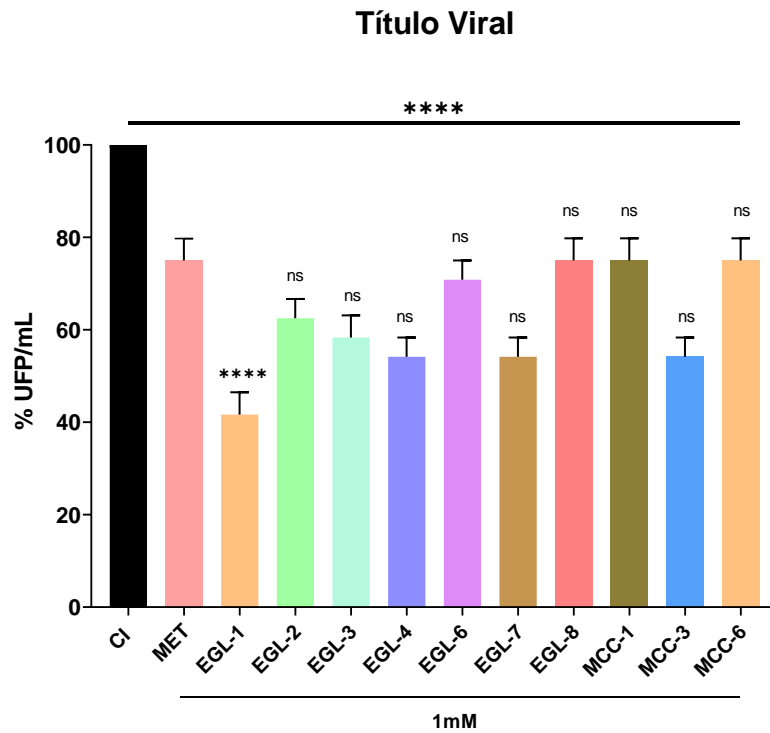
**Fig. 14** Comparación del efecto antiviral de los análogos y la metformina con respecto a metformina mediante los niveles de proteína viral NS3. Las células Huh-7 fueron infectadas a una MOI de 0.2 y tratadas a una concentración de 1 mM durante 48 horas con los análogos de metformina y fenformina (EGL-1, EGL-2, EGL-3, EGL-4, EGL-6, EGL-7, EGL-8, MCC-1, MCC-3 y MCC-6). El nivel de expresión de la proteína NS3 se determinó mediante ensayo de Western Blot. **A)** Se presentan imágenes representativas de las marcas de NS3 y GAPDH como control de carga. **B)** La gráfica representa la cuantificación relativa de cada banda de la proteína NS3 normalizada con la GAPDH y considerando al control de infección como 1. Las gráficas representan las medias  $\pm$  SD de  $n = 3$  experimentos realizados por duplicado. La significancia estadística se estableció en un valor de probabilidad menor del 5% (\*\*\*\* $p < 0.05$ ). MET: metformina, CI: Control de Infección.

Cuando se analizó la progenie viral mediante unidades formadoras de placas se encontró que a pesar de que los diversos tratamientos disminuyeron la progenie viral producida durante la infección, los análogos de metformina y fenformina no mostraron diferencia significativa respecto al título viral presentado con el tratamiento con metformina, con excepción del tratamiento con EGL-1 (**fig.15**).

**A**



**B)**



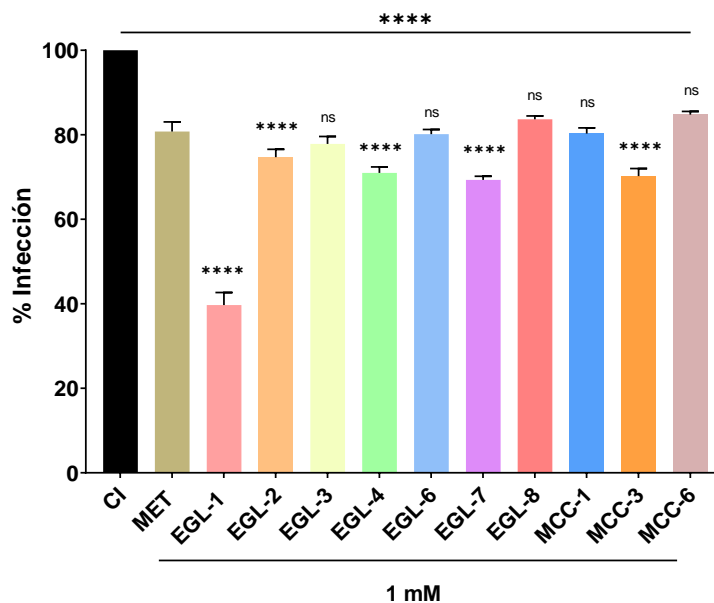
**Fig. 15** Comparación del efecto antiviral de los análogos y la metformina con respecto a metformina mediante la determinación del título viral. Las células Huh-7 fueron infectadas a



una MOI de 0.2 y tratadas a una concentración de 1 mM durante 48 horas con los análogos de metformina y fenformina (EGL-1, EGL-2, EGL-3, EGL-4, EGL-6, EGL-7, EGL-8, MCC-1, MCC-3 y MCC-6). El título viral se determinó mediante ensayo de unidades formadoras de placas. **A)** Se presentan imágenes representativas del ensayo de unidades formadoras de placas, incluyendo los diferentes tratamientos, control de infección y MOCK. **B)** Se presentan los resultados en porcentaje de unidades formadoras de placa por mililitro (%UFP/mL), considerando al control de infección como el 100%. Las gráficas representan las medias +/- SD de n= 3 experimentos realizados por duplicado. La significancia estadística se estableció en un valor de probabilidad menor del 5% (\*\*\*\*p<0.05). MET: metformina, CI: Control de Infección.

Por último, se determinó el porcentaje de infección mediante citometría de flujo en las células Huh-7 tratadas con los diversos análogos de metformina y fenformina. Los tratamientos con EGL-1, EGL-2, EGL-4, EGL-7, MCC-3 y MCC-6 mostraron diferencia significativa con respecto al tratamiento con metformina, presentando una mayor disminución de la cantidad de células infectadas (**fig. 16**).

## Células Infectadas



**Fig. 16** Comparación del efecto antiviral de los análogos de metformina y fenformina con respecto a la metformina mediante la determinación del porcentaje de células infectadas. Las células Huh-7 fueron infectadas a una MOI de 0.2 y tratadas a una concentración de 1 mM durante 48 horas con los análogos de metformina y fenformina (EGL-1, EGL-2, EGL-3, EGL-4, EGL-6, EGL-7, EGL-8, MCC-1, MCC-3 y MCC-6). Las células infectadas se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados se presentan en porcentajes considerando al control de células infectadas sin tratar como el 100%. La gráfica representa las medias +/- SD de n= 3 experimentos realizados por duplicado. La significancia estadística se estableció en un valor de probabilidad menor del 5% (\*\*\*\*p<0.05). MET: metformina, CI: Control de Infección.

