



**UNIVERSIDAD
DE SEVILLA**

Facultad de Biología



TRABAJO DE FIN DE GRADO

Caracterización de la actividad anti-citomegalovirus de una colección de derivados de Niclosamida

Autora: Miranda Ramos Murillo

Tutor Académico: Dr. Mohammed Rafii El Idrisi Benhnia

Tutor del Proyecto: Dr. Javier Sánchez Céspedes

Curso académico 2022/2023

Grado en Bioquímica por la Universidad de Sevilla y la Universidad de Málaga

ÍNDICE

1. Introducción

1.1 Citomegalovirus Humano

1.1.1 Generalidades: Clasificación, estructura y genoma

1.1.2 Ciclo de infección de HCMV

1.2 Impacto clínico de la infección de HCMV

1.2.1 Infección de HCMV en la población

1.2.2 Tratamientos en pacientes inmunodeprimidos con infección HCMV

1.3 Alternativas: Derivados de Niclosamida

2. Justificación

3. Objetivos

4. Materiales y métodos

4.1 Compuestos derivados de Niclosamida

4.2 Línea celular y virus

4.3 Propagación y purificación viral

4.4 Titulación viral

4.5 Citotoxicidad de los compuestos

4.6 Cuantificación de HCMV en combinación con los derivados de Niclosamida, mediante PCR a tiempo real (rtPCR)

4.7 Cuantificación de HCMV-GFP en combinación con los derivados de mediante fluorescencia

4.8 Análisis estadístico

5. Resultados

5.1 Citotoxicidad de los compuestos

5.2 Obtención de Concentración Inhibitoria media de Infección mediante PCR (IC50)

5.3 Obtención de Concentración Inhibitoria media de Infección mediante fluorescencia (IC50)

5.4 Índice de selectividad

6. Discusión

7. Conclusiones

8. Bibliografía

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Citomegalovirus Humano

1.1.1 Generalidades: Clasificación, estructura y genoma

El citomegalovirus humano (HCMV) o herpesvirus-5 (HHV-5) pertenece a la familia *Herpesviridae*, en concreto a la subfamilia *Bethaherpesvirinae*. Se encuentra entre los herpesvirus que pueden infectar a humanos (Gugliesi, 2020; Griffiths, 2021). El HCMV infecta entre un 40 a casi un 100% de la población humana (Jean Beltran, 2014), y entre la multitud de células que pueden ser infectadas por HCMV, encontramos células musculares lisas, fibroblastos, macrófagos, hepatocitos, células dendríticas y células endoteliales vasculares (Gugliesi, 2020).

En cuanto a la estructura de la cápside del HCMV, está constituida por tres regiones principales: una nucleocápside icosaédrica que contiene el genoma de ADN lineal de doble cadena, un tegumento proteico que rodea a la cápside, la cual es una región compleja y con gran importancia en la infección, y una envoltura lipídica que rodea al virus. La capa lipídica deriva de la célula huésped, a la cual se le adicionan proteínas estructurales propias del virus. El genoma codifica numerosas de estas glicoproteínas estructurales: gB, gH, gL, gO, UL128, UL130, UL131. Según su disposición en pentámero (gH/gL/UL128/UL130/UL131) o trímero (gH/gL/gO) se determina el tropismo celular y son determinantes para la entrada del virus en la célula. La doble cadena de ADN viral clasifica a este tipo de virus en el grupo I dentro de la clasificación de Baltimore (**Figura 1**).

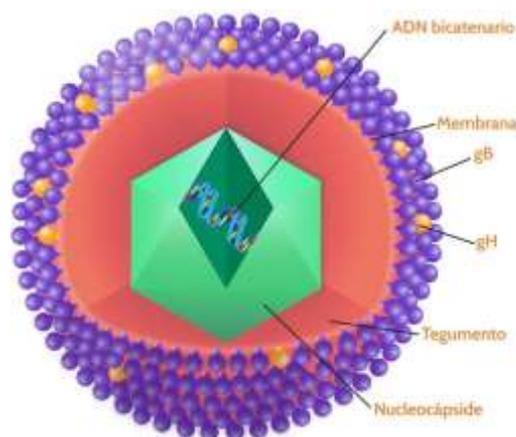


Figura 1: Estructura de Citomegalovirus Humano (HCMV). gB y gH representan glicoproteínas virales de membrana. Tomada de http://synapticpg.com/cmV_fisiopatologia.html

El genoma está compuesto aproximadamente por unas 230 kb y está formado por dos regiones únicas (U_L y U_S), cada una flanqueada por dos regiones repetidas (Cunningham, 2010; Gugliesi, 2020) (**Figura 2**). La expresión de los genes durante la infección de HCMV se lleva a cabo de manera temporal, en 3 fases: genes inmediatamente tempranos, en la que se transcriben los genes que controlan el entorno celular, regulan la expresión de otros genes virales y son responsables de la activación de los genes tempranos y tardíos (Isomura & Stinski, 2003).

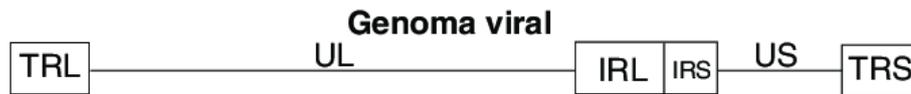


Figura 2: Estructura del genoma de Citomegalovirus. TRL e IRL se refieren a las regiones repetidas del segmento largo único (U_L). IRS y TRS son las regiones repetidas que flanquean al segmento corto único (U_S) (Sanbonmatsu Gámez et al., 2014)

Se conocen dos mecanismos de entrada en la célula por HCMV. Por un lado, el virus ingresa en las células por endocitosis, seguido de una fusión dependiente de pH bajo. Esta endocitosis requiere la unión de un complejo formado por las proteínas gH, gL y otras tres proteínas codificadas en la región en UL128, 130, 131A con la proteína neuropilina-2 (Nrp-2). En el caso de que las células infectadas sean fibroblastos, la entrada del virus no se produce por endocitosis sino que ésta es iniciada por la unión del trímero gH, gL y gO al receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR α) (Ryckman et al., 2006; Wang & Shenk, 2005). Esta unión desencadena una señalización que desemboca en un cambio de conformación en la glicoproteína viral gB. A medida que gB se repliega en su conformación de post-fusión, las membranas viral y celular se fusionan, creando un poro de fusión, a través del cual la cápside viral puede liberarse al interior celular (Connolly et al., 2021) (**Figura 3**).

La cápside se dirige entonces al núcleo celular donde se libera el material genético mientras que las proteínas del tegumento controlan la respuesta de las células del huésped (Jean Beltran & Cristea, 2014) (**Figura 4**).

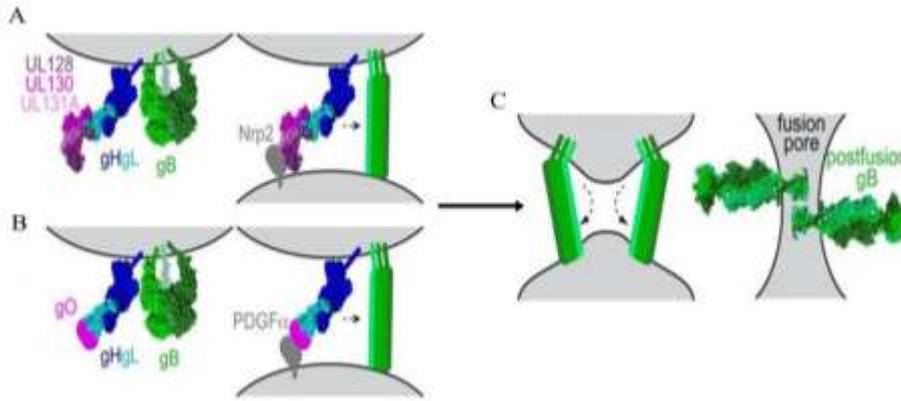


Figura 3: A. Entrada de HCMV en células epiteliales: Se demuestra la interacción entre las proteínas virales de superficie (UL128, 130, 131^a, junto con gHGL) y la proteína neuropilina-2 (Nrp-2) de la superficie celular. **B. Entrada en fibroblastos humanos.** Se demuestra la interacción de gHGL y gO con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR α). **C. Fusión de membrana viral y membrana**

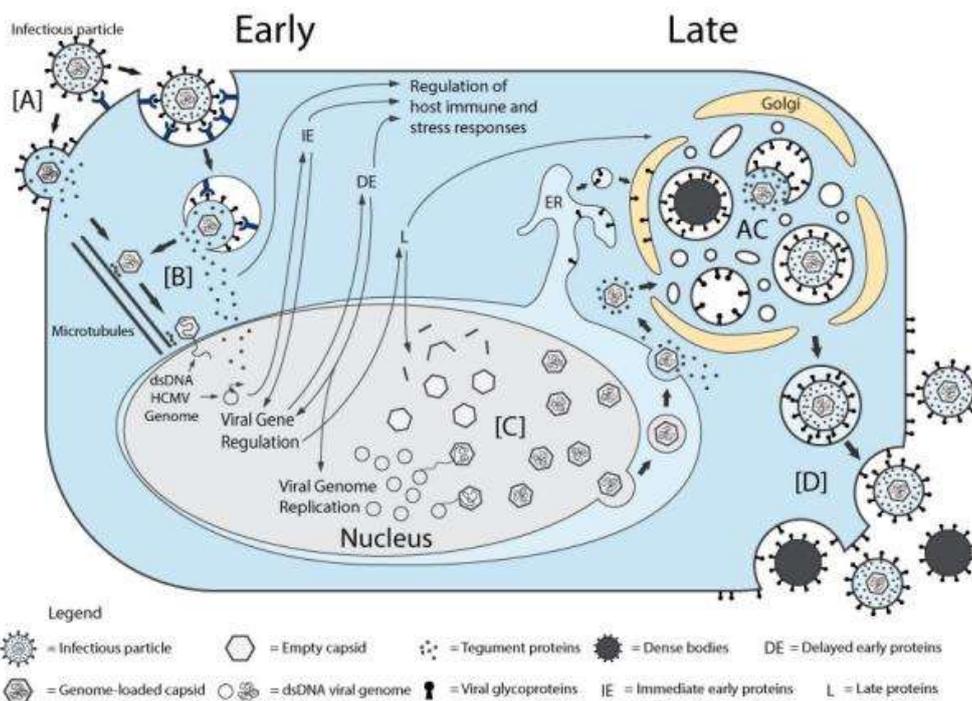


Figura 4: Ciclo de infección de HCMV.

