



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

**El cannabidiol como antiviral de amplio espectro:  
exploración de su efecto sobre las membranas celulares**

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de  
Buenos Aires en el área Química Biológica

**Bioq. Agustina Belén Marquez**

Directora: **Dra. Cybele García**

Co-directora: **Dra. Agustina Alaimo**

Consejero de estudios: **Dr. Carlos Bueno**

Lugar de trabajo: **Laboratorio de Estrategias Antivirales, Departamento de  
Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad  
de Buenos Aires.**

Buenos Aires, 19 de agosto de 2025

## RESUMEN

El desarrollo de antivirales de amplio espectro constituye un objetivo estratégico frente a enfermedades infecciosas emergentes y desatendidas, como la infección por el virus Zika (ZIKV), para la cual no existen tratamientos específicos. En este contexto, se evaluaron compuestos naturales con capacidad para modular procesos celulares conservados, mediante un abordaje combinado *in silico* e *in vitro* centrado en el receptor de hidrocarburos de arilo (AHR), un factor de transcripción con función proviral. La vitamina A y el cannabidiol (CBD) presentaron alta afinidad por AHR. La vitamina A demostró actividad antiviral contra el ZIKV y capacidad para modular negativamente la expresión de genes asociados a la vía de señalización de AHR. El CBD, por su parte, actuó como modulador selectivo del receptor, mostrando una actividad dependiente del contexto celular, e indujo una respuesta inmunomoduladora parcial. No obstante, estos efectos no explicaron completamente su mecanismo antiviral.

Estudios posteriores demostraron que el CBD interfiere en múltiples etapas del ciclo replicativo del ZIKV y presenta actividad antiviral frente a virus estructuralmente disímiles, lo que respalda su perfil de amplio espectro. Experimentos con modelos de bicapas lipídicas y células vivas evidenciaron que el CBD modifica el orden lipídico de manera regionalizada, con efectos diferenciales según la localización subcelular, sin comprometer la integridad global de las membranas. Asimismo, se observó una disminución del colesterol intracelular y un aumento en la señal de glicoconjugados de membrana en células infectadas con ZIKV, junto con alteraciones morfológicas en viriones purificados.

Con el propósito de mejorar sus propiedades farmacológicas, se diseñaron y desarrollaron nanopartículas poliméricas (NP-PLGA) y lipídicas (niosomas, NIO) formuladas con CBD como principio activo. Las NP-PLGA no mejoraron la eficacia del CBD; sin embargo, los NIO potenciaron significativamente su actividad antiviral.

En conjunto, los resultados posicionan al CBD como un antiviral de amplio espectro, cuyo mecanismo de acción se asocia a la reorganización de membranas celulares, y destacan a los NIO como una estrategia de vehiculización prometedora para optimizar su aplicación terapéutica.

**Palabras clave:** cannabidiol, virus Zika, antiviral de amplio espectro, membranas celulares, nanopartículas.

## ABSTRACT

### Cannabidiol as a broad-spectrum antiviral: exploration of its effect on cellular membranes

The development of broad-spectrum antiviral agents constitutes a strategic objective in the context of emerging and neglected infectious diseases, such as Zika virus (ZIKV) infection, for which no specific treatments are currently available. Within this framework, natural compounds capable of modulating conserved cellular processes were evaluated using a combined *in silico* and *in vitro* approach focused on the aryl hydrocarbon receptor (AHR), a transcription factor with known proviral activity. Vitamin A and cannabidiol (CBD) exhibited high binding affinity for AHR. Vitamin A demonstrated antiviral activity and was able to negatively modulate the expression of genes involved in AHR signalling. CBD, in turn, acted as a selective modulator of the receptor, displaying context-dependent activity and eliciting a partial immunomodulatory response. However, these effects did not fully account for its antiviral mechanism.