## IX.VIII Análisis de Consenso Farmacológico

Con los diversos parámetros evaluados anteriormente, se realizó un análisis de consenso farmacológico para encontrar los análogos con las mejores características para ser empleados en ensayos futuros. La puntuación está dada por un código de colores verde, amarillo y rojo que clasifica el potencial terapéutico de acuerdo con el mayor número de atributos favorables. El color verde representa aquellos análogos con la mayor cantidad de características favorables, mientras que el rojo identifica los análogos con el menor número

de propiedades ideales para su uso terapéutico, pasando por un color amarillo con valores intermedios entre estos dos colores. Se observó que los análogos EGL-1 y EGL-2 muestran el mayor número de parámetros favorables y un potencial terapéutico alto. Por otro lado, los análogos EGL-3, EGL-6 y EGL-8 presentan una puntuación de color rojo, indicando su bajo potencial terapéutico, como se muestra en la **fig.17**.

| Análogo | Efecto antiviral (1mM)   |                                 |                           | Índice de Selectividad (>10) | Análogos vs Metformina (1mM) |                                 |                           | Puntuación |
|---------|--------------------------|---------------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------------|------------|
|         | Reducción de % infección | Reducción de proteína viral NS3 | Reducción de título viral |                              | Reducción de % infección     | Reducción de proteína viral NS3 | Reducción de título viral |            |
| EGL-1   | Sí                       | Sí                              | Sí                        | -                            | Sí                           | Sí                              | Sí                        | Verde      |
| EGL-2   | Sí                       | Sí                              | Sí                        | Sí                           | Sí                           | Sí                              | -                         | Verde      |
| EGL-3   | Sí                       | Sí                              | Sí                        | -                            | -                            | -                               | -                         | Rojo       |
| EGL-4   | Sí                       | Sí                              | Sí                        | -                            | Sí                           | Sí                              | -                         | Amarillo   |
| EGL-6   | Sí                       | Sí                              | Sí                        | -                            | -                            | -                               | -                         | Rojo       |
| EGL-7   | Sí                       | Sí                              | Sí                        | -                            | Sí                           | -                               | -                         | Amarillo   |
| EGL-8   | Sí                       | Sí                              | Sí                        | -                            | -                            | -                               | -                         | Rojo       |
| MCC-1   | Sí                       | Sí                              | Sí                        | Sí                           | -                            | -                               | -                         | Amarillo   |
| MCC-3   | Sí                       | Sí                              | Sí                        | -                            | -                            | Sí                              | -                         | Amarillo   |
| MCC-6   | Sí                       | Sí                              | Sí                        | Sí                           | -                            | -                               | -                         | Amarillo   |

**Fig. 17** Análisis de Consenso Farmacológico. La puntuación se muestra con un código de colores. El color verde representa los análogos con mayor número (6) de parámetros favorables. El amarillo muestra los análogos con 4 o 5 eventos favorables y el rojo los análogos con la menor cantidad (3) de parámetros positivos.

## X. DISCUSIÓN

El dengue es la enfermedad viral transmitida por mosquitos más prevalente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, y representa una gran carga para los sistemas de salud pública. A pesar de que, esta enfermedad afecta aproximadamente a unas 390 millones de personas cada año, en la actualidad no existe fármaco específico, seguro y eficaz que haya sido aprobado para el tratamiento del dengue. Por lo tanto, la búsqueda y desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para combatir las infecciones causadas por este patógeno, es fundamental. Una de las herramientas para el desarrollo de nuevos antivirales es dirigir las terapias al metabolismo celular del hospedero, ya que, los virus interfieren con numerosas vías celulares para crear un entorno favorable para su replicación, y el DENV no es la excepción.(65) Esta estrategia logra evitar la resistencia a los fármacos que normalmente se presenta cuando se desarrollan fármacos contra componentes virales debido a la alta mutación de los virus.(27,66,67) En este sentido, diversos estudios han establecido la importancia de la proteína celular AMPK durante la infección por dengue, por lo que, se ha convertido en un objetivo potencial para la inhibición de la infección por DENV.(52,53,66,68–71) La AMPK es un regulador maestro del metabolismo celular y en la infección por dengue en células Huh-7 esta proteína se encuentra principalmente en su forma inactiva.(52) La metformina es un fármaco ampliamente utilizado para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 y, curiosamente, su principal efecto consiste en promover indirectamente la activación de la AMPK.(55,59) Este hecho, hace que metformina sea un inhibidor eficiente de la infección por dengue, donde, nuestro grupo describió por primera vez este efecto en células Huh-7.(52) Posteriormente, nuestro grupo también describió el efecto antiviral de la metformina en un modelo *in vivo*, observando el mismo efecto antiviral que en los ensayos *in vitro* sugiriendo que la metformina es un fármaco prometedor para el tratamiento del dengue en pacientes.(53) Como sustento de estos resultados, Htun et al., reportaron correlación entre el uso de metformina en personas que padecen diabetes y el menor riesgo de desarrollar dengue grave,

sugiriendo que el empleo de metformina podría disminuir la gravedad de la enfermedad en personas con diabetes mellitus tipo 2 infectadas con DENV.(60) Además, un estudio clínico patrocinado por la Unidad de Investigación Clínica de la Universidad de Oxford en colaboración con el Hospital de Enfermedades Tropicales en Vietnam, se encuentra actualmente, evaluando la seguridad y la tolerabilidad de la metformina, así como su efecto sobre los marcadores de infección, parámetros clínicos y fisiológicos, entre otros., en pacientes obesos y con sobrepeso infectados con DENV.(72,73) Sin embargo, se ha informado que la metformina en ensayos *in vitro* e *in vivo* parece no ser funcional contra todos los serotipos de dengue y su eficacia está limitada a tipos de células específicas.(71) Lo referido anteriormente, se encuentra en un estudio realizado por Cheang et al., donde, encontraron una actividad anti-DENV pan-serotipo de la metformina en células BHK-21, lo que se correlacionó con niveles elevados de la proteína AMPK fosforilada (activa).(71) Estos resultados sugieren que la actividad antiviral de la metformina está mediada por la activación de AMPK, lo cual correlaciona con los resultados obtenidos en células Huh-7 por nuestro grupo.(52) No obstante, la metformina causó un efecto pro-DENV en células Vero, como lo demuestra el aumento de los títulos virales para DENV-1, DENV-3 y DENV-4, mientras que no se observó ningún efecto significativo con el tratamiento en DENV-2.(71) Este último resultado, no se asoció con una mayor activación de AMPK, indicando efectos independientes de la activación de esta proteína. Además, el mismo comportamiento fue observado en modelos animales donde la eficacia de la metformina fue nula. Cheang et al., observaron que la administración de metformina en ratones asintomáticos AG129 no redujo los títulos virales en sangre, mientras que, en un modelo de ratón con dengue grave, no mejoró la gravedad ni la progresión de la enfermedad.(71) Estos resultados contrastan con los reportados con nuestro grupo donde en un modelo de ratón AG129 la metformina aumentó la supervivencia de los animales y redujo los signos clínicos de la enfermedad.(53) Los resultados contrastantes de la metformina en la infección por DENV puede hacer pensar que este fármaco no es la mejor opción para el tratamiento de las infecciones causadas por todos los serotipos dengue