A. Tras la interacción con los receptores el virus es introducido en la célula. **B.** A través de un transporte por microtúbulos la partícula viral desnuda llega hasta el núcleo. Aquí se circulariza la cadena de ADN. **C.** Se da la expresión de genes virales hasta formar nuevas partículas virales. Se transportan mediante un sistema de membranas adquiriendo las proteínas que formarán la envoltura. **D.** Se produce la liberación del virus completo (Jean Beltran & Cristea, 2014).

A partir de aquí comienza la cascada de expresión de los diferentes *clusters* de genes: genes inmediatos tempranos, genes tempranos inmediatos, genes tempranos, genes tardíos y genes de evasión inmunológica. Son los genes tardíos los que hacen que comience el ensamblaje de la partícula viral (**Figura 5**). No obstante, después de la infección existen dos vías: vía lítica y vía lisogénica. En el caso de que el virus desarrolle latencia viral, por ejemplo en células progenitoras hematopoyéticas, no podrá realizar la infección por la vía lítica (S. J. Chen et al., 2022; Griffiths & Reeves, 2021). La latencia viral se puede deber a la ausencia de replicación lítica sumada a la capacidad que tiene el virus de reactivación en ciertas condiciones, como son la diferenciación y la señalización mediada por inflamación (Griffiths, 2021).

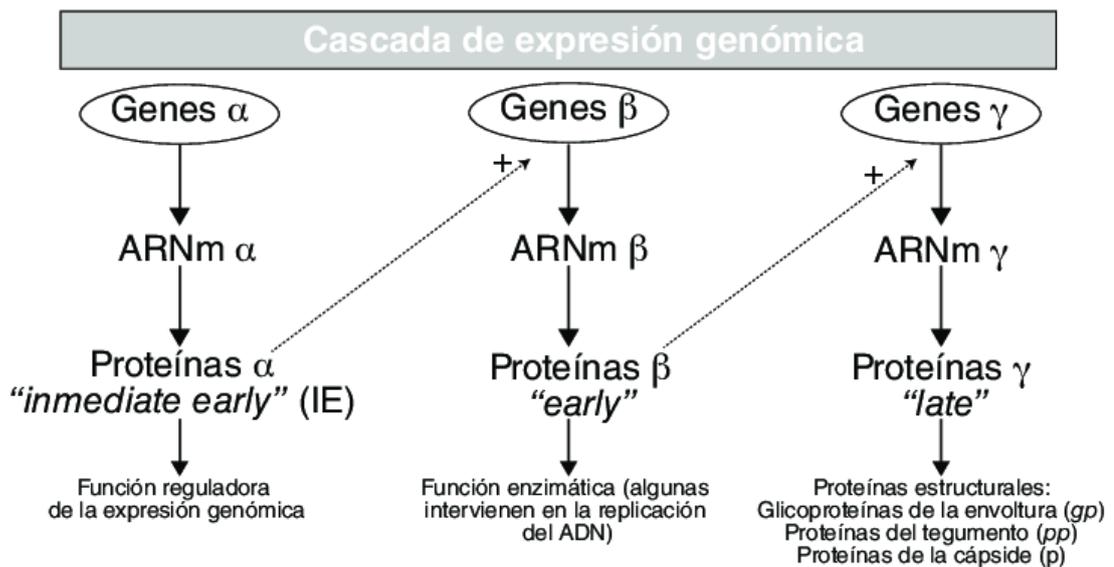


Figura 5. Cascada de expresión genómica en CMV. (Sanbonmatsu Gámez et al., 2014)

1.2 Impacto clínico de la infección de HCMV

1.2.1 Infección de HCMV en la población

Como se comentó anteriormente, tras la primera infección el HCMV puede volver a activarse en el huésped inmunosuprimido tras un periodo de latencia. Es por ello que, en la población sana e inmunocompetente, la mayoría de infecciones por HCMV evolucionan de manera asintomática y no llegan a producir enfermedad (Gugliesi et al., 2020; Yurochko, n.d.). Existe un equilibrio entre la infección viral y el sistema inmune mediado por inmunoglobulinas de tipo G (Ig-G) (Gugliesi et al., 2020). En el momento en el que rompe este equilibrio, puede darse tal reactivación. (Griffiths & Reeves, 2021). En el caso de pacientes inmunodeprimidos la incidencia de la enfermedad por HCMV es más alta, sobre todo debido a la deficiencia de linfocitos CD4+ y CD8+ (Gugliesi et al., 2020). Esta falta de acción de la respuesta celular

específica puede ser debido tanto a patologías, como a trasplantes. La infección puede darse también de manera congénita.

La infección por HCMV es una de las más frecuentes en pacientes recién trasplantados, tanto en receptores de trasplante de órgano sólido (TOS) como de progenitores hematopoyéticos (TPH), además de ser una infección oportunista en individuos con VIH. Estas infecciones pueden llegar a la presencia del virus en sangre o viremia y una alta carga viral, y esta infección diseminada puede desembocar en afectación orgánica, con elevada morbilidad y mortalidad en esta población (Griffiths & Reeves, 2021).

En referencia a los pacientes inmunosuprimidos, dependiendo de su afectación, podemos encontrar diferentes cuadros clínicos: desde fiebre con o sin hepatitis en pacientes receptores de TOS, neumonitis en receptores de TPH, o retinitis y encefalopatías en el caso de pacientes infectados por VIH (Sanbonmatsu Gámez et al., 2014). Los casos más graves se dan en aquellos pacientes con TOS que son seronegativos para el virus, a los que les ha sido trasplantado un órgano procedente de un individuo donador seropositivo para HCMV. En caso de que el receptor fuera seropositivo, podría darse una reactivación, no obstante, de menor gravedad que en la primera situación (Sanbonmatsu Gámez et al., 2014).

1.2.2 Tratamientos en pacientes inmunodeprimidos con infección HCMV

Debido a la gravedad de la infección en pacientes inmunodeprimidos es necesario el suministro de fármacos antivirales para prevenir o tratar la potencial infección. Actualmente, el fármaco de elección, tanto para la profilaxis como para tratamiento de infecciones por HCMV es ganciclovir (S. J. Chen et al., 2022; S. Chen & Wang, 2019). Este antiviral es un análogo de aciclovir, un potente agente contra la familia de *Herpesvirus* (HSV) (Summary, n.d.-a). Ganciclovir es un inhibidor competitivo de las ADN polimerasas virales, tanto de herpes simple como de CMV. Se convierte en ganciclovir trifosfato, el cual impide la incorporación de desoxiguanosina trifosfato en la elongación de del ADN viral. Después de la liberación de pirofosfato, el ganciclovir monofosfato puede añadirse al final de la cadena de ADN viral ralentizando la replicación (Summary, 2020). En caso de generación de resistencia por parte del virus, existen otras alternativas como cidofovir o valganciclovir. Al igual que Ganciclovir, cidofovir es un inhibidor de la polimerasa viral de HCMV (Summary, n.d.-b). Debido a las dificultades asociadas con el uso prolongado de tratamientos intravenosos y su carácter invasivo se han desarrollado tratamientos orales como valganciclovir. Este compuesto es un profármaco del ganciclovir, por lo que mantiene el mismo mecanismo de acción, y muestra una

biodisponibilidad diez veces superior al fármaco de origen. Las enzimas esterasas presentes en el intestino y el hígado transforman rápidamente el compuesto en ganciclovir.

Otro fármaco, de reciente desarrollo y muy utilizado en la actualidad, sobre todo como profilaxis, es letermovir, fármaco que actúa inhibiendo el complejo ADN terminasa de HCMV, en concreto la subunidad codificada por la región *UL56* en el genoma (El Helou & Razonable, 2019). Este procedimiento resulta necesario para la escisión e introducción en la cápside del material genético y es empleado en situaciones de reactivación de HCMV o pacientes seropositivos los cuales son receptores de trasplantes (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios Comunidad et al., 2019). Otra alternativa es foscarnet, un antiviral que impide la replicación en la familia *Herpesviridae* (AEP, 2020). La estructura de estos antivirales se muestra en la **Figura 6**, y sus principales características se especifican en la **Tabla 1**.

La actividad variable de todos ellos, en su lugar de acción, sumado a la toxicidad relacionada con la administración como por ejemplo de ganciclovir, que desaconseja su uso en pacientes inmunodeprimidos, y la creciente identificación de HCMV resistentes a todos ellos, tanto de este fármaco como de otros inhibidores de la ADN polimerasa viral como, hacen necesario el desarrollo de nuevos fármacos (S. Chen & Wang, 2019).

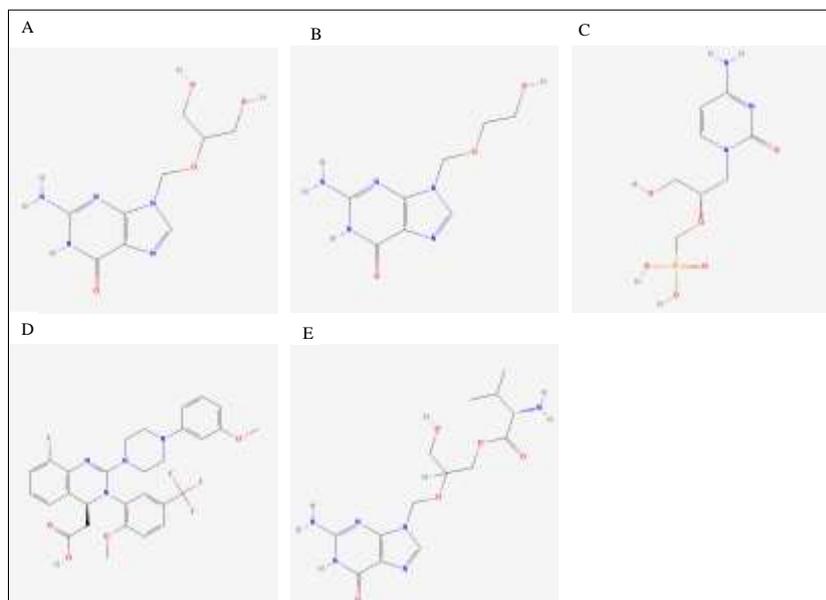


Figura 6. Estructuras de fármacos anti-HCMV. A. Aciclovir B. Ganciclovir C. Cidofovir D. Letermovir E. Ganciclovir. Tomado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

Tabla 1. Características de los medicamentos antivirales aprobados frente a HCMV.