Subsequent studies demonstrated that CBD interferes with multiple stages of the ZIKV replication cycle and exhibits antiviral activity against structurally diverse viruses, supporting its broad-spectrum profile. Experiments using lipid bilayer models and live cells showed that CBD modifies lipid order in a region-specific manner, with differential effects depending on subcellular localization, without compromising overall membrane integrity. In addition, a decrease in intracellular cholesterol and an increase in membrane-associated glycoconjugate signals were observed in ZIKV-infected cells, along with morphological alterations in purified virions.

To improve its pharmacological properties, polymeric (NP-PLGA) and lipid-based (niosomes, NIO) nanoparticles formulated with CBD as the active compound were designed and developed. NP-PLGA did not enhance CBD efficacy; however, NIO significantly boosted its antiviral activity.

Collectively, these findings position CBD as a broad-spectrum antiviral agent, with a mechanism of action associated with cellular membrane reorganisation and highlight NIO as a promising drug delivery strategy to optimise its therapeutic application.

**Keywords:** cannabidiol, Zika virus, broad-spectrum antiviral, cellular membranes, nanoparticles.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas e instituciones que, de alguna forma, contribuyeron a la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el otorgamiento de la beca que hizo posible el desarrollo de esta tesis, y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por brindar el equipamiento necesario y el entorno académico para mi formación doctoral.

A mis directoras, Cybele y Agustina, por la supervisión académica durante el desarrollo de este trabajo y por su constante apoyo.

A los integrantes del grupo de Virología, por su ayuda constante y por haber sido parte fundamental en mi formación científica y personal. En particular, a mis compañeros, por los mates, los almuerzos compartidos y ese compañerismo diario que hicieron más llevaderos los días en el laboratorio. Gracias a mi Club 19 por tantas risas, que llenaron de alegría y energía incluso las jornadas más intensas.

Al Dr. Peter Hemmerich, por recibirme en su laboratorio y brindarme su guía científica, apoyo técnico y generosa disposición. A Tobias Ulbricht y Christian Hoischen, también integrantes del laboratorio, por su ayuda constante y dedicación durante los experimentos. Agradezco profundamente su calidez humana, que hizo que me sintiera bienvenida desde el primer día. Ellos me hicieron amar la microscopía y siempre estuvieron abiertos a cada propuesta, alentando con entusiasmo cada nueva idea. También agradezco al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) y al Ministerio de Educación de Argentina por el otorgamiento de la beca ALEARG, que hizo posible esta valiosa experiencia.

Agradezco a la Dra. Cristina Ramírez por su amabilidad y generosidad al recibirme en su laboratorio y por brindarme el material necesario para llevar adelante todos mis experimentos. Valoro especialmente su convicción y el impulso con el que promueve el estudio científico y médico del cannabis.

Agradezco al Dr. Ernesto Ambroggio por recibirme en su laboratorio, por su generosidad, predisposición y por introducirme en el fascinante mundo de las membranas. Le estoy especialmente agradecida por los valiosos conocimientos compartidos.

Agradezco a la Dra. Irene Pagano por haberme recibido en el Instituto de Epidemiología durante mi primer año de doctorado, en plena pandemia, cuando todo era incierto. Fue una de mis primeras experiencias laborales y allí adquirí habilidades de laboratorio que resultaron fundamentales para mi formación. Hago un especial reconocimiento a

Claudia Azara y Daiana Soria, quienes no solo me transmitieron valiosos conocimientos, sino que hoy tengo la dicha de llamar amigas.

Agradezco al Dr. Mariano Vera y a la Dra. Priscila Castronuovo por su valiosa colaboración en los estudios de modelado molecular, así como por los conocimientos generosamente compartidos y la paciencia con la que acompañaron mi aprendizaje.

También agradezco a la Dra. Alejandra Castañeda, a la Dra. Margarita Sánchez y a la Dra. Andrea Rivas, sin cuya colaboración y experiencia no hubiera sido posible llevar adelante la formulación y caracterización de las nanopartículas.

Agradezco al Dr. David Jans por recibirme en su laboratorio durante mi pasantía, y a Kylie Wagstaff y Megan Barling por su valiosa ayuda y buena disposición durante mi estadía. También agradezco a la fundación de la familia Chu por otorgarme una beca que hizo posible esta pasantía.