y en dosis altas, puede potencialmente empeorar la enfermedad.(71) No obstante, el encontrar un enfoque terapéutico único puede no ser apropiado para abordar el dengue en varias partes del mundo donde circulan cepas de DENV filogenéticamente distantes.(71) Uno de los factores que se sugiere pudo afectar el efecto antiviral de la metformina en los modelos *in vivo* es el empleo de una cepa diferente de DENV-2 (D2Y98P) con respecto a la empleada por nuestro grupo (Nueva Guinea). Este hecho, fue confirmado por Cheang et al., donde observaron un mayor efecto antiviral de la metformina contra la cepa Nueva Guinea de DENV-2 en células Huh-7 con respecto a la cepa D2Y98P.(71) Por otro lado, otro factor que puede estar implicado en los resultados del estudio anterior, se encuentra en las propiedades intrínsecas de la metformina, donde destaca su alta hidrofiliidad, que afecta su farmacocinética, incluyendo: baja absorción, biodisponibilidad oral limitada, bajo volumen de distribución y eliminación renal rápida, que comprometen finalmente su actividad terapéutica.(71) Sobre esto, un cambio en la farmacocinética puede alterar la exposición al fármaco y predisponer a una concentración insuficiente, lo que podría provocar actividad terapéutica deficiente.(74) En términos de su perfil farmacocinético, un buen candidato a fármaco para el tratamiento del dengue debe ser bien absorbido (para permitir una amplia biodisponibilidad y distribución), vida media larga y eliminación baja.(75) Una estrategia para optimizar el perfil farmacocinético de la metformina consiste en el diseño y síntesis de análogos, en los cuales, se modifiquen las propiedades fisicoquímicas de la molécula original con pequeños cambios en su estructura química, intentando conservar o mejorar su actividad terapéutica. Esta estrategia consiste en el desarrollo de compuestos farmacológicamente activos que estén relacionados estructural y funcionalmente con un compuesto de referencia (en este caso, metformina).(76) Sin embargo, estos nuevos compuestos pueden ofrecer ventajas significativas, debido a que, pueden diferir en la especificidad de acción farmacológica, su perfil farmacocinético y toxicológico, etc.(76)

Por lo tanto, en este trabajo se planteó evaluar el efecto antiviral de 15 análogos de metformina y fenformina (EGL-1, EGL-2, EGL-3, EGL-4, EGL-6, EGL-7, EGL-8, EGL-9, EGL-10, MCC-1, MCC-2, MCC-3, MCC-4, MCC-5 y MCC-6) durante la infección por DENV-2 en células Huh-7. Estos compuestos se diseñaron y sintetizaron en el laboratorio de Química Farmacéutica de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Los compuestos EGL se diseñaron con un enfoque QSAR (relación cuantitativa estructura-actividad) sobre la base de la estructura de la metformina y fenformina, manteniendo el grupo biguanida, eliminando las cadenas laterales de dimetilo y feniletilo, y sustituyendo el grupo amino proximal con grupos dietilo o cicloalquilo utilizando un enfoque denominado transformación de anillo de cadena, logrando una restricción conformacional que conecta los sustituyentes alquilo para dar los análogos cíclicos correspondientes. También, se emplearon criterios de homologación como método para pasar de sustituyentes con estructura de pirrolidina a piperidina. Además, se seleccionaron derivados de morfolina y piperazina como reemplazos isostéricos de la molécula de piperidina. Asimismo, los grupos bencilo o fenilo sustituidos se diseñaron como homólogos inferiores, con uno o dos grupos metileno menos que los que presenta la fenformina.(61,62,77) La fenformina (biguanida que en 1978 se retiró del mercado debido a su toxicidad) fue utilizada para el diseño de los análogos, principalmente por su mayor lipofilicidad con respecto a la metformina, mejorando algunos aspectos de su farmacocinética y efecto terapéutico. Todos los análogos se prepararon a partir de cianoguanidina que se condensó en condiciones de reflujo con varias alquilaminas o arilaminas.(62) Por otro lado, los compuestos MCC se diseñaron y sintetizaron siguiendo las mismas estrategias sobre la base del compuesto EGL-6, ya que, demostró ser el activador más potente de la proteína AMPK en hepatocitos primarios de rata a una concentración de 10 mM, incluso mayor que la metformina.(62) Además, Gutiérrez et al., reportaron que los análogos EGL-4 y EGL-6 redujeron significativamente los niveles de glucosa y tuvieron un efecto antihiper glucémico en un modelo *in vivo*, similar al causado con el tratamiento de metformina a una dosis única de 50 mg/kg.(62) Esta evidencia

respalda la actividad antidiabética de los análogos de manera similar a la de la metformina, así como el mecanismo de acción subyacente, mediante la activación de la AMPK; sugiriendo una actividad terapéutica similar entre la metformina y los análogos.

En este trabajo, como primer ensayo determinamos el potencial citotóxico de los diferentes análogos de metformina y fenformina en células Huh-7, para ello, se evaluó la viabilidad celular mediante un ensayo colorimétrico basado en la reducción de MTT (bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) por deshidrogenasas mitocondriales de células viables, para dar un producto de formazán de color azul que se puede medir espectrofotométricamente. Este ensayo se realizó en multiplacas con células Huh-7 que se trataron con concentraciones crecientes de los diversos análogos. Para los tratamientos de cada uno de los análogos, se seleccionaron las siguientes concentraciones: 0.5, 1, 1.5, 2.5, 3.5, 5 y 10 mM. Las concentraciones se establecieron a partir de la concentración mínima (1 mM) empleada en los ensayos realizados por Farfán et al., y que, demostró actividad antiviral en la infección por DENV-2.(53) Se observó durante la realización de este primer ensayo que 5 de los 15 análogos probados (EGL-9, EGL-10, MCC-2, MCC-4 y MCC-5) causaron la disrupción y desprendimiento de la monocapa celular a una concentración de 1 mM, sugiriendo una alta actividad citotóxica y se decidió no seguir evaluando estos análogos. Con los 10 análogos restantes que mantuvieron la integridad de la monocapa celular (EGL-1, EGL-2, EGL-3, EGL-4, EGL-6, EGL-7, EGL-8, MCC-1, MCC-3 y MCC-6) se observó un efecto citotóxico dependiente de la concentración (excepto en el análogo MCC-1), evidenciado por la reducción significativa de la viabilidad celular al emplear concentraciones crecientes, con respecto a las células tratadas únicamente con el vehículo. Sin embargo, el potencial citotóxico fue menos pronunciado para el análogo EGL-2 y MCC-6, ya que mantuvieron la viabilidad celular cerca del 80% a una concentración de 10 mM y 5 mM, respectivamente. Con respecto al análogo MCC-1, no se logró observar una disminución de la viabilidad celular al emplear mayores concentraciones, llegando a mantener por encima del 80%