Drug Name	Ganciclovir and valganciclovir	Foscarnet	Cidofovir	Letermovir
Mechanism of action	2'-deoxyguanosine analogue Competitive binding to UL54 DNA polymerase Needs phosphorylation by CMV (UL97 encoded) and host kinases Virostatic agent	Pyrophosphate analogue Noncompetitive inhibitor of many RNA and DNA polymerases (UL54 DNA polymerase in CMV) Virostatic agent	Acyclic monophosphate deoxycytidine analogue Competitive substrate of UL54 DNA polymerase leads to inhibition of viral DNA synthesis through incorporation into growing viral DNA chain Virostatic agent	Inhibits viral terminase complex, encoded by genes UL56, UL51 and UL89 Virostatic agent
Indications/ uses	CMV retinitis CMV prophylaxis SOT Non-FDA uses: CMV disease CMV preemptive strategy CMV prophylaxis in HSCT	CMV retinitis Non-FDA uses: second line for GCV resistant CMV disease therapy, prophylaxis or preemptive therapy	CMV retinitis Non-FDA uses: 2nd line for GCV resistant CMV disease therapy, prophylaxis or preemptive therapy	CMV prophylaxis in CMV-seropositive HSCT recipients
Formulations	GCV IV only VGCV oral	IV only	IV only Lipid conjugate not yet approved (brincidofovir)	IV and PO
Adverse effects	Pancytopenia and myelosuppression (leukopenia/neutropenia++) Renal injury Diarrhea Less common: pruritus, nausea, fever, torsade de pointes	Renal injury Electrolytes wasting Neutropenia Less common: headache, diarrhea, fever, QTc prolongation	Renal injury Proteinuria Neutropenia Ocular toxicity (iritis, uveitis, amblyopia) Less common: headaches, shivering, rash, alopecia, dyspnea	Uncommon, mainly GI (gastrointestinal, nausea), dyspnea, hepatitis
Resistance mechanism	Mutations in UL97 gene prevent activation of drug Mutations in UL54 gene prevent binding to DNA polymerase (may confer cross-resistance with all DNA-polymerase active antivirals)	Mutations in UL54 gene prevent binding to DNA polymerase (may confer cross-resistance with all DNA-polymerase active antivirals)	Mutations in UL54 gene prevent binding to DNA polymerase (may confer cross-resistance with all DNA-polymerase active antivirals)	Mutations in UL56 gene Less commonly, mutations in UL51 or UL89 genes

Abbreviations: CMV, cytomegalovirus; GCV, Ganciclovir; HSCT, hematopoietic stem cell transplant; IV, intravenous; PO, oral; GI, gastrointestinal; VGCV, Valganciclovir.

1.3 Alternativas: Derivados de Niclosamida

La niclosamida es un derivado del ácido salicílico, la cual se encuentra aprobada por la FDA para su uso como tratamiento para infecciones por helmintos (Xu et al., 2020). Se ha comprobado su efecto en distintas rutas de señalización como la NF- κ B, implicada en la regulación inflamatoria al controlar la expresión de citoquinas, moléculas de adhesión o incluso enzimas como la óxido nítrico sintasa (Moynagh, 2005), la vía Notch, implicada en procesos de proliferación celular (Kopan, 2012) o la interacción Wnt/ β -catenina (MacDonald et al., 2009), la cual hace posible el desarrollo embrionario y la homeostasis adulta (Xu, Shi, et al., 2020). Este fármaco actúa a nivel de la fosforilación oxidativa inhibiéndola y, por tanto, inhibiendo a la mitocondria (Andrews et al., 1983; Weinbach & Garbus, 1969) e induciendo así la muerte celular por apoptosis (Xu, Shi, et al., 2020).

Es debido a su amplio espectro de acción y su capacidad de modular el sistema inmune que se ha descubierto su aplicación en varias enfermedades: cáncer, enfermedades metabólicas e infecciones bacterianas o virales (Xu, Shi, et al., 2020). Un ejemplo de su acción antitumoral

se observó en células cancerosas de pulmón gracias a la acción del grupo 2-hidroxilo (He et al., 2021). Adicionalmente, se ha encontrado eficacia en multitud de tipos de virus con este compuesto, como frente a rinovirus (Jurgeit et al., 2012), adenovirus humano (Marrugal-Lorenzo et al., 2019; Xu et al., 2021; Xu, Berastegui-Cabrera, Chen, et al., 2020), flavivirus (Li et al., 2017) o coronavirus (Lawal et al., 2023; Wen et al., 2007; Wu et al., 2004), entre otros (Xu, Shi, et al., 2020). En el caso de adenovirus, el fármaco muestra unas características muy favorables para el tratamiento contra este virus mostrando una alta actividad antiviral *in vitro*, inhibiendo el transporte desde el endosoma hasta la membrana nuclear (Xu et al., 2021).

Uno de los inconvenientes de la niclosamida es su elevada toxicidad y baja biodisponibilidad (Xu, Berastegui-Cabrera, Chen, et al., 2020; Xu, Shi, et al., 2020). Es por ello que, como alternativa, se ha propuesto el desarrollo de compuestos derivados de éste, con el objetivo de identificar moléculas que mantengan su actividad antiviral pero mejorando su perfil farmacocinético y seguridad. En estudios anteriores, (Xu et al., 2021; Xu, Berastegui-Cabrera, Ye, et al., 2020) muestran la actividad antiviral y citotoxicidad de una librería de compuestos derivados del niclosamida. A través de diferentes reacciones se obtienen los distintos fármacos utilizados para llevar a cabo estudios propios, como este proyecto en concreto. Tales compuestos muestran mejoras con respecto a la toxicidad y la actividad antiviral frente a adenovirus. Volviendo a la efectividad de tales compuestos frente a adenovirus, concretamente contra adenovirus humano 5 (HAdV-5) se demuestran que los derivados entre los que se demuestra mayor potencial antiviral, encontramos 5-Chloro-N-(3-fluoro-5-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide (JMX0312), obtenido a partir de una conjugación con un grupo atractor de electrones, o tert-Butyl 4-(((3-chloro-4-(5-chloro-2-hydroxybenzamido)-phenyl)amino)methyl)piperidine-1-carboxylate (JMX0461), el cual se obtiene a partir de la introducción de un “linker” para α -aminoácidos (Xu, Berastegui-Cabrera, Chen, *et al.*, 2020; Xu, Berastegui-Cabrera, Ye, *et al.*, 2020). En estudios posteriores del mismo grupo se descubre un nuevo derivado 5-Chloro-N-(cyclohexylmethyl)-2-hydroxybenzamide (JMX0493), a través de la condensación del ácido 5-cloro-2-hidroxibenzoico con 5-ciclohexilmetanamina. Éste demuestra un mayor índice de selectividad que los anteriores e inhibe la salida del endosoma de las partículas virales (Xu et al., 2021).

Para la obtención de posteriores compuestos se parte de la reducción de la niclosamida y una posterior n-acetilación o n-alquilación (Xu, Berastegui-Cabrera, Chen, et al., 2020).

2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente existe una deficiencia de fármacos para el tratamiento de las infecciones por HCMV, debido fundamentalmente a las resistencias virales que generan las alternativas terapéuticas disponibles y su elevada toxicidad, especialmente en la población inmunosuprimida, la más susceptible a la infección y enfermedad por HCMV.

La niclosamida ha demostrado ser eficaz frente a virus tales como HAdV5, SARS-CoV-2... Sin embargo, debido a la toxicidad y sus características farmacocinéticas adversas dificulta el desarrollo clínico.

En base a estos estudios, se planteó un proyecto para este estudio de una biblioteca de derivados de niclosamida, entre los cuales se encuentran los anteriormente comentados y estudiados como JMX0312, JMX0281 con la adición de 11 nuevos compuestos sintetizados a partir de la N-acetilación, con el fin de evaluar su actividad frente HCMV.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto es evaluar la actividad antiviral de los derivados de niclosamida seleccionados por su actividad anti-HAdV, frente al HCMV.

Para ello se plantearon dos objetivos específicos:

1. Estudiar la citotoxicidad *in vitro* de los compuestos derivados de niclosamida en células HFF-1, utilizadas para la evaluación de su actividad anti-HCMV.
2. Evaluar la actividad anti-HCMV de la librería de compuestos desarrollados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Compuestos derivados de niclosamida

Para este estudio se han seleccionado 13 derivados de niclosamida (**Tabla 2**) ya evaluados previamente frente a HAdV (Xu et al., 2021; Xu, Berastegui-Cabrera, Ye, et al., 2020).

Estos compuestos fueron diseñados y sintetizados por el laboratorio del Prof. Jia Zhou, del Departamento de Farmacología y Toxicología de la University of Texas Medical Branch (Galveston, Texas, USA). Todos ellos, se proporcionaron en polvo valorado, fueron resuspendidos en 1 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich) y se almacenaron a -

20°C hasta su utilización. Las diluciones para los ensayos de actividad antiviral se realizaron en DMSO.