También quiero agradecer a la Dra. Daiana Vota, a la Dra. Mariela Bollini y al Lic. Facundo Gallo por haberme permitido trabajar con ellos; aprendí muchísimo de estas experiencias.

Agradezco a *The Company of Biologists* y a la *International Society for Antiviral Research (ISAR)* por haberme otorgado becas que me permitieron asistir a congresos científicos y compartir mi trabajo con la comunidad académica.

A mis amigos, gracias por acompañarme con tanto cariño a lo largo de este camino. En especial a Alan y Victoria, por estar siempre conmigo, celebrando cada logro como si fuera propio y sosteniéndome en los momentos difíciles. Su presencia incondicional hizo toda la diferencia y les estaré eternamente agradecida por creer en mí, incluso cuando yo dudaba.

Por último, pero más importante que nada, agradezco profundamente a mi familia, que me acompañó con amor y paciencia a lo largo de todo este camino. En especial a mi mamá, mi principal sostén, por su contención incondicional y por estar presente en cada paso. Finalmente, a Otto, por su compañía silenciosa y constante, y por el amor incondicional con el que siempre supo estar presente.

# ÍNDICE

## INTRODUCCIÓN

1. Epidemiología y desafíos actuales en el control de las infecciones virales desatendidas..... 2
2. Virus Zika ..... 4
3. Estrategias terapéuticas y búsqueda de antivirales ..... 7
4. Estudio *in silico* aplicado a la búsqueda de antivirales..... 7

## HIPÓTESIS ..... 9

## OBJETIVOS ..... 10

## MATERIALES Y MÉTODOS ..... 11

### Estudios *in silico* ..... 12

1. Estructura tridimensional del sitio de unión al ligando del receptor AHR ..... 12
2. Simulaciones moleculares ..... 16
3. Alineamiento estructural (*TM-align*) ..... 18

### Estudios *in vitro* ..... 18

1. Reactivos y solventes..... 18
2. Células y stocks virales ..... 19
3. Ensayo de viabilidad celular ..... 20
4. Infecciones virales y tratamientos..... 21
5. Cuantificación de partículas infecciosas por el ensayo de formación de placas de lisis . 24
6. Cuantificación de la expresión relativa por la reacción en cadena en tiempo real con transcripción inversa (RT-qPCR)..... 24
7. Evaluación funcional de la vía NF- $\kappa$ B mediante ensayo de la luciferasa ..... 25
8. Cuantificación de IL-6 e IL-8 mediante ELISA ..... 25
9. Obtención de vesículas..... 26
10. Microscopía de fluorescencia ..... 28
11. Purificación de partículas virales de ZIKV ..... 33
12. Medición de colesterol total ..... 34
13. Obtención de nanopartículas ..... 34
14. Microscopía de fuerza atómica (AFM) ..... 36
15. Análisis estadístico ..... 37