de viabilidad hasta la concentración más alta (10 mM), sugiriendo el bajo potencial citotóxico de este análogo en células Huh-7, lo cual resulta ventajoso para los fines terapéuticos. Con los valores de porcentaje de viabilidad celular, se estimó la Concentración Citotóxica 50 (CC50), la cual, se definió como la concentración de los análogos requerida para la reducción de la viabilidad celular en un 50%, que se calculó mediante análisis de regresión no lineal de la curva concentración-respuesta. Se encontró que los análogos EGL-2 y MCC-6 presentaron las concentraciones citotóxicas mayores (103 mM y 413.2 mM, respectivamente), como se esperaba de acuerdo con los resultados obtenidos en la viabilidad celular. Sin embargo, para los análogos EGL-2 y EGL-6 los valores de CC50 representan una predicción dada por el modelo matemático, ya que no se alcanzó experimentalmente la disminución hasta el 50% de la viabilidad celular, por lo que, la CC50 se estableció como un valor indeterminado y se deben evaluar concentraciones superiores a las empleadas para precisar estos resultados. A pesar de que en el análogo MCC-1 no se pudo observar un efecto citotóxico dependiente de la concentración (a las concentraciones utilizadas), se intentó estimar la CC50, curiosamente, la regresión no lineal predijo estadísticamente un valor de CC50, el cual, como se esperaba fue muy alto (212,429 mM), al igual que el intervalo de confianza del 95% (1667 a 63,643,216,803 mM). El intervalo de confianza indica que la CC50 real se encuentra en ese rango de valores con un 95% de certeza, denotando un valor mínimo de 1667 mM, el cual, incluso, representa el valor más alto y menos citotóxico de todos los análogos, que resulta beneficioso para los propósitos terapéuticos. Ahora bien, es necesario realizar ensayos adicionales con concentraciones superiores a 10 mM para comprobar la CC50 de este análogo, de la misma manera que para los análogos EGL-2 y MCC-6.

Posteriormente, evaluamos el efecto antiviral de los diversos análogos y debido a la cantidad limitada de compuestos, decidimos comenzar un ensayo a una sola concentración de 1 mM para determinar mediante citometría de flujo el porcentaje de células Huh-7 infectadas con DENV-2 cuando eran tratadas con los diversos análogos. Nuestros resultados mostraron un efecto antiviral con

los tratamientos de los análogos, ya que se observó una reducción significativa del porcentaje de células infectadas con respecto al control de infección tratado con el vehículo. Esto sugirió, que los análogos al igual que poseen un efecto antihiper glucémico similar a la metformina, también tienen un efecto antiviral en la infección por DENV-2. Como control positivo de la reducción de la infección, se trataron células con metformina a 1 mM que demostró en ensayos realizados por Farfán et al., reducción en el porcentaje de infección por DENV-2.(53) A partir de que todos los análogos demostraron efecto antiviral, se evaluó mediante citometría de flujo el potencial antiviral obteniendo la Concentración Inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>), la cual se estableció como la concentración a la que los análogos inhiben la infección por DENV-2 en un 50%. Este método permitió la medición del porcentaje de infección cuando las células habían sido infectadas y tratadas con concentraciones crecientes de los análogos. Para este ensayo, se emplearon concentraciones no citotóxicas de acuerdo con los valores obtenidos en el ensayo de viabilidad celular para cada uno de los tratamientos. Las concentraciones empleadas, incluyeron: EGL-1 (0.1, 0.25, 0.5, 1 y 1.5 mM), EGL-2 (0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5 y 2.5 mM), EGL-3 (0.1, 0.25, 0.5, 1 y 1.5 mM), EGL-4 (0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5 y 2.5 mM), EGL-6 (0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5 y 2.5 mM), EGL-7 (0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5 y 2.5 mM), EGL-8 (0.1, 0.25, 0.5, 1 y 1.5 mM), MCC-1 (0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5 y 2.5 mM), MCC-3 (0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5 y 2.5 mM) y MCC-6 (0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5 y 2.5 mM). Para los tratamientos EGL-2, MCC-1 y MCC-6 se utilizó la concentración máxima de 2.5 mM, debido a la disponibilidad de los compuestos. La concentración citotóxica se fijó de acuerdo con la literatura en el 80%, donde se establece que la concentración del tratamiento que reduce hasta el 20% de viabilidad celular representa el valor máximo para considerar a un compuesto no citotóxico.(71,78) Esta delimitación de la citotoxicidad en el ensayo de IC<sub>50</sub> es de vital importancia, ya que permite evaluar el potencial inhibitorio de los diferentes tratamientos, debido a sus propias características químicas y descarta la influencia de la muerte celular en la disminución de células infectadas. En este ensayo, se observó un efecto antiviral dependiente de la concentración, en todos los análogos probados, debido a que en los 10 análogos analizados, el porcentaje

infección disminuyó el utilizar mayor concentración de los tratamientos en relación con las células infectadas y tratadas con el vehículo. La reducción del porcentaje de infección para todos los tratamientos fue próxima al 30% a una concentración de 1 mM y este efecto fue sobresaliente en el análogo EGL-1 donde el porcentaje de infección disminuyó un 40% desde la concentración 0.25 mM, sugiriendo su elevada actividad antiviral en la infección por DENV-2. A partir de los valores de porcentaje de infección a las diferentes concentraciones se definió la IC<sub>50</sub>, la cual, estima la concentración de cada uno de los análogos para producir un efecto inhibitorio al 50% en la infección por DENV-2 y sirve como medida directa de la potencia antiviral de cada uno de los compuestos.(78,79) La IC<sub>50</sub> se determinó realizando un análisis de regresión no lineal a la curva concentración-respuesta. Los valores obtenidos señalan (como se esperaba) al análogo EGL-1 como el mejor compuesto con actividad antiviral, con un IC<sub>50</sub> de 0.4436 mM, seguido de los compuestos EGL-2, EGL-4 y EGL-7 con valores de 1.563, 1.174 y 1.294 mM respectivamente. Los compuestos EGL-6 y MCC-6 presentaron la IC<sub>50</sub> más alta con un valor de 3.217 y 2.679 mM, respectivamente, exponiendo un escaso potencial *in vitro* antiviral.