Tabla 2. Resumen de derivados de niclosamida evaluados

Código	Descripción
JMX0940	5-Chloro-N-(2-fluoro-4-nitrophenyl)-2-hydroxybenzamide
JMX0895	5-Chloro-2-hydroxy-N-(4-nitrophenyl)benzamide
JMX0308	5-Chloro-N-(2-chloro-4-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide
JMX0312	5-Chloro-N-(3-fluoro-5-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide
JMX0887	4-Chloro-N-(3-fluoro-5-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide
JMX0281	(S)-5-chloro-N-(1-((2-chloro-4-nitrophenyl)amino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-2-hydroxybenzamide
JMX0285	(R)-5-Chloro-N-(1-((2-chloro-4-nitrophenyl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)-2-hydroxybenzamide
JMX0673	5-Chloro-N-((2S,3R)-1-((2-chloro-4-nitrophenyl)amino)-3-methyl-1-oxopentan-2-yl)-2-hydroxybenzamide
JMX0461	tert-Butyl 4-(((3-chloro-4-(5-chloro-2-hydroxybenzamido)-phenyl)amino)methyl)piperidine-1-carboxylate
JMX0493	5-Chloro-N-(cyclohexylmethyl)-2-hydroxybenzamide
NY0611	5-Chloro-N-(2-chloro-4-((4-Hydroxy-2-methylbutan-2-yl)amino)phenyl)-2-hydroxybenzamide
NY0624	5-Chloro-N-(2-chloro-4-(cyclopentylamino)phenyl)-2-hydroxybenzamide
JMX0464	5-Chloro-N-(2-chloro-4-(((6-hydroxypyridin-3-yl)methyl)amino)phenyl)-2-hydroxybenzamide

4.2 Línea celular y virus

La línea celular HFF-1 de fibroblastos de piel humana (*Human Foreskin Fibroblasts*) fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), y cultivada en Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Thermo Fisher) suplementado con un 10% de

suero fetal bovino (FBS), HEPES a 10 mM, L-glutamina a 4 mM, 100 unidades/mL de penicilina/estreptomicina a 100µg/mL y 0,1 mM de aminoácidos no esenciales (DMEM completo) (Xu, 2020; Xu, 2021).

Las cepas de citomegalovirus humano (HCMV) utilizadas fueron la cepa AD-169, obtenida de la ATCC, y el HCMV-GFP, cedido por Dai Wang (Wang & Shenk, 2005), el cual se obtiene al sustituir una región adyacente a la de la proteína del tegumento asociada a la cápside (pUL32) en el genoma por la proteína eGFP.

4.3 Propagación y purificación viral

La propagación de las cepas de HCMV fue realizada en el laboratorio mediante la infección de un cultivo de células HFF al 80% de confluencia en placas de Petri ($\sim 1 \cdot 10^6$ células/placa) tratadas para cultivo celular, a una multiplicidad de infección (MOI, *multiplicity of infection*) de 0,05 partículas virales/célula.

Tras una incubación de 1 h en agitación a 37°C se retiró el medio para sustituirlo por medio sin virus, y se dejó de 6-8 días a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂, para permitir al virus completar su ciclo replicativo. La progenie se recogió cuando el 100% de las células presentaron efecto citopático. Entonces, el medio se centrifugó a 3000 rpm a 4°C durante 5 minutos para eliminar los restos celulares, y se alicuotó y guardó a -80°C para su conservación a largo plazo (Britt,2010).

4.4 Titulación viral

Para conocer la concentración viral del stock generado se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

En una placa de ensayo realizado en placas negras de 96 pocillos de fondo plano y transparente con $2 \cdot 10^6$ células HFF/placa, se añadieron diluciones seriadas 1:2 del stock de HCMV a lo largo de 11 pocillos, dejando el último pocillo como control negativo sin infectar. Cada titulación se realiza por triplicado. Tras un periodo de incubación de 48 h a 37°C y 5% de CO₂, se observa la fluorescencia generada por la proteína GFP del virus en el microscopio de fluorescencia Olympus Invertido® en el canal de FITC, en el caso de HCMV-GFP. En cuanto al AD-169, tras las 48 horas de incubación, se observará el efecto citopático de las células HFF sembradas. En ambos casos se calculó la concentración de virus necesaria para infectar al 50% (TCID₅₀) mediante el método de Reed y Muench, y los resultados se expresaron en unidades formadoras

de placa por mL (PFU/ml) (Reed & Muench, 1938). Finalmente, se obtuvo un stock de $1 \cdot 10^5$ unidades formadoras de placas (PFU/ μ l), para ambos virus.

4.5 Citotoxicidad de los compuestos

Para comprobar la concentración a la que los compuestos derivados de niclosamida eran citotóxicos en un 50%, es decir, para obtener la concentración que causa el 50% de muerte celular (CC_{50}), se lleva a cabo un ensayo de citotoxicidad utilizando el kit comercial AlamarBlue Cell Viability Assay (Invitrogen; Thermo Fisher, MA, USA). Para ello se sembraron en una placa de 96 pocillos negra, de fondo plano y transparente, $2 \cdot 10^6$ células HFF y se incubaron durante 24 h a 37°C y 5% de CO_2 . Al día siguiente, se añadieron concentraciones decrecientes de cada compuesto, concretamente: 200 μM , 150 μM , 100 μM , 80 μM , 60 μM , 40 μM , 30 μM , 20 μM , 10 μM , 5 μM y 2,5 μM . Además, se preparó un control negativo, al que se le añadió el mismo volumen de DMSO que se utiliza en los pocillos tratados con los derivados. Tanto los compuestos, diluidos en DMSO, como el control negativo, no deben tener un volumen de este superior al 10%, siendo ideal el 1%, para evitar la citotoxicidad propia del DMSO. Este experimento se realiza por duplicado.

Tras sembrar las células junto con los compuestos, se dejan incubar durante 48 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Una vez pasado este periodo de tiempo, se añade el reactivo de AlamarBlue Cell Viability Assay (Invitrogen; Thermo Fisher, MA, USA) al 10% en DMEM completo. Este reactivo, a una concentración de 1x, diluido en medio DMEM completo, sufre un cambio de color por el metabolismo celular, generando también fluorescencia tras una incubación de 3 h a 37°C y 5% de CO_2 . La fluorescencia se midió en el Typhoon FLA 9500® (GE Healthcare Life Sciences, MA, USA), con el filtro de emisión de 580BP30 nm. Los resultados de fluorescencia se cuantificaron con el software ImageQuant TL. La CC_{50} se calculó con el software GraphPad Prism 9 (Xu, 2020; Xu, 2021).

4.6 Cuantificación de HCMV en combinación con los derivados de Niclosamida, mediante PCR a tiempo real (rtPCR)

Para el estudio de la actividad antiviral de los derivados de niclosamida frente a HCMV, se sembraron $2 \cdot 10^6$ células HFF en placas de 24 pocillos y se infectaron con HCMV a una MOI de 0,05 pv/célula, en 500 μL de DMEM completo, en combinación con diferentes concentraciones de los compuestos estudiados. Se añadió, además, un control positivo, en el que se añade el mismo volumen de DMSO, y un control negativo sin infectar (Xu, 2020; Xu, 2021).

Para cada fármaco se realizaron diluciones seriadas 1:2 partiendo de la concentración inhibitoria media obtenida previamente para HAdV5. Para cada fármaco se realizan dos réplicas. (Xu, 2020). Tras un período de incubación de 72 h a 37°C y 5% de CO₂, se recogieron las células con tripsina, se centrifugan a 4000 rpm a 4°C durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante.

Para la extracción y purificación del material genético se utilizó el kit comercial E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit, siguiendo las indicaciones del fabricante. Con el material genético extraído, se realizó una RT-PCR para cuantificar el ADN de HCMV, el número de genomas generadas en cada condición. Los primers TaqMan y las sondas se diseñaron para una región del gen US28 de HCMV, mediante el software GenSript. Las secuencias de los oligonucleótidos fueron:

CMV-F, 5'-TCTACGTGGCTATGTTTGCC-3'

CMV-R, 5'-GGCCGATATCTCATGTAAACAA-3'

CMV-S, 5'-CACGGAGATTGCACTCGATCGC-3'

Las condiciones para llevar a cabo la RT- PCR consistieron en 10 µL de ADN purificado, 0,25 µL del primer Forward (CMV-F) a 1/10, 0,75 µL del primer Reverse (CMV-R) a 1/10, 0,25 µL de la sonda (CMV-S) a 1/10 y 12,5 µL de la FastGene 2x PROBE Universal qPCR Master Mix (NIPPON Genetics), por reacción, hasta un volumen final de 15 µL.

Se utilizan, como control interno, oligonucleótidos complementarios al gen de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa humana (GAPDH), utilizando las mismas condiciones previamente mencionadas.

El programa de PCR fue 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos y 58°C durante 60 segundos. Éste se lleva a cabo en el sistema LightCycler 96 (Roche Life Science, USA) (Mazzotta, 2020; Xu, 2020; Xu, 2021).

Concentraciones conocidas de ambos genes se utilizaron para crear una curva patrón en paralelo para cada experimento. Con los resultados obtenidos en el ensayo se realiza una extrapolación a estas curvas. A continuación, se realiza una normalización entre ambos datos: se obtendrá la cantidad de copias de ADN del virus en relación con la cantidad de copias de ADN del gen GAPDH (Mazzotta, 2020; Xu, 2020; Xu, 2021). La ecuación que se utilizó fue la siguiente:

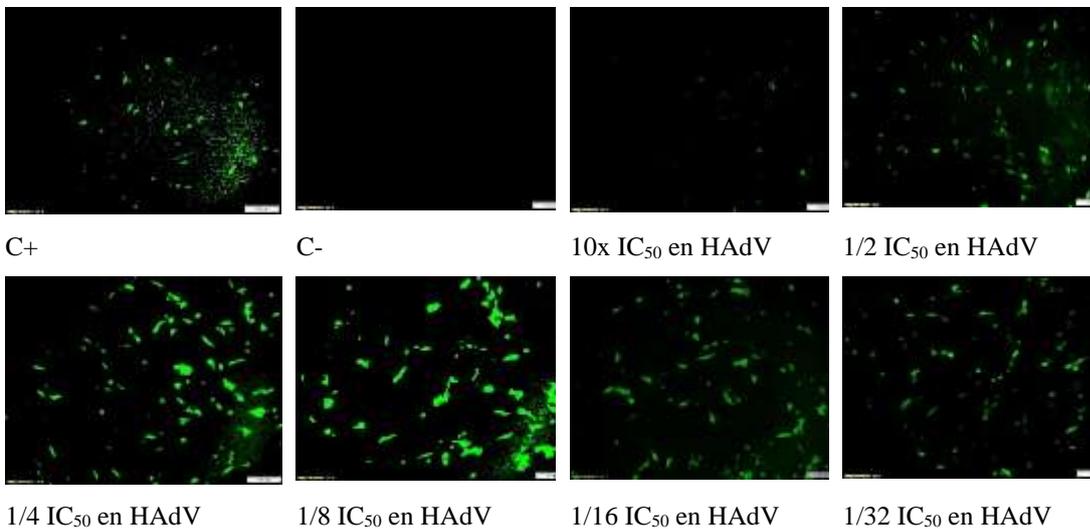
$$\% \text{ HCMV} = \frac{\text{copias de ADN de HCMV}}{\text{copias de ADN de GAPDH}} \times 100$$