## CAPÍTULO 1

### Introducción..... 40

1. Actividad y organización estructural de AHR ..... 40
2. Vía de señalización de AHR ..... 41

3. Ligandos de AHR.....	43
4. AHR en el contexto de las infecciones virales .....	44
<b>Resultados</b> .....	46
Estudios <i>in silico</i> .....	46
1. Caracterización del dominio PAS-B.....	46
2. Generación de la estructura 3D .....	48
2.1. PAS-B generado por AlphaFold.....	48
2.1.1. Docking molecular con el modelo generado por Alphafold .....	50
2.2. Método basado en modelado por homología .....	51
2.2.1. Modelo construido utilizando al heterodímero HIF-2 $\alpha$ :ARNT como plantilla .....	51
2.2.1.1. Simulaciones de docking molecular del modelo generado utilizando al heterodímero HIF-2 $\alpha$ :ARNT como plantilla.....	56
2.2.2. Modelo construido utilizando el dominio PAS-B de <i>Drosophila melanogaster</i> como plantilla .....	60
2.2.2.1. Docking y dinámica molecular con el modelo utilizando el dominio PAS-B de <i>Drosophila melanogaster</i> como plantilla .....	64
3. Simulaciones de <i>docking</i> y dinámica molecular utilizando el dominio PAS-B humano resuelto experimentalmente.....	66
4. Comparación estructural entre modelos <i>in silico</i> y la referencia experimental.....	70
Estudios <i>in vitro</i> .....	71
1. Actividad antiviral e impacto inmunomodulador de las vitaminas A y E frente al ZIKV .....	71
2. Efecto de la vitamina A sobre la vía de señalización de AHR .....	74
<b>Conclusiones parciales</b> .....	77
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Introducción</b> .....	80
1. Aspectos generales del cannabis y el CBD .....	80
2. Marco regulatorio del cannabis medicinal en Argentina .....	81
3. Aplicaciones terapéuticas del CBD .....	81
<b>Resultados</b> .....	84
1. Actividad antiviral del CBD frente al ZIKV en modelos celulares relevantes.....	84
2. Actividad antiviral del CBD contra DENV y YFV .....	85
3. Impacto del CBD sobre la vía de señalización de AHR .....	86
4. Actividad antiviral de flavivirus en células Vero .....	97
5. Actividad antiviral del CBD contra CHIKV .....	99
6. Actividad antiviral del CBD frente al ZIKV en distintas etapas de su ciclo de replicación ...	99
7. Efecto antiviral del CBD de amplio espectro .....	101

<b>Conclusiones parciales</b> .....	104
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>Introducción</b> .....	107
1. Composición lipídica de las membranas celulares.....	107
2. Las membranas celulares como blancos clave en la infección viral .....	110
3. Sistemas modelo de membrana en estudios biofísicos: GUVs y MLVs.....	111
<b>Resultados</b> .....	112
1. Efecto del CBD sobre membranas artificiales.....	112
2. Efecto del CBD sobre las membranas celulares.....	116
2.1. Evaluación del orden lipídico .....	116
2.2. Análisis de la dinámica de difusión del COL .....	119
2.3. Distribución y contenido de COL celular .....	121
2.4. Estudio exploratorio del tráfico intracelular de la CTxB .....	123
3. Efecto del CBD sobre las membranas en el contexto de la infección viral .....	124
3.1. Estudio de la organización de membranas en células infectadas con ZIKV .....	124
3.2. Cuantificación de COL total .....	126
3.3. Análisis morfológico de partículas virales mediante AFM.....	126
<b>Conclusiones parciales</b> .....	129
<b>CAPÍTULO 4</b>	
<b>Introducción</b> .....	132
1. Nanopartículas poliméricas (NP-PLGA) .....	132
2. Vesículas lipídicas (NIO).....	133
<b>Resultados</b> .....	135
1. NP-PLGA.....	135
1.1. Caracterización fisicoquímica por DLS .....	135
1.2. Actividad Biológica .....	137
2. Niosomas.....	140
2.1. Caracterización fisicoquímica por DLS .....	140
2.2. Análisis topográfico mediante AFM.....	144
2.3. Actividad biológica.....	146
<b>Conclusiones parciales</b> .....	148
<b>DISCUSIÓN</b> .....	150
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	158
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	161

# Abreviaturas

$\zeta$ P: potencial zeta.

ADV-5: adenovirus tipo 5.

AHR: receptor de hidrocarburos de arilo.

CBD: cannabidiol.

CC<sub>50</sub>: concentración citotóxica 50 %.

COL: colesterol.

D: coeficiente de difusión.

DENV: virus del dengue.

DLS: dispersión de luz dinámica

CE<sub>50</sub>: Concentración efectiva 50 %.

EE: eficiencia de encapsulación.

GP: polarización generalizada.

GUVs: vesículas unilamelares gigantes.

HSV-1: virus herpes simplex tipo 1.

I3S: Sal potásica de sulfato de indoxilo.

IFN-I: interferón tipo I.

LC: capacidad de carga.

Ld: líquido desordenado.

MLVs: vesículas multilamelares grandes.

MP: membrana plasmática.

MPn: membranas perinucleares.