Con los datos generados de CC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub> se determinó el índice de selectividad de los análogos (EGL-1, EGL-2, EGL-3, EGL-4, EGL-6, EGL-7, EGL-8, MCC-1, MCC-3 y MCC-6), que es un parámetro importante y ampliamente aceptado en la investigación y desarrollo de fármacos, ya que sirve como un indicador del potencial terapéutico que posee un compuesto. Además, define la capacidad para ser empleado en ensayos futuros y con mayor alcance. Para establecer el índice de selectividad, se necesita obtener la CC<sub>50</sub> y la IC<sub>50</sub> de los compuestos, debido a que, la relación CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub> proporciona el valor de índice de selectividad.(78,79) Los mejores candidatos idealmente deberían tener una concentración citotóxica relativamente alta pero con una concentración activa o inhibitoria antiviral muy baja.(78,79) EGL-2 (65.90), MCC-1 (128,588.98) y MCC-6 (154.24) mostraron el mayor índice de selectividad y mejor potencial terapéutico, dado en gran parte por su bajo poder citotóxico, lo que permite su

estudio posterior en ensayos *in vitro* e *in vivo*, donde se pudieran aumentar las concentraciones empleadas y esperar un mejor efecto antiviral sin efectos citotóxicos considerables. Por otro lado, los demás análogos EGL-1, EGL-3, EGL-4, EGL-6, EGL-7, EGL-8 y MCC-3 presentaron un índice de selectividad  $>1$  y  $<6$ , ampliamente más bajos que EGL-2, MCC-1 y MCC-6. Sin embargo, Indrayanto et al., mencionan que un índice de selectividad  $<1$  se puede considerar relativamente bajo y significa que el compuesto podría ser tóxico, por lo que, no puede ser utilizado como un fármaco, además, establece que si el valor está entre 1 y 10, se recomienda reevaluar utilizando otros sistemas para la confirmación, mientras que un valor mayor de 10 es el criterio de aceptación más recomendable para considerar un compuesto activo con gran potencial terapéutico.(78) Considerando esto, los compuestos restantes EGL-1, EGL-3, EGL-4, EGL-6, EGL-7, EGL-8 y MCC-3 deben ser evaluados y confirmados en otros biosistemas, ya que el índice de selectividad funciona como indicador temprano del éxito de las fármacos.

Debido al efecto antiviral plausible que demostraron los diversos análogos de metformina y fenformina, se evaluó su efecto antiviral mediante otros parámetros a una concentración de 1 mM, como: reducción de los niveles de la proteína viral NS3 y del título viral. Puesto que, la proteína viral NS3 cumple funciones fundamentales para la replicación del genoma viral, producción de proteínas virales y producción del ambiente lipídico apropiado alrededor del RE para la replicación eficiente de DENV, consideramos importante investigar la expresión de esta proteína cuando las células infectadas se trataron con los diversos análogos. Nuestros resultados indican una disminución estadísticamente significativa de los niveles de la proteína viral NS3 cuando se trataron con una concentración de 1 mM de los diferentes análogos con respecto al control de infección tratado con vehículo. El análogo EGL-1 causó una mayor reducción de la proteína NS3, con respecto a los demás análogos, lo cual, coincide con los datos observados en el porcentaje de infección. Estos resultados, sugieren que los análogos afectan la síntesis de la proteína viral NS3, impactando directamente al ciclo replicativo del DENV y correlacionando

la reducción de la proteína viral con la reducción del porcentaje de células infectadas. Para confirmar estas observaciones, se evaluó el título viral mediante ensayo de unidades formadoras de placas, donde se identificó una disminución estadísticamente significativa en los niveles de producción de progenie viral para todos los tratamientos a 1 mM, siendo más grande este efecto con el análogo EGL-1, validando su mayor efecto antiviral con respecto a los análogos restantes. Estos resultados, confirman el efecto antiviral causado por los análogos de metformina y fenformina a nivel de células infectadas, producción de proteínas virales y de progenie viral, los cuales, son procesos del ciclo replicativo de DENV íntimamente relacionados.

Por último, decidimos comparar el efecto anti-DENV de los diversos análogos con respecto al efecto anti-DENV de la metformina a una concentración de 1 mM en células Huh-7. Para ello, se determinó en los diferentes tratamientos el porcentaje de infección mediante citometría de flujo, título viral por medio de ensayo de unidades formadoras de placa y la producción de proteína viral NS3 a través de Western Blot. En el porcentaje de infección se observó una diferencia estadísticamente significativa de los análogos EGL-1, EGL-2, EGL-4, EGL-7 y MCC-3 en comparación con la metformina, mostrando un mayor efecto para disminuir la cantidad de células infectadas y sugiriendo una mayor actividad antiviral. En cuanto a la metformina, nuestros resultados coinciden con los reportados por Farfán et al., donde muestran la reducción del porcentaje de infección en células Huh-7 a una concentración de 1 mM a las 24 horas.(53) No obstante, Farfán et al., encontraron una mayor reducción en el número de células infectadas con DENV, tratadas con metformina a concentraciones más altas (7.5 y 15 mM).(53) Asimismo, Soto et al., encontraron una reducción significativa de células infectadas tratadas con 10 mM de metformina en células Huh-7 a las 24 y 48 horas.(52) Por otro lado, únicamente el análogo EGL-1 mostró una reducción significativa del título viral en comparación con la metformina, sugiriendo un efecto anti-DENV mayor que la metformina a 1 mM. Los análogos: EGL-2, EGL-3, EGL-4, EGL-6, EGL-7, EGL-8, MCC-1, MCC-3 y MCC-6, tuvieron un comportamiento similar a la

metformina en la reducción del título viral y no se encontraron diferencias significativas. La metformina, en otros estudios también ha demostrado producir una reducción significativa del título viral de DENV en células Huh-7 a las 24 horas a concentraciones de 1, 7.5, 10 y 15 mM, encontrando resultados similares a los obtenidos en este trabajo.(52,53) Además, Cheang et al., han informado el efecto anti-DENV pan-serotipo de la metformina sobre la producción de partículas virales en células BHK-21 a las 48 horas, mostrando una reducción del título viral a concentraciones de 1, 3 y 10 mM. Sin embargo, los mismos autores encontraron un efecto contrario de la metformina en células Vero a las 48 horas, aumentando los títulos virales de todos los serotipos de DENV a concentraciones de 1, 3, 10 y 30 mM.(71) Los niveles de la proteína viral NS3 fue el último parámetro evaluado de forma experimental, donde se encontró que los análogos EGL-1, EGL-2, EGL-4 y MCC-3 disminuyeron de manera significativa los niveles de la proteína viral NS3 en comparación con la metformina a una concentración de 1 mM durante 48 horas, mientras que EGL-3, EGL-6, EGL-7, EGL-8, MCC-1 y MCC-6 no mostraron diferencia significativa con la metformina, aunque se observó una tendencia de reducción de la proteína NS3 similar. Otros estudios también han evaluado el efecto de la metformina sobre los niveles de la proteína NS3; Soto, et al., y Farfan et al., encontraron una reducción significativa en la proteína NS3 a concentraciones de 7.5, 10 y 15 mM en células Huh-7 a las 24 h, mientras que a 1 mM se observó una tendencia a la disminución de NS3 pero sin diferencia significativa.(52,53) En nuestros ensayos, logramos una diferencia significativa en la expresión de la proteína NS3 con el tratamiento de metformina a 1 mM, lo que difiere de los resultados de los estudios antes mencionados. Sin embargo, una posible explicación es el aumento del tiempo de tratamiento (48 horas), permitiendo un efecto más sostenido y observando un mejor efecto antiviral. Además, la disminución en la variación del conjunto de datos alrededor de la media, resultó ser beneficioso para obtener una mejor desviación estándar, en comparación a los resultados reportados por Farfan et al., donde la desviación estándar es muy grande para observar diferencias. (53)