4.7 Cuantificación de HCMV-GFP en combinación con los derivados de niclosamida mediante fluorescencia

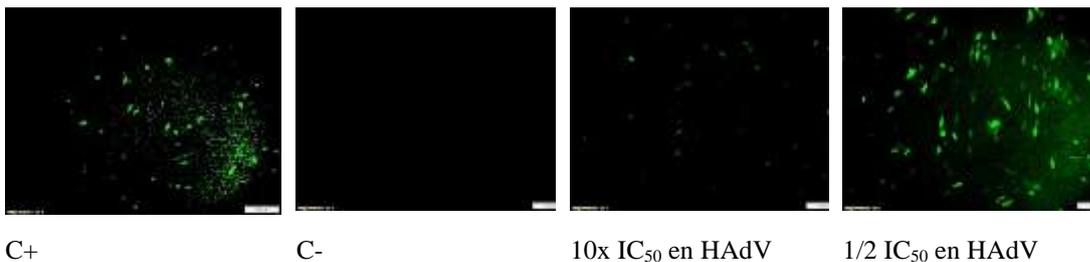
La cuantificación de HCMV-GFP se realiza en placas de 96 pocillos, sembradas con $2 \cdot 10^6$ células HFF, a las que añadimos una MOI de 100 pv/célula de HCMV-GFP y se van añadiendo concentraciones decrecientes 1:2 de molécula, partiendo nuevamente de la IC_{50} para HAdV5. Además, para la cuantificación de HCMV-GFP, realizamos una curva en la que se infecta a concentraciones decrecientes, partiendo de la concentración del stock de virus que se utilice, para poder interpolar nuestros resultados en concentraciones virales conocidas. Tendremos también un control negativo, el cual no se infecta con virus, y un control positivo a la misma concentración que el experimento. Para cada compuesto estudiado se realizaron tres réplicas.

Tras el periodo de incubación de 72 h a $37^{\circ}C$ y 5% de CO_2 se comprueban los resultados en el microscopio Olympus Invertido®, en el canal de FITC. Cada imagen tomada en el microscopio es procesada en el software ImageJ2 (Fiji). Para cada imagen se toman los puntos de fluorescencia y se convierten a porcentaje de HCMV-GFP y, por tanto, a porcentaje de infección viral. Cada imagen corresponde a una concentración diferente de compuesto.

A



B



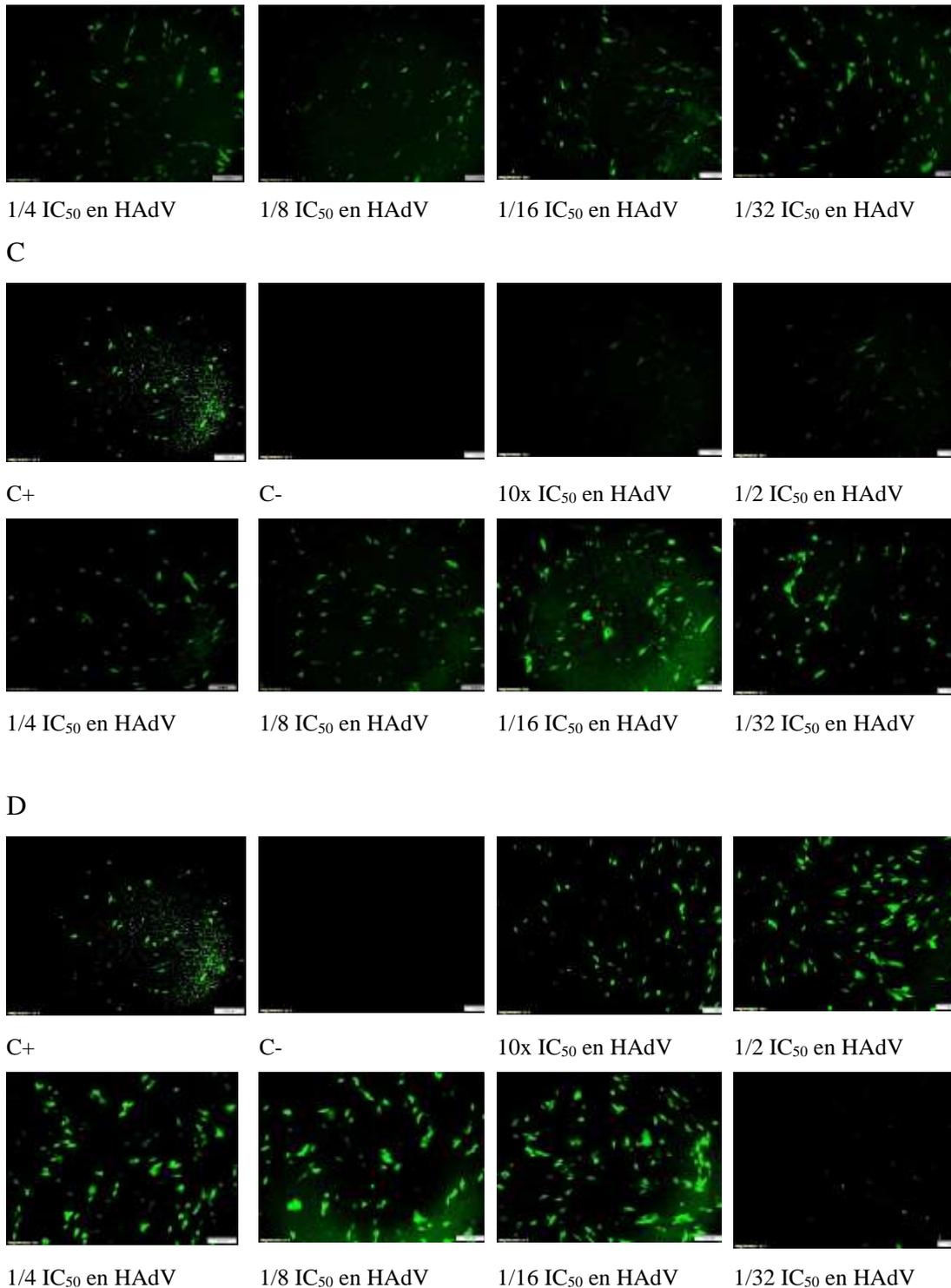


Figura Anexa. Imágenes de microscopía de fluorescencia tras infección con HCMV-GFP. A. JMX0940 B. JMX0895 C. JMX0312 D. JMX0285.

4.8 Análisis estadístico

Para los experimentos anteriores, la normalización y extrapolación de datos se realizaron en GraphPad Prism 9 y Microsoft Excel. En el caso del cálculo de concentraciones medias se realizan en GraphPad Prism 9. Todos los experimentos se han realizado por triplicado. En las

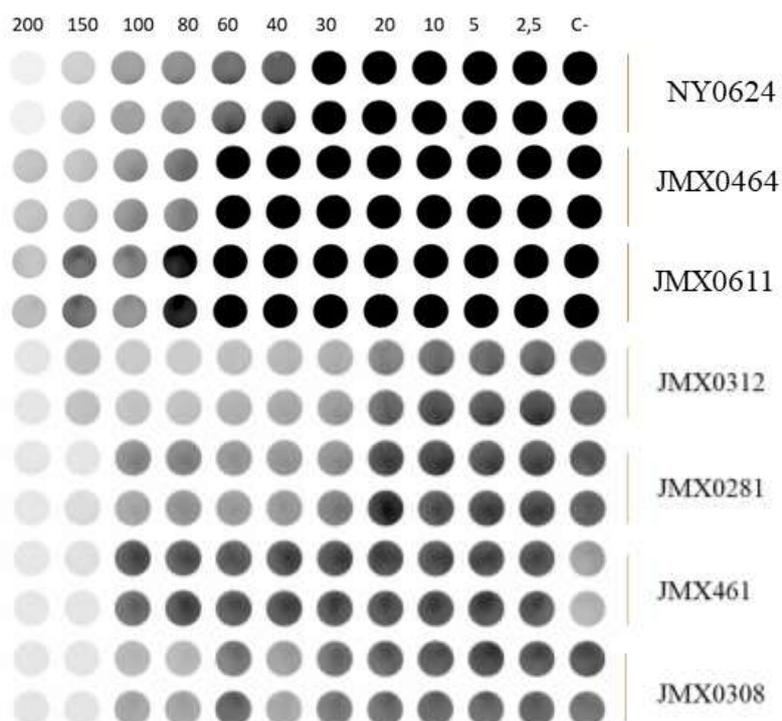
gráficas se representan los valores de la media de las tres réplicas y las barras de error corresponden a la desviación típica de las réplicas. Para el análisis de los datos y la representación gráfica de los mismos se ha utilizado el software GraphPad Prism.

5. RESULTADOS

5.1 Citotoxicidad de los compuestos

La **Figura 7** muestra los estudios realizados para determinar la CC_{50} de los derivados evaluados, cuyos valores se muestran en la **Tabla 3**. Para el compuesto JMX0461 no se obtiene un resultado de CC_{50} al analizar informáticamente los datos de fluorescencia obtenidos en Typhoon FLA 9500, por lo que se establece como una concentración superior a la mayor utilizada en el estudio. Para todos los compuestos estudiados se ve un gradiente de citotoxicidad en las placas del ensayo.

Los compuestos muestran un rango de citotoxicidad bastante amplio, ya que tratamos con concentraciones próximas a $10\ \mu\text{M}$ en el caso de JMX0312 y de baja citotoxicidad ($CC_{50} = 176,62\ \mu\text{M}$) para el derivado JMX0673. Los demás compuestos se encuentran en un rango intermedio entre 30 y $90\ \mu\text{M}$. Ninguno de los valores obtenidos interfiere en ensayos posteriormente realizados ya que se utilizan concentraciones de los diferentes derivados inferiores a las resultantes en CC_{50} .