NE: nanoemulsión.

NF- $\kappa$ B: factor nuclear kappa B.

NP: nanopartículas.

NP-PLGA: nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico).

PV-1: Poliovirus tipo 1.

SAHRM: modulador selectivo del receptor de hidrocarburos de arilo.

TDO: enzima triptófano-2,3-dioxigenasa

YFV: virus de la fiebre amarilla.

ZIKV: virus Zika.

# INTRODUCCIÓN

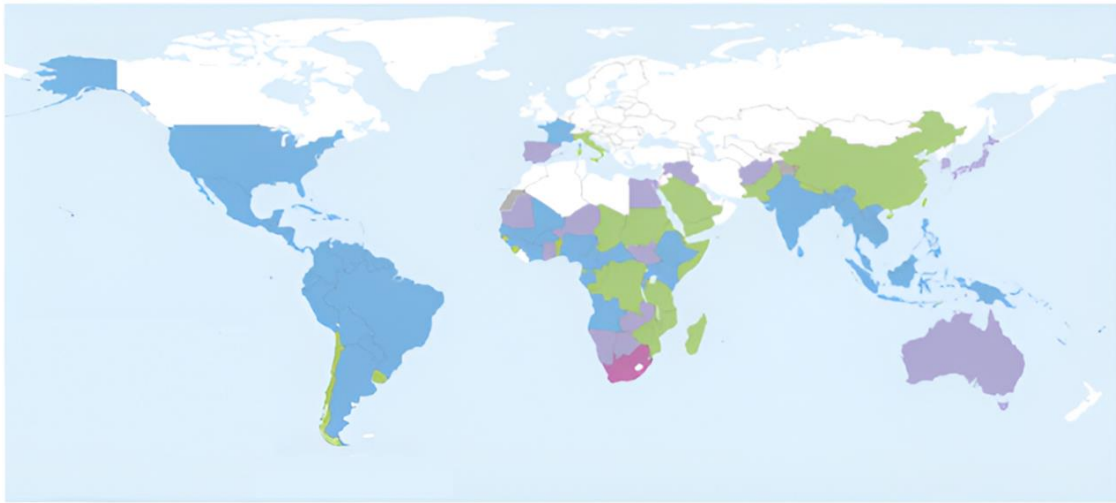
## **1. Epidemiología y desafíos actuales en el control de las infecciones virales desatendidas**

Las infecciones virales representan una de las principales amenazas para la salud pública a nivel mundial. Virus emergentes y reemergentes han sido responsables de brotes epidémicos y pandemias recientes, evidenciando su gran capacidad de adaptación, transmisión y evasión del sistema inmune. Si bien los avances en medicina han permitido el desarrollo de terapias eficaces para algunas infecciones virales, una gran parte de los virus que afectan a poblaciones humanas carecen de tratamientos antivirales específicos.

Esta problemática es especialmente evidente en el caso de las enfermedades virales desatendidas, muchas de las cuales son transmitidas por vectores y se concentran en regiones tropicales y subtropicales. A pesar de su impacto clínico y social, estas enfermedades suelen carecer de opciones terapéuticas eficaces, en gran medida debido a la baja rentabilidad percibida y a la insuficiente inversión en investigación y desarrollo orientada a patologías que afectan principalmente a poblaciones vulnerables<sup>1</sup>. Entre ellas se encuentran las causadas por flavivirus como el virus Zika (ZIKV), el virus del dengue (DENV) y el virus de la fiebre amarilla (YFV), así como otros virus como el chikungunya (CHIKV). La circulación activa de estos virus, potenciada por factores como el cambio climático, la urbanización no planificada y la globalización, aumenta el riesgo de propagación y dificulta su control<sup>2</sup>.