Todos los resultados obtenidos de la evaluación del efecto antiviral de los análogos de metformina y fenformina antes descritos, se sometieron a un análisis de consenso farmacológico, el cual tiene como objetivo seleccionar el o los compuestos más confiables con base en su actividad terapéutica potencial, su toxicidad, perfil farmacocinético y datos experimentales adicionales, así, los compuestos con mayor número de características favorables son los mejores candidatos.(80) Para realizar este análisis, se consideró el efecto antiviral, el índice de selectividad y la comparación entre los análogos y la metformina. Se logró determinar que los análogos: EGL-1, EGL-2, EGL-4, EGL-7 y MCC-1 obtuvieron el mejor puntaje. Sin embargo, el análogo que presentó mayor número de características positivas fue EGL-2, ya que demostró efecto antiviral, un índice de selectividad alto y redujo la infección mejor que la metformina a una concentración de 1 mM en al menos uno de los parámetros de infección evaluados. EGL-1, también demostró el mismo número de características favorables, en cambio, su índice de selectividad fue menor que EGL-2, lo que condiciona su capacidad de ser trasladado a estudios, utilizando una mayor concentración.

A pesar de los pequeños cambios en la estructura original de la metformina que supuso la síntesis de los análogos, se observó un efecto antiviral durante la infección por DENV-2, sugiriendo la importancia del grupo biguanida que posee la metformina y los análogos, en la acción farmacológica antiviral. Sin embargo, las características farmacocinéticas y toxicológicas pueden ser diferentes en cada uno de los compuestos, lo que puede determinar su éxito como agente terapéutico. Referente a esto, existen ejemplos de fármacos derivados que han logrado el éxito teniendo la misma o mejor actividad terapéutica y características fisicoquímicas diferentes, por ejemplo: la amoxicilina es un análogo de la penicilina G, que difiere en la adición de un grupo OH y NH<sub>2</sub> en la estructura original, no obstante, estas pequeñas modificaciones hacen a la amoxicilina estable en un ambiente ácido por lo que es adecuado para consumo oral, mientras que la penicilina G solo se puede administrar de manera parenteral.(81) Además, la mayor eficacia

de amoxicilina observada *in vivo* podría ser consecuencia de su mayor absorción en el tracto gastrointestinal con respecto a la penicilina y, por ende, de su mayor penetración en el tejido y el logro de niveles terapéuticos sostenidos durante más tiempo.(81)

Interesantemente, hubo análogos que tuvieron un mejor efecto antiviral en la infección por dengue que la metformina, esto podría ser explicado por las pequeñas diferencias químicas en los sustituyentes de la estructura base de metformina, lo cual podría conllevar a diferencias en la especificidad de unión a proteínas celulares o virales, así como su interacción con nuevos factores tanto virales como del hospedero, produciendo un espectro de acción nuevo o más amplio. Para sustentar esta explicación, es necesario determinar el mecanismo de acción antiviral que tienen los análogos durante la infección por DENV, por lo que creemos necesario evaluar inicialmente la activación de la proteína AMPK, la cual, es objetivo indirecto de la metformina y que está implicada en su efecto anti-DENV.(52,71)

Los resultados de este trabajo revelan que los análogos de metformina y fenformina poseen un efecto antiviral en la infección por DENV-2 confirmado por la reducción del porcentaje de infección, título viral y producción de la proteína viral NS3. Además, 3 análogos demostraron tener un elevado índice de selectividad, sugiriendo su alto potencial terapéutico y 5 análogos exhibieron un efecto anti-DENV mayor que la metformina en al menos uno de los 3 parámetros de infección evaluados.



## **XI. CONCLUSIONES**

Los análogos de metformina y fenformina: EGL-1, EGL-2, EGL-3, EGL-4, EGL-6, EGL-7, EGL-8, MCC-1, MCC-3 y MCC-6 mostraron efecto antiviral contra el DENV-2 en células Huh-7 a las 48 h de tratamiento.

Los análogos: EGL-1, EGL-2, EGL-4, EGL-7, MCC-3 y MCC-6 presentaron un mejor efecto antiviral con respecto a la metformina en al menos un parámetro de infección a una concentración de 1mM.

Los análogos: EGL-2, MCC-1, MCC-6 exponen el mejor potencial terapéutico dado por un mayor índice de selectividad, por lo que, podrían ser evaluados con concentraciones más altas sin causar citotoxicidad y esperando obtener un efecto antiviral mayor.

En conjunto, estos resultados sugieren que los análogos de metformina y fenformina son agentes antivirales eficaces para inhibir la infección por DENV *in vitro* y podrían ser buenos candidatos para el tratamiento del dengue. Entre ellos, el análogo EGL-1 y EGL-2 resultaron tener las características más prometedoras. Por lo tanto, estos dos últimos compuestos podrían ser una alternativa a la metformina, la única biguanida disponible en la actualidad.

## **XII. PERSPECTIVAS**

1. Evaluar el efecto antiviral contra el DENV en un modelo *in vivo*
2. Evaluar el efecto con los diferentes serotipos de DENV y en otras líneas celulares, como: otras líneas de células hepáticas humanas, células mononucleares primarias de sangre periférica humana y macrófagos derivados de monocitos humanos.
3. Evaluar el efecto con otros flavivirus como ZIKV, YFV y WNV
4. Desarrollar una forma farmacéutica adecuada para la administración de los análogos de metformina y fenformina
5. Investigar los mecanismos subyacentes al efecto anti-DENV observado con los análogos
6. Evaluar el efecto antiviral contra DENV-2 a concentraciones más altas de los análogos: EGL-2, MCC-3 y MCC-6.