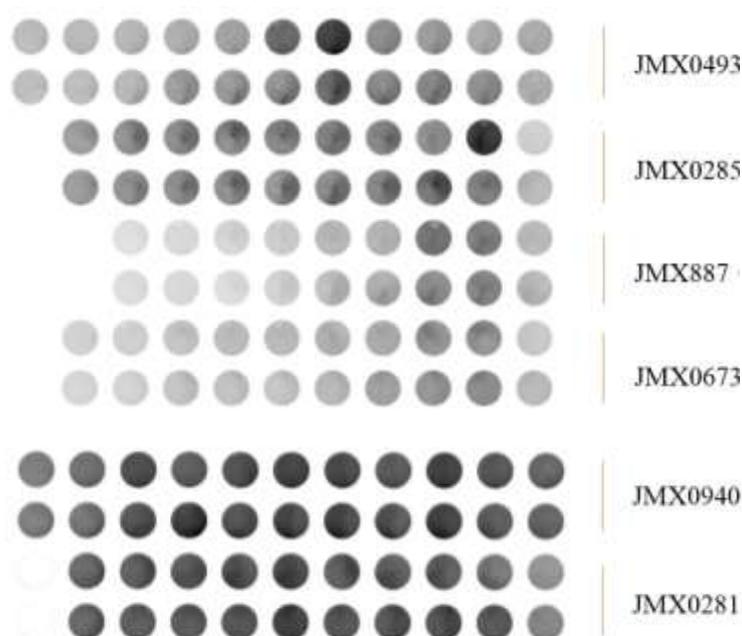


Figura 7. Resultados de prueba de citotoxicidad media. De izquierda a derecha las concentraciones utilizadas de cada compuesto fueron 200 μM , 150 μM , 100 μM , 80 μM , 60 μM , 40 μM , 30 μM , 20 μM , 10 μM , 5 μM y 2,5 μM . La última columna corresponde al control negativo sin fármaco. Imagen obtenida a partir de Typhoon FLA 9500.

Tabla 3. Citotoxicidad de los compuestos.

Compuestos	CC ₅₀ (μM) (media y desviación)
JMX0940	31,71
JMX0895	35,11
JMX0308	60,14 \pm 3,7
JMX0312	9,8 \pm 0,2
JMX0887	43,28 \pm 2,41
JMX0281	60 \pm 0,85
JMX0285	46,72
JMX0673	176,62
JMX0461	>80
JMX0493	90 \pm 1,79
NY0611	95,36 \pm 3,25
NY0624	67,96 \pm 1,55
JMX0464	72,21 \pm 9,9

5.2 Obtención de Concentración Inhibitoria 50% mediante PCR (CI₅₀)

La actividad de los derivados de niclosamida se evaluó mediante la determinación de su concentración inhibitoria al 50%, que es aquella concentración que inhibe la infectividad viral en el 50% de las células. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 8** y la **Tabla 4**.

En el ensayo, la mayor concentración de la que se parte corresponde al valor de CI₅₀ obtenido para cada compuesto en estudios con HAdV-5 (Xu, Berastegui-Cabrera, Ye, et al., 2020).

Para ocho de los compuestos evaluados se observa una disminución en las copias de HCMV (% HCMV) a medida que se aumenta la concentración de fármaco. Los cinco compuestos que presentaron mayor actividad a concentraciones micromolares fueron JMX0895, JMX0285, JMX0940, JMX0493 y JMX0312. Para este último compuesto se necesita seguir realizando diluciones para conseguir la concentración que inhiba al 50% de la progenie viral.

En referencia a los compuestos restantes JMX0461, JMX0308, JMX0673, JMX0281 y JMX0887 no se obtienen resultados satisfactorios en los primeros ensayos que se realizan (**Figura 8**), por lo que se siguen estudiando aquellos que muestran la tendencia inhibitoria que se busca en este estudio.

5.3 Concentración Inhibitoria 50% mediante fluorescencia (CI₅₀)

La actividad inhibidora de los derivados de niclosamida, en este caso medido mediante HCMV-GFP, se muestra en la **Tabla 5** y puede complementarse con **Figura 9**. Se prueba a obtener de otra forma el valor de CI₅₀ con los compuestos que mostraban mayor tendencia inhibitoria en los ensayos con HCMV AD-169 y se intenta obtener un valor de CI₅₀ para el compuesto JMX0312. Las concentraciones utilizadas se corresponden de nuevo a valores de CI₅₀ para cada compuesto probado anteriormente con HAdV-5 (Xu, Berastegui-Cabrera, Ye, et al., 2020).

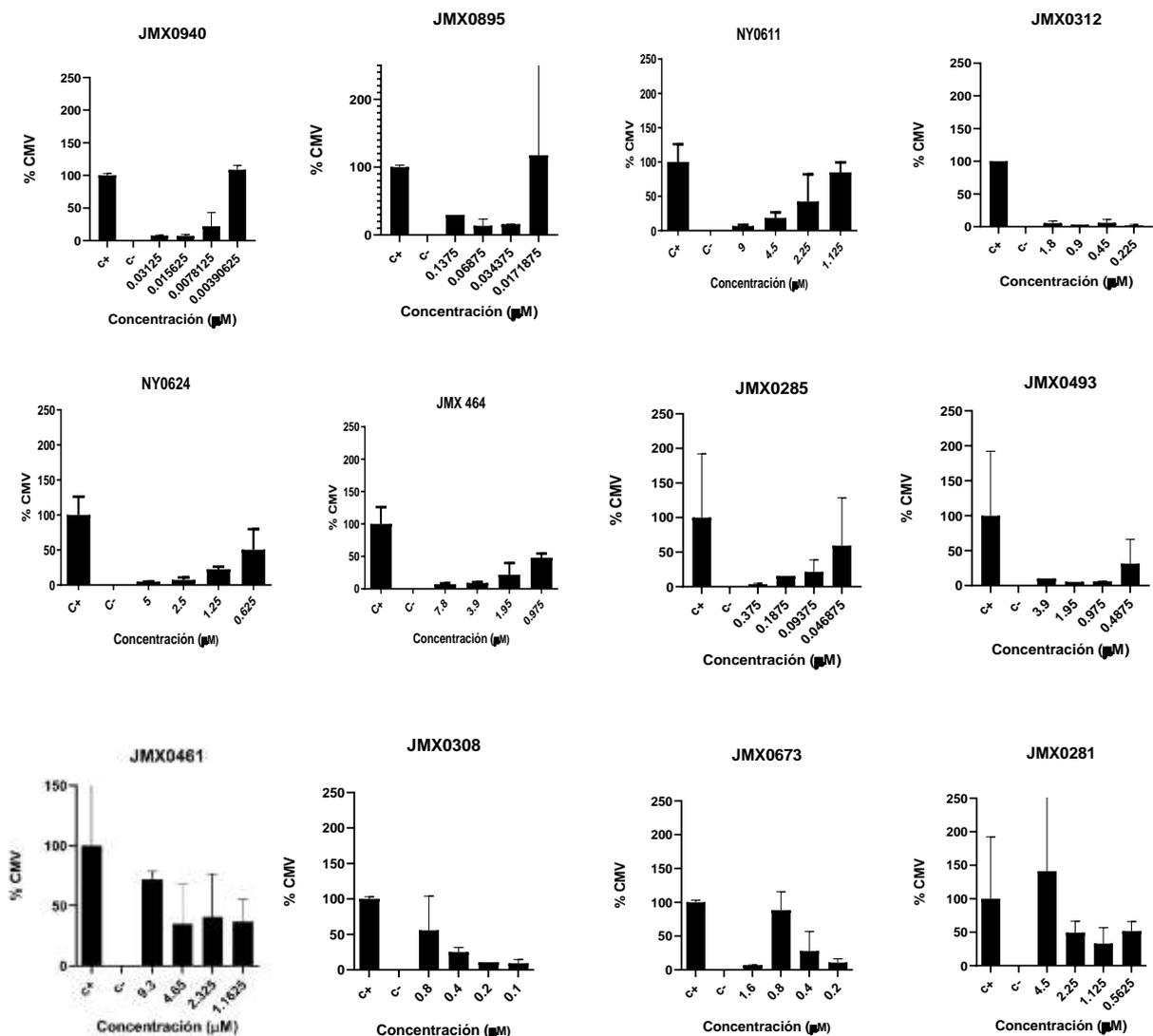
Se comprueba como todos siguen mostrando un aumento del porcentaje viral a medida que se disminuye la concentración del compuesto (**Figura 9**) y siguen manteniéndose todos los valores a nivel micromolar.

5.4 Índice de selectividad (IS)

A partir de los datos obtenidos de citotoxicidad (CC₅₀) y concentración inhibitoria (CI₅₀) se calculó el índice de selectividad (IS) de cada una de las moléculas evaluadas frente a HCMV AD-169 y HCMV-GFP, el cual nos da una idea de la especificidad de la molécula en cuestión

a la hora de inhibir la replicación del virus. Se define IS como el cociente entre la concentración citotóxica y la concentración inhibitoria (CC_{50}/CI_{50}). Los datos obtenidos se muestran en **Tabla 6**. Se observa que todas las concentraciones inhibitorias obtenidas son inferiores a las CC_{50} de dichos compuestos, lo cual apoya la especificidad de su actividad anti-HCMV, ya que, a mayor IS, mayor especificidad del compuesto.

Los derivados con mayor IS fueron JMX0940, JMX0895 y JMX0285 para la infección con HCMV *wild type* (wt). En el caso del ensayo con HCMV-GFP el orden de mayor a menor índice de selectividad fue JMX0285, JMX0940 y JMX0895.



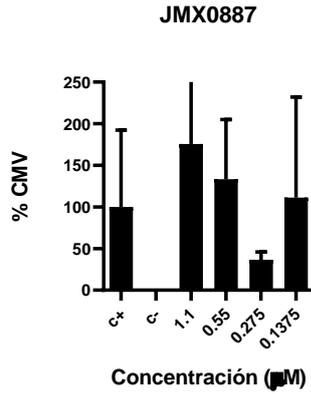


Figura 8. Porcentaje de HCMV frente a concentraciones de compuestos. Tras el ensayo con los trece compuestos los que se muestran en la figura son los que han proporcionado una mayor inhibición del número de copias del ADN del HCMV. Control positivo (C+) con mismo volumen de DMSO que en la prueba, y con un control negativo (C-) sin infectar.