Las enfermedades transmitidas por vectores afectan a más de mil millones de personas al año, representan aproximadamente el 17 % de todas las enfermedades infecciosas a nivel mundial y causan más de 700.000 muertes anuales<sup>3</sup>. La Región de las Américas ha enfrentado la epidemia de dengue más grande desde que comenzaron los registros en 1980. En 2023 se registró el mayor número de casos hasta ese momento, con más de 4,1 millones de contagios. Sin embargo, en 2024 los países notificaron más de 12,6 millones de casos, casi tres veces más que el año anterior. Más de 21.000 de estos casos han sido graves, y se reportaron más de 7.700 muertes. Argentina, Brasil, Colombia y México concentran el 90% de los casos y el 88% de las muertes<sup>4</sup>. Si bien en 2025 se ha reportado una disminución del 69 % en comparación con el mismo período del año anterior, con 1,7 millones de casos acumulados hasta la semana epidemiológica 13, la circulación viral

continúa siendo elevada en varios países, especialmente en zonas tropicales y subtropicales<sup>5</sup>. En cuanto al ZIKV, si bien su circulación actual es menor en comparación con la del DENV, el brote epidémico registrado entre 2015 y 2016 evidenció el potencial devastador de estos arbovirus, con más de 1,5 millones de casos estimados en Brasil y un aumento notable de anomalías congénitas como la microcefalia, lo que motivó a que la Organización Mundial de la Salud (OMS) declarara una Emergencia de Salud Pública de Importancia Internacional<sup>6,7</sup>.



**Figura 1.** Países, territorios o áreas con transmisión local pasada o actual de uno o más virus transmitidos por *Aedes* (DENV, CHIKV y ZIKV) hasta el 30 de abril de 2024. En celeste (●) se indican los países con transmisión de los tres virus; en verde (●), aquellos con transmisión de dos de los tres virus; en violeta (●), los que presentan solo chikungunya; en lila (●), los que tienen solo dengue; y en blanco, los que no cuentan con transmisión documentada (OMS, 2024).

Este complejo escenario ha impulsado la necesidad de adoptar enfoques integrales que consideren la interconexión entre la salud humana, animal y ambiental. En este contexto, el enfoque de “Una Salud” resulta fundamental, ya que promueve la colaboración interdisciplinaria para abordar los factores que favorecen la emergencia y propagación de enfermedades transmitidas por vectores. Este paradigma reconoce que la salud de las personas está estrechamente relacionada con la de los animales y el ambiente, y destaca la importancia de estrategias conjuntas para la vigilancia, prevención y control de estos virus en un mundo cada vez más interconectado. Impulsado por la OMS junto con otras agencias internacionales, el enfoque “Una Salud” fue formalizado en un Marco de Acción publicado en 2021, que alienta a los países a integrar políticas de salud pública, sanidad animal y sostenibilidad ambiental para prevenir futuras crisis sanitarias<sup>8</sup>.