### **XIII. BIBLIOGRAFÍA**

1. Harapan H, Michie A, Sasmono RT, Imrie A. Dengue: A Minireview. *Viruses*. 2020;12(8):829.
2. Bhatt P, Sabeena SP, Varma M, Arunkumar G. Current Understanding of the Pathogenesis of Dengue Virus Infection. *Current Microbiology*. 2021;78(1):17–32.
3. Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB. Dengue infection. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016;2(1):1–25.
4. Halstead SB. Controversies in dengue pathogenesis. *Paediatrics and International Child Health*. 2012;32(1):5–9.
5. World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever. Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. 1997.
6. World Health Organization. Dengue. Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. 2009.
7. Htun TP, Xiong Z, Pang J. Clinical signs and symptoms associated with WHO severe dengue classification: a systematic review and meta-analysis. *Emerging Microbes & Infections*. 2021;10(1):1116–28.
8. Twiddy SS, Farrar JJ, Vinh Chau N, Wills B, Gould EA, Gritsun T, et al. Phylogenetic Relationships and Differential Selection Pressures among Genotypes of Dengue-2 Virus. *Virology*. 2002;298(1):63–72.
9. Cao J, Deng H, Ye L, Ma X, Chen S, Sun X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of Dengue virus outbreaks in two regions of China, 2014 – 2015. *PLOS ONE*. 2019;14(3):e0213353.
10. Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal Armed Forces India*. 2015;71(1):67–70.
11. Twiddy SS, Holmes EC, Rambaut A. Inferring the Rate and Time-Scale of Dengue Virus Evolution. *Molecular Biology and Evolution*. 2003;20(1):122–9.
12. Heinz FX, Stiasny K. The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2017;81(1):e00055-16.
13. Faustino AF, Martins AS, Karguth N, Artilheiro V, Enguita FJ, Ricardo JC, et al. Structural and Functional Properties of the Capsid Protein of Dengue

- and Related Flavivirus. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(16):3870.
14. Velandia ML, Castellanos JE. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*. 2011;15(1):33–43.
  15. Perera R, Kuhn RJ. Structural Proteomics of Dengue Virus. *Current Opinion in Microbiology*. 2008;11(4):369–77.
  16. Meng F, Badierah RA, Almehdar HA, Redwan EM, Kurgan L, Uversky VN. Unstructural biology of the dengue virus proteins. *FEBS Journal*. 2015;282(17):3368–94.
  17. Chen HR, Lai YC, Yeh TM. Dengue virus non-structural protein 1: a pathogenic factor, therapeutic target, and vaccine candidate. *Journal of Biomedical Science*. 2018;25(1):58.
  18. Dechtawewat T, Roytrakul S, Yingchutrakul Y, Charoenlappanit S, Siridechadilok B, Limjindaporn T, et al. Potential Phosphorylation of Viral Nonstructural Protein 1 in Dengue Virus Infection. *Viruses*. 2021;13(7):1393.
  19. Zou J, Xie X, Lee LT, Chandrasekaran R, Reynaud A, Yap L, et al. Dimerization of Flavivirus NS4B Protein. *Journal of Virology*. 2014;88(6):3379–91.
  20. Mazeaud C, Freppel W, Chatel-Chaix L. The Multiples Fates of the Flavivirus RNA Genome During Pathogenesis. *Frontiers in Genetics*. 2018;9:595.
  21. De Falco L, Silva NM, Santos NC, Huber RG, Martins IC. The Pseudo-Circular Genomes of Flaviviruses: Structures, Mechanisms, and Functions of Circularization. *Cells*. 2021;10(3):642.
  22. Ng WC, Soto-Acosta R, Bradrick SS, Garcia-Blanco MA, Ooi EE. The 5' and 3' Untranslated Regions of the Flaviviral Genome. *Viruses*. 2017;9(6):137.
  23. Slonchak A, Khromykh AA. Subgenomic flaviviral RNAs: What do we know after the first decade of research. *Antiviral Research*. 2018;159:13–25.
  24. Ramos-Lorente S, Romero-López C, Berzal-Herranz A. Information Encoded by the Flavivirus Genomes beyond the Nucleotide Sequence. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(7):3738.
  25. Dwivedi VD, Arya A, Yadav P, Kumar R, Kumar V, Raghava GPS. DenvInD: dengue virus inhibitors database for clinical and molecular research. *Briefings in Bioinformatics*. 2020;22(3):1–8.

26. Reyes-Del Valle J, Chávez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM. Heat Shock Protein 90 and Heat Shock Protein 70 Are Components of Dengue Virus Receptor Complex in Human Cells. *Journal of Virology*. 2005;79(8):4557–67.
27. S AH, Pujar GV, Sethu AK, Bhagyalalitha M, Singh M. Dengue structural proteins as antiviral drug targets: Current status in the drug discovery & development. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021;221:113527.
28. Palma Ocampo HK. Estudio del interferón tipo III sobre la infección del virus del dengue. BUAP; 2016.
29. Jing Q, Wang M. Dengue epidemiology. *Global Health Journal*. 2019;3(2):37–45.
30. Carabali M, Hernandez LM, Arauz MJ, Villar LA, Ridde V. Why are people with dengue dying? A scoping review of determinants for dengue mortality. *BMC Infectious Diseases*. 2015;15(1):301.
31. Torres-Galicia I, Cortés-Poza D, Becker I. Dengue en México: incremento en la población juvenil durante la última década. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 2014;71(4):196–201.
32. Arredondo-García JL, Escalera CGAL, Lugo-Gerez JJA, Osnaya-Romero N, Pérez-Guillé G, Medina-Cortina H. Panorama epidemiológico de dengue en México 2000-2019. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*. 2020;33(2):78–83.
33. Secretaría de Salud. Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información Dirección General de Epidemiología 2021.
34. World Health Organization. Dengue and severe dengue . 2021.
35. Begum F, Das S, Mukherjee D, Mal S, Ray U. Insight into the Tropism of Dengue Virus in Humans. *Viruses*. 2019;11(12):1136.
36. Puerta-Guardo H, Mosso C, Medina F, Liprandi F, Ludert JE, del Angel RM. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in U937 cells requires cholesterol-rich membrane microdomains. *Journal of General Virology*. 2009;91(2):394–403.
37. Diamond MS, Pierson TC. Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and its Implications for Disease Control. *Cell*. 2015;162(3):488–92.
38. Simmons CP, Farrar JJ, van Vinh Chau N, Wills B. Dengue. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(15):1423–32.

39. World Health Organization. Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020. 2012.
40. Guzman MG, Harris E. Dengue. *The Lancet*. 2015;385(9966):453–65.
41. Gutsche I, Coulibaly F, Voss JE, Salmon J, d'Alayer J, Ermonval M, et al. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(19):8003–8.
42. Tan LK, Wong WY, Yang HT, Huber RG, Bond PJ, Ng LC, et al. Flavivirus Cross-Reactivity to Dengue Nonstructural Protein 1 Antigen Detection Assays. *Diagnostics (Basel)*. 2019;10(1):E11.
43. Centers for Disease Control and Prevention. Dengue. 2021.
44. Wilken L, Rimmelzwaan GF. Adaptive Immunity to Dengue Virus: Slippery Slope or Solid Ground for Rational Vaccine Design? *Pathogens*. 2020;9(6):470.
45. López-Medina E, Biswal S, Saez-Llorens X, Borja-Tabora C, Bravo L, Sirivichayakul C, et al. Efficacy of a Dengue Vaccine Candidate (TAK-003) in Healthy Children and Adolescents 2 Years after Vaccination. *The Journal of Infectious Diseases*. 2022;225(9):1521–32.
46. Prompetchara E, Ketloy C, Thomas SJ, Ruxrungtham K. Dengue vaccine: Global development update. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 2020;38(3):178–85.
47. Low JG, Gatsinga R, Vasudevan SG, Sampath A. Dengue Antiviral Development: A Continuing Journey. En: Hilgenfeld R, Vasudevan SG, editores. *Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies*. Singapore: Springer; 2018. p. 319–32. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 1062).
48. Tian YS, Zhou Y, Takagi T, Kameoka M, Kawashita N. Dengue Virus and Its Inhibitors: A Brief Review. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2018;66(3):191–206.
49. U. S. National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov*. 2021.
50. Osuna-Ramos JF, Reyes-Ruiz JM, del Ángel RM. The Role of Host Cholesterol During Flavivirus Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2018;8:388.
51. Soto-Acosta R, Mosso C, Cervantes-Salazar M, Puerta-Guardo H, Medina F, Favari L, et al. The increase in cholesterol levels at early stages after dengue virus infection correlates with an augment in LDL particle uptake and HMG-CoA reductase activity. *Virology*. 2013;442(2):132–47.