Tabla 4. Concentración de inhibición media medidos con PCR

Compuestos	CI ₅₀ (µM)
JMX0940	0,005± 0,002
JMX0895	0,024
NY0611	2,086±0,089
JMX0312	<0,225
NY0624	0,627±0,005
JMX0464	0,932±0,004
JMX0285	0,05
JMX0493	0,21
JMX0461	nd
JMX0308	nd
JMX0673	nd
JMX0281	nd
JMX0887	nd

Tabla 5. Concentración de inhibición media medido con GFP

Compuestos	CI ₅₀ (µM)
JMX0940	0,205±0,05
JMX0285	0,299±0,16
JMX0895	0,711±0,47
JMX0312	0,321±0,03

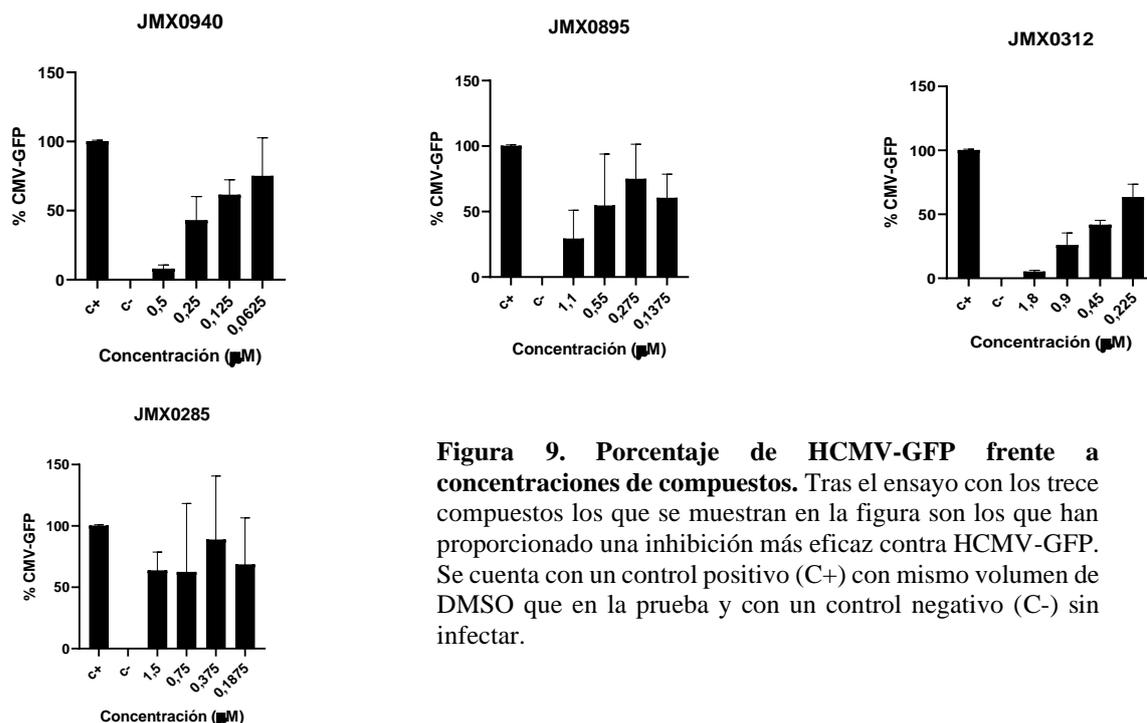


Figura 9. Porcentaje de HCMV-GFP frente a concentraciones de compuestos. Tras el ensayo con los trece compuestos los que se muestran en la figura son los que han proporcionado una inhibición más eficaz contra HCMV-GFP. Se cuenta con un control positivo (C+) con mismo volumen de DMSO que en la prueba y con un control negativo (C-) sin infectar.

Tabla 6. Índices de selectividad de compuestos obtenidos con HCMV wild type y HCMV-GFP

Compuestos	IS - PCR	IS - GFP
JMX0940	6342	154,7
JMX0895	1462,9	49,4
JMX0308	nd	nd
JMX0312	>43,6	30,5
JMX0887	nd	nd
JMX0281	nd	nd
JMX0285	934,4	156,3
JMX0673	nd	nd
JMX0461	nd	nd
JMX0493	428,6	nd
NY0611	45,7	nd
NY0624	108,4	nd

Tabla 7. Recopilación de datos obtenidos (CC₅₀, CI₅₀ con PCR, CI₅₀ con GFP y SI)

Compuestos	CC ₅₀ (μM) (media y desviación)	CI ₅₀ -PCR (μM)	CI ₅₀ -GFP (μM)	SI - PCR	SI - GFP
JMX0940	31,71	0,005 ± 0,002	0,21±0,05	6342	154,68
JMX0895	35,11	0,024	0,71±0,47	1462,92	49,38
JMX0308	60,14 ± 3,7	nd	nd	nd	nd
JMX0312	9,8 ± 0,2	<0,23	0,32±0,03	>43,56	30,53
JMX0887	43,28 ± 2,41	nd	nd	nd	nd

JMX0281	60 ± 0,85	nd	nd	nd	nd
JMX0285	46,72	0,05	0,3±0,16	934,4	156,25
JMX0673	176,62	nd	nd	nd	nd
JMX0461	>80	nd	nd	nd	nd
JMX0493	90 ± 1,79	0,21	nd	428,57	nd
NY0611	95,36 ± 3,25	2,086±0,09	nd	45,71	nd
NY0624	67,96 ± 1,55	0,627±0,005	nd	108,39	nd
JMX0464	72,21 ± 9,9	0,932±0,004	nd	77,48	nd

6. DISCUSIÓN

Con este estudio se demuestra que los derivados de niclosamida evaluados representan una potencial alternativa para el desarrollo de fármacos anti-HCMV. Tras realizar ensayos de citotoxicidad y de actividad inhibitoria de una biblioteca de derivados, a partir de n-acetilación y n-alkilación de la niclosamida, se han obtenido unos valores de citotoxicidad menores y muestran mayor actividad que la propia niclosamida, algo que también se demuestra en estudios anteriores realizados con HAdV (Xu et al., 2021; Xu, Berastegui-Cabrera, Ye, et al., 2020). Estos muestran un índice de selectividad relativamente alto, lo que apoya el seguimiento de estudio de tales compuestos.

En el caso de los estudios de citotoxicidad, se obtienen valores de CC₅₀ superiores a las concentraciones más altas que se van a utilizar es los posteriores estudios por lo que no es necesario descartar ningún dato. Además, se obtienen concentraciones citotóxicas superiores a la obtenida con niclosamida (4,94 ± 0,65) en células HFF-1, concluyendo que son menos tóxicos.

Al centrarnos en los resultados de CI₅₀, los cuales se inician con valores de CI₅₀ anteriormente probadas en Adenovirus humano (HAdV) (Xu, Berastegui-Cabrera, Ye, et al., 2020) vemos que varios compuestos analizados mediante PCR muestran datos inferiores a los obtenidos con HAdV. Los datos no disponibles corresponden a compuestos que no mostraron una actividad inhibitoria concentración dependiente, ya que el porcentaje de HCMV no iba aumentando a medida que se disminuye la concentración de la molécula en cuestión. No obstante, observando las figuras, se llega a nivel nanomolar para algunos compuestos aun no alcanzando los niveles de inhibición deseados. En tres de los compuestos (JMX0461, JMX0308, JMX0281) se llega a ver un resultado totalmente contrario al que se busca, en el que las copias de virus disminuyen a medida que se disminuye la concentración de fármaco, pudiendo implicar que los compuestos

potencian la infección. No obstante, no se puede concretar tal idea sin estudios posteriores. En este apartado vemos que entre los compuestos de menor CI_{50} encontramos a JMX0940, JMX0895, JMX0285 y JMX0493, encontrándose todos en concentraciones de nanomolar. La CI_{50} de estos compuestos fue de 0,005 μ M; 0,024 μ M, 0,05 μ M y 0,21 μ M, respectivamente. Teniendo en cuenta estos datos, se llevaron a cabo ensayos para confirmar esta actividad utilizando HCMV-GFP. En los que se obtuvo una concentración mayor que frente HCMV wild type, sin embargo, todas ellas siguen siendo inferiores que la CC_{50} , por lo que se calculó el IS. Se obtienen datos que son un tanto divergentes con los obtenidos en PCR. Podría deberse al tipo de estudio con un virus que no realiza su ciclo de infección completo.

Ahora bien, para comprobar si tales compuestos pueden utilizarse o no como base para el desarrollo de diferentes moléculas, puede calcularse como dato adicional los índices de selectividad (IS) para cada compuesto para apoyar los resultados anteriormente obtenidos. Se requerirán compuestos de alta CC_{50} y de baja IC_{50} . Los compuestos con mayor IS serán más específicos a la hora de inhibir la infección de HCMV. El que muestra mejor IS es el compuesto JMX0940 (IS=6342), seguido de JMX0895 (IS=1462,92) y JMX0285 (IS=934,40). Todos estos valores son relativamente altos sugiriendo una alta capacidad antiviral. Es interesante como ninguno de los derivados que fueron seleccionados en proyectos anteriores (Xu et al., 2021; Xu, Berastegui-Cabrera, Ye, et al., 2020) ha resultado ser efectivo en este. Sin embargo, el compuesto JMX0493, el cual mostraba un alto IS en tales estudios (Xu et al., 2021) sigue mostrando un alto valor en este proyecto (SI=428,57), pero no se encuentra entre los tres primeros en orden de efectividad.

Aun siendo un valor relativo cabe destacar que los valores obtenidos para los IS son significativamente más altos que los obtenidos en artículos anteriores para HAdV (Marrugal-Lorenzo et al., 2019; Xu et al., 2021; Xu, Berastegui-Cabrera, Chen, et al., 2020; Xu, Berastegui-Cabrera, Ye, et al., 2020). Esta diversidad puede deberse al diferente tipo de ensayos utilizados para determinar la actividad antiviral, siempre teniendo en cuenta las diferencias inherentes en la evaluación de dos especies virales distintas.