## 2. Virus Zika

### 2.1. Cuadro clínico y vías de transmisión

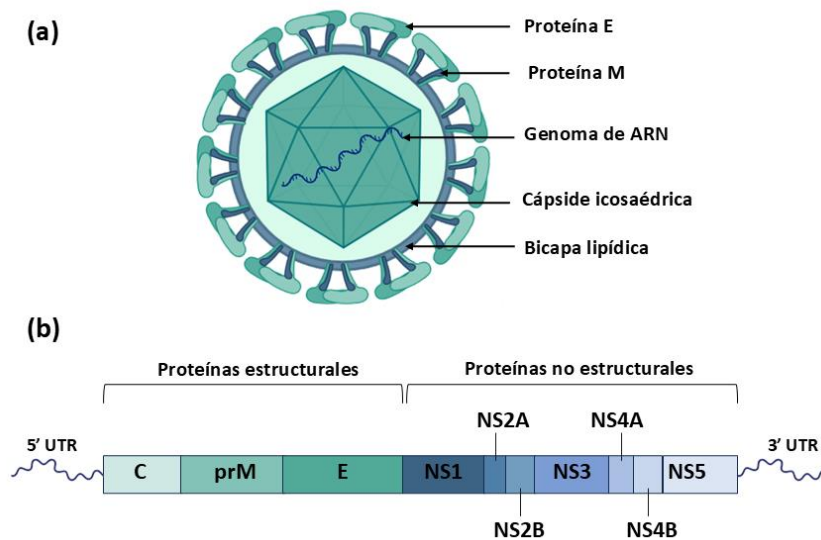
Desde su descubrimiento en 1947, el ZIKV ha sido responsable de brotes esporádicos, aunque su expansión global ocurrió en la última década, particularmente en América Latina y el Caribe. Su transmisión principal es a través de la picadura de mosquitos del género *Aedes*, aunque también se han documentado casos de transmisión sexual, perinatal y por transfusión sanguínea. La mayoría de las infecciones son asintomáticas o cursan con un cuadro leve autolimitado caracterizado por fiebre, exantema, artralgias y mialgias. Sin embargo, la infección durante el embarazo puede producir graves consecuencias neurológicas en el feto, como la microcefalia y otras malformaciones del espectro del síndrome congénito asociado a ZIKV. Al mismo tiempo, se han detectado efectos negativos a nivel ocular, ya sea del segmento anterior (conjuntivitis) como del posterior del ojo (retinopatía y uveítis). En algunos casos, se han observado manchas blancas o lesiones hemorrágicas en la retina de individuos infectados por el virus. Estos daños pueden afectar la visión y, si no se tratan de manera adecuada, podrían resultar en pérdida de visión. El ZIKV afecta al epitelio pigmentario de la retina (EPR), una monocapa de células que juega un papel crucial en la barrera hematorretiniana externa. Su daño puede comprometer la función retiniana y contribuir a problemas visuales más graves, como las alteraciones en la estructura de la retina, que a su vez pueden causar pérdida de visión. También, se ha encontrado que ZIKV puede afectar el nervio óptico, que es el encargado de transmitir las señales visuales desde el ojo al cerebro<sup>9,10</sup>.

Además, se ha asociado con síndromes neurológicos en adultos, como el síndrome de Guillain-Barré.

### 2.2. Organización estructural y genómica del ZIKV

El ZIKV es un arbovirus del género *Flavivirus* (familia *Flaviviridae*) que posee un genoma de ARN de cadena simple y sentido positivo, de aproximadamente 10,8 kb. Este genoma codifica una única poliproteína, que es posteriormente escindida por proteasas virales y celulares en tres proteínas estructurales (C, prM, E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5), las cuales participan en la replicación del virus y en la evasión de la respuesta inmune (**Figura 2**).

La partícula viral está envuelta por una bicapa lipídica derivada de la célula hospedadora, en la que se insertan las proteínas de envoltura E y prM/M, responsables de la unión y entrada viral. El virus tiene forma aproximadamente esférica, con un diámetro de entre 50 y 100 nm, y presenta una cápside de simetría icosaédrica que protege el genoma viral. La proteína E, en particular, cumple un rol clave en el reconocimiento del receptor y la fusión de membranas, siendo también un blanco frecuente para la neutralización por anticuerpos.



**Figura 2. Estructura y organización genómica del ZIKV.** (a) Representación esquemática del virión maduro de ZIKV, mostrando su cápside icosaédrica compuesta por la proteína C, la bicapa lipídica y las proteínas de envoltura (E y M). (b) Organización del genoma viral, con las regiones codificantes para proteínas estructurales (C: cápside; prM: precursor de la proteína de membrana (M); E: envoltura) y no estructurales (NS1–NS5).

### 2.3. Ciclo de replicación

El ciclo de replicación de ZIKV inicia con la adsorción del virión a la membrana plasmática (MP) mediante la unión a receptores específicos, seguida de endocitosis mediada por clatrina. Una vez en el endosoma, la acidificación del compartimento induce la fusión de la membrana del virión con la membrana endosomal, lo que permite la liberación del ARN viral al citoplasma. La replicación del ARN viral se lleva a cabo en complejos de replicación derivados del retículo endoplasmático (RE), que son estructuras membranosas reorganizadas donde también se traduce el ARN en una poliproteína. Esta poliproteína es posteriormente procesada por proteasas virales y de la célula hospedadora para generar las proteínas estructurales y no estructurales. El ensamblaje

de los nuevos viriones ocurre en el lumen del RE, donde el ARN genómico se encapsida con las proteínas estructurales. Luego, los viriones inmaduros transitan a través del complejo de Golgi, donde sufren modificaciones postraduccionales, maduración y adquisición de su conformación final. Finalmente, los viriones son transportados en vesículas y liberados por exocitosis hacia el espacio extracelular. Este proceso evidencia cómo ZIKV depende de forma crítica de las membranas para asegurar la eficiencia de su replicación y propagación, desde la entrada inicial hasta la liberación de nuevos viriones (Figura 3).

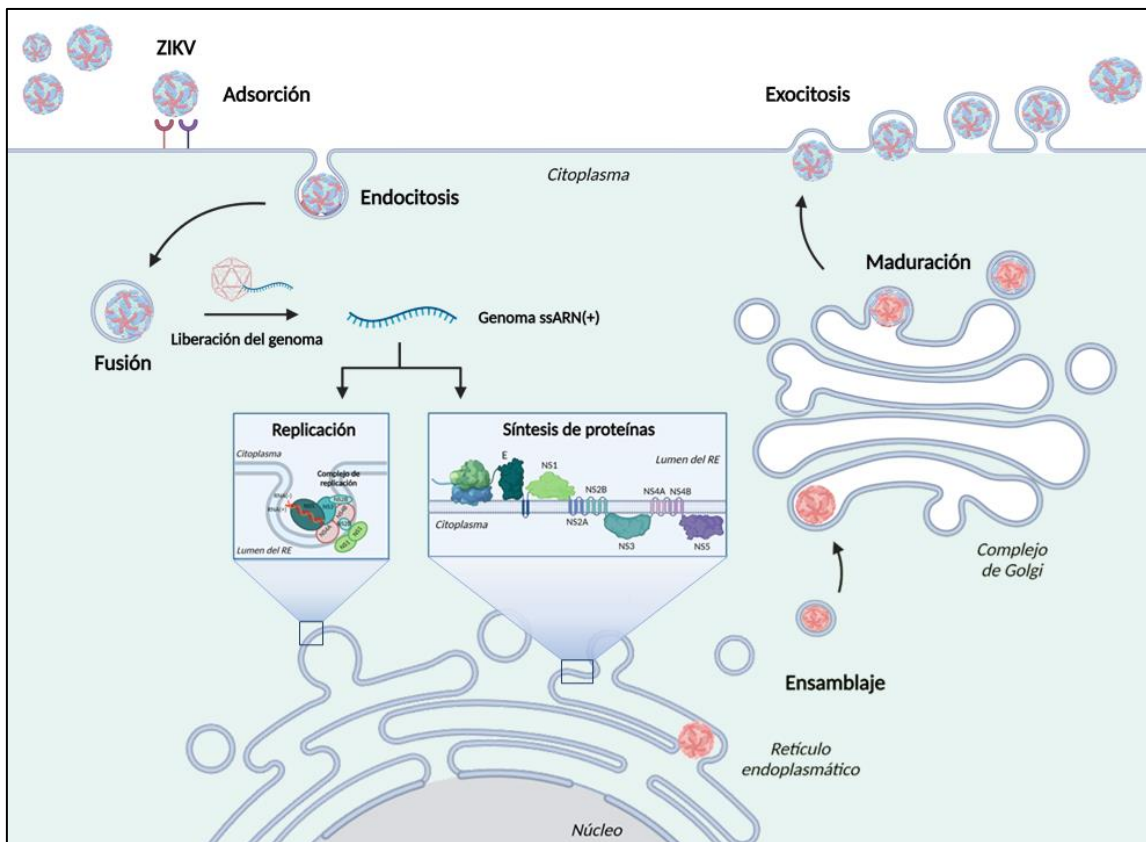


Figura 3. Ciclo de replicación del ZIKV.

### 2.3. Prevención y tratamiento

A pesar del impacto sanitario y social que generó el brote epidémico de ZIKV en 2015–2016, hasta