52. Soto-Acosta R, Bautista-Carbajal P, Cervantes-Salazar M, Angel-Ambrocio AH, Angel RM del. DENV up-regulates the HMG-CoA reductase activity through the impairment of AMPK phosphorylation: A potential antiviral target. *PLOS Pathogens*. 2017;13(4):e1006257.
53. Farfan-Morales CN, Cordero-Rivera CD, Osuna-Ramos JF, Monroy-Muñoz IE, De Jesús-González LA, Muñoz-Medina JE, et al. The antiviral effect of metformin on zika and dengue virus infection. *Scientific Reports*. 2021;11(1):8743.
54. Kathuria D, Raul AD, Wanjari P, Bharatam PV. Biguanides: Species with versatile therapeutic applications. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021;219:113378.
55. Bailey CJ. Metformin: historical overview. *Diabetologia*. 2017;60(9):1566–76.
56. Thomas I, Gregg B. Metformin; a review of its history and future: from lilac to longevity. *Pediatric Diabetes*. 2017;18(1):10–6.
57. Benedetti F, Sorrenti V, Buriani A, Fortinguerra S, Scapagnini G, Zella D. Resveratrol, Rapamycin and Metformin as Modulators of Antiviral Pathways. *Viruses*. 2020;12(12):1458.
58. Bai B, Chen H. Metformin: A Novel Weapon Against Inflammation. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12:15.
59. Alušík Š, Paluch Z. Metformin: the past, presence, and future. *Minerva Medica*. 2015;106(4):233–8.
60. Htun HL, Yeo TW, Tam CC, Pang J, Leo YS, Lye DC. Metformin Use and Severe Dengue in Diabetic Adults. *Scientific Reports*. 2018;8(1):3344.
61. Gutierrez-Lara EJ, Sanchez-Lopez A, Navarrete-Vazquez G, Centurion D. Evaluation of the vasopressor responses of metformin and one analogue of metformin in insulin resistance rats. *The FASEB Journal*. 2016;30(S1):1270.5-1270.5.
62. Gutierrez-Lara E, Martínez-Conde C, Rosales-Ortega E, Ramírez-Espinosa JJ, Rivera-Leyva JC, Centurión D, et al. Synthesis and In Vitro AMPK Activation of Cycloalkyl/Alkarylbiguanides with Robust In Vivo Antihyperglycemic Action. *Journal of Chemistry*. 2017;2017:1–8.
63. García Rubiño ME, Carrillo E, Ruiz Alcalá G, Domínguez-Martín A, A. Marchal J, Boulaiz H. Phenformin as an Anticancer Agent: Challenges and Prospects. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(13):3316.

64. Nørgård MØ, Christensen M, Mutsaers HAM, Nørregaard R. Phenformin Attenuates Renal Injury in Unilateral Ureteral Obstructed Mice without Affecting Immune Cell Infiltration. *Pharmaceutics*. 2020;12(4):301.
65. Troost B, Smit JM. Recent advances in antiviral drug development towards dengue virus. *Current Opinion in Virology*. 2020;43:9–21.
66. Jiménez de Oya N, Blázquez AB, Casas J, Saiz JC, Martín-Acebes MA. 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*. 2018;62(7):e00360-18.
67. Pérez-Pérez MJ, Saiz JC, Priego EM, Martín-Acebes MA. Antivirals against (Re)emerging Flaviviruses: Should We Target the Virus or the Host? *ACS Med Chem Lett*. 2022;13(1):5–10.
68. Jordan TX, Randall G. Dengue Virus Activates the AMP Kinase-mTOR Axis to Stimulate a Proviral Lipophagy. *J Virol*. 2017;91(11):e02020-16.
69. Wan Y, Wu W, Wan Y, Li L, Zhang J, Chen X, et al. Brivanib alaninate inhibited dengue virus proliferation through VEGFR2/AMPK pathway. *Pharmacol Res*. 2021;170:105721.
70. Ratanakomol T, Roytrakul S, Wikan N, Smith DR. Berberine Inhibits Dengue Virus through Dual Mechanisms. *Molecules*. 2021;26(18):5501.
71. Cheang YZN, Ting HRD, Koh HQV, Alonso S. In vitro and in vivo efficacy of Metformin against dengue. *Antiviral Research*. 2021.
72. Nguyen NM, Chanh HQ, Tam DTH, Vuong NL, Chau NTX, Chau NVV, et al. Metformin as adjunctive therapy for dengue in overweight and obese patients: a protocol for an open-label clinical trial (MeDO). *Wellcome Open Res*. 2020;5:160.
73. Oxford University Clinical Research Unit, Vietnam. Metformin as Adjunctive Therapy in Overweight and Obese Patients with Dengue: An Open-label Safety and Tolerability Trial. 2020.
74. Sheleme T. Clinical Pharmacokinetics of Metformin. *Metformin - Pharmacology and Drug Interactions*. IntechOpen; 2021.
75. Lim SP. Dengue drug discovery: Progress, challenges and outlook. *Antiviral Research*. 2019;163:156–78.
76. Aronson JK, Green AR. Me-too pharmaceutical products: History, definitions, examples, and relevance to drug shortages and essential medicines lists. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2020;86(11):2114–22.



77. Wermuth CG. Similarity in drugs: reflections on analogue design. *Drug Discovery Today*. 2006;11(7-8):348-54.
78. Indrayanto G, Putra GS, Suhud F. Chapter Six - Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*. Academic Press; 2021.
79. Pritchett JC, Naesens L, Montoya J. Chapter 19 - Treating HHV-6 Infections: The Laboratory Efficacy and Clinical Use of Anti-HHV-6 Agents. *Human Herpesviruses HHV-6A, HHV-6B & HHV-7*. Elsevier; 2014.
80. Domínguez-Mendoza EA, Galván-Ciprés Y, Martínez-Miranda J, Miranda-González C, Colín-Lozano B, Hernández-Núñez E, et al. Design, Synthesis, and In Silico Multitarget Pharmacological Simulations of Acid Bioisosteres with a Validated In Vivo Antihyperglycemic Effect. *Molecules*. 2021;26(4):799.
81. Akhavan BJ, Khanna NR, Vijhani P. Amoxicillin. *StatPearls Publishing*; 2022.