Tras la evaluación de los derivados de niclosamida seleccionados, y comprobar su capacidad antiviral contra HCMV, el derivado JMX0940 es el que muestra mejor IS entre todos los analizados (SI >1000) y por tanto el que muestra mayor especificidad frente a HCMV. En estudios futuros se propone seguir estudiando estos derivados para dilucidar su mecanismo de acción en la infección de HCMV. Con esto se podrá concretar si estas moléculas cumplen los

objetivos de la búsqueda de antivirales, la cual se basa en dos aspectos fundamentales: identificar moléculas con eficacia a la hora de inhibir la replicación viral y que éstas sean seguras para las células evaluadas (Agut, 2022). Por el momento, se ha comprobado que *in vitro* muestran baja toxicidad, menor en cualquier caso que la niclosamida, una alta capacidad inhibitoria y presentan actividad frente a otros virus, como es el caso del HAdV, lo que potencialmente les confiere una actividad de amplio espectro.

7. CONCLUSIONES

Enumerando las conclusiones tenemos que:

1. Los derivados de Niclosamida con menor citotoxicidad en células HFF fueron JMX0673, NY0611 y JMX0493.
2. Siete de los derivados estudiados presentaron actividad frente HCMV AD-169, a bajas concentraciones micromolares, siendo el de mayor actividad JMX0940.
3. La actividad frente HCMV-GFP de los derivados estudiados, fue menor que la obtenida frente al virus AD-169. No obstante, las concentraciones inhibitorias obtenidas se mantienen a nivel micromolar.
4. El derivado JMX-0940 fue el más efectivo frente HCMV, presentando una actividad inhibitoria de la replicación de HCMV a concentraciones de nanomolar y un índice de selectividad de 6342.

8. BIBLIOGRAFÍA

Britt, W. J. (2010). Human cytomegalovirus: propagation, quantification, and storage. *Current Protocols in Microbiology, Chapter 14(1), Unit 14E.3*. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc14e03s18>

AEP. (2020). *Foscarnet. Cmv*, 8–11.

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios Comunidad, Comunidad Autónoma de Andalucía, & Bermúdez Rodríguez, M. A. (2019). *Informe de Posicionamiento Terapéutico de letermovir reactivación del CMV y de la enfermedad causada por este virus en adultos seropositivos para el CMV [R +] receptores de un TCMH*. 1–7.

- Agut, H. (2022). Antivirales (a excepción del virus de la inmunodeficiencia humana y la hepatitis). *EMC - Tratado de Medicina*, 26(2), 1–10. [https://doi.org/10.1016/s1636-5410\(22\)46453-1](https://doi.org/10.1016/s1636-5410(22)46453-1)
- Andrews, P., Thyssen, J., & Lorke, D. (1983). THE BIOLOGY AND TOXICOLOGY OF MOLLUSCICIDES , 3 OH Cl . 3 '. *World Health*, 19.
- Chen, S. J., Wang, S. C., & Chen, Y. C. (2022). Challenges, Recent Advances and Perspectives in the Treatment of Human Cytomegalovirus Infections. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 7(12), 1–15. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7120439>
- Chen, S., & Wang, S. (2019). *Antiviral Agents as Therapeutic Strategies Against*. 1–11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7019738/>
- Connolly, S. A., Jardetzky, T. S., & Longnecker, R. (2021). The structural basis of herpesvirus entry. *Nature Reviews Microbiology*, 19(2), 110–121. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00448-w>
- El Helou, G., & Razonable, R. R. (2019). Letemovir for the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients: An evidence-based review. *Infection and Drug Resistance*, 12, 1481–1491. <https://doi.org/10.2147/IDR.S180908>
- Griffiths, P., & Reeves, M. (2021). Pathogenesis of human cytomegalovirus in the immunocompromised host. *Nature Reviews Microbiology*, 19(12), 759–773. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00582-z>
- Gugliesi, F., Coscia, A., Griffante, G., Galitska, G., Pasquero, S., Albano, C., & Biolatti, M. (2020). Where do we stand after decades of studying human cytomegalovirus? *Microorganisms*, 8(5), 1–30. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050685>
- He, X. G., Li, M. L., Ye, W. C., & Zhou, W. (2021). Discovery of degradable niclosamide derivatives able to specially inhibit small cell lung cancer (SCLC). *Bioorganic Chemistry*, 107(December 2020), 104574. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104574>
- Isomura, H., & Stinski, M. F. (2003). The Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Enhancer Determines the Efficiency of Immediate-Early Gene Transcription and Viral Replication in Permissive Cells at Low Multiplicity of Infection. *Journal of Virology*, 77(6), 3602–3614. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.6.3602-3614.2003>
- Jean Beltran, P. M., & Cristea, I. M. (2014). The life cycle and pathogenesis of human

- cytomegalovirus infection: Lessons from proteomics. In *Expert Review of Proteomics* (Vol. 11, Issue 6, pp. 697–711). Expert Reviews Ltd.
<https://doi.org/10.1586/14789450.2014.971116>
- Jurgeit, A., McDowell, R., Moese, S., Meldrum, E., Schwendener, R., & Greber, U. F. (2012). Niclosamide Is a Proton Carrier and Targets Acidic Endosomes with Broad Antiviral Effects. *PLoS Pathogens*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002976>
- Kopan, R. (2012). Notch signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(10), 1–4.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011213>
- Lawal, B., Tsai, S. K., Wu, A. T. H., & Huang, H. S. (2023). In silico study of novel niclosamide derivatives, SARS-CoV-2 nonstructural proteins catalytic residue-targeting small molecules drug candidates. *Arabian Journal of Chemistry*, 16(5), 104654.
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.104654>
- Li, Z., Brecher, M., Deng, Y. Q., Zhang, J., Sakamuru, S., Liu, B., Huang, R., Koetzner, C. A., Allen, C. A., Jones, S. A., Chen, H., Zhang, N. N., Tian, M., Gao, F., Lin, Q., Banavali, N., Zhou, J., Boles, N., Xia, M., ... Li, H. (2017). Existing drugs as broad-spectrum and potent inhibitors for Zika virus by targeting NS2B-NS3 interaction. *Cell Research*, 27(8), 1046–1064. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.88>
- MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Developmental Cell*, 17(1), 9–26.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>
- Marrugal-Lorenzo, J. A., Serna-Gallego, A., Berastegui-Cabrera, J., Pachón, J., & Sánchez-Céspedes, J. (2019). Repositioning salicylanilide anthelmintic drugs to treat adenovirus infections. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37290-3>
- Moynagh, P. N. (2005). The NF- κ B pathway. *Journal of Cell Science*, 118(20), 4589–4592.
<https://doi.org/10.1242/jcs.02579>
- Niclosamida*. (n.d.). <https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pediamecum/niclosamida>
- Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS. *American Journal of Epidemiology*, 27(3), 493–497.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
- Ryckman, B. J., Jarvis, M. A., Drummond, D. D., Nelson, J. A., & Johnson, D. C. (2006).

Human Cytomegalovirus Entry into Epithelial and Endothelial Cells Depends on Genes UL128 to UL150 and Occurs by Endocytosis and Low-pH Fusion. *Journal of Virology*, 80(2), 710–722. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.2.710-722.2006>

Sanbonmatsu Gámez, S., Pérez Ruiz, M., María, J., & Marí, N. (2014). Correo electrónico: josem.navarro.sspa@juntadeandalucia.es. In *Enferm Infecc Microbiol Clin* (Vol. 32). <http://zl.elsevier.esel04/11/2014.Copiaparausopersonal,seprohíbelatransmisióndeestedocumentoporqualquiermedioofomato>.

Summary, C. (n.d.-a). *PubChem CID 135398513 Structure*.

Summary, C. (n.d.-b). *PubChem CID 60613 Structure. Cmv*, 1–59.

Summary, C. (2020). *PubChem CID: 135398740 Structure*: 1–84.

Wang, D., & Shenk, T. (2005). Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50), 18153–18158. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509201102>

Weinbach, E. C., & Garbus, J. (1969). Mechanism of action of reagents that uncouple oxidative phosphorylation. *Nature*, 221(5185), 1016–1018. <https://doi.org/10.1038/2211016a0>

Wen, C. C., Kuo, Y. H., Jan, J. T., Liang, P. H., Wang, S. Y., Liu, H. G., Lee, C. K., Chang, S. T., Kuo, C. J., Lee, S. S., Hou, C. C., Hsiao, P. W., Chien, S. C., Shyur, L. F., & Yang, N. S. (2007). Specific plant terpenoids and lignoids possess potent antiviral activities against severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(17), 4087–4095. <https://doi.org/10.1021/jm070295s>

Wu, C. J., Jan, J. T., Chen, C. M., Hsieh, H. P., Hwang, D. R., Liu, H. W., Liu, C. Y., Huang, H. W., Chen, S. C., Hong, C. F., Lin, R. K., Chao, Y. S., & Hsu, J. T. A. (2004). Inhibition of severe acute respiratory syndrome coronavirus replication by niclosamide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), 2693–2696. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2693-2696.2004>

Xu, J., Berastegui-Cabrera, J., Carretero-Ledesma, M., Chen, H., Xue, Y., Wold, E. A., Pachón, J., Zhou, J., & Sánchez-Céspedes, J. (2021). Discovery of a small molecule inhibitor of human adenovirus capable of preventing escape from the endosome.

International Journal of Molecular Sciences, 22(4), 1–21.

<https://doi.org/10.3390/ijms22041617>

Xu, J., Berastegui-Cabrera, J., Chen, H., Pachón, J., Zhou, J., & Sánchez-Céspedes, J. (2020). Structure-Activity Relationship Studies on Diversified Salicylamide Derivatives as Potent Inhibitors of Human Adenovirus Infection. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(6), 3142–3160. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01950>

Xu, J., Berastegui-Cabrera, J., Ye, N., Carretero-Ledesma, M., Pachón-Díaz, J., Chen, H., Pachón-Ibáñez, M. E., Sánchez-Céspedes, J., & Zhou, J. (2020). Discovery of Novel Substituted N-(4-Amino-2-chlorophenyl)-5-chloro-2-hydroxybenzamide Analogues as Potent Human Adenovirus Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(21), 12830–12852. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01226>

Xu, J., Shi, P. Y., Li, H., & Zhou, J. (2020). Broad Spectrum Antiviral Agent Niclosamide and Its Therapeutic Potential. *ACS Infectious Diseases*, 6(5), 909–915. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00052>

Yurochko, A. D. (n.d.). *Human Cytomegalo-viruses Methods and Protocols Second Edition*. <http://www.springer.com/series/7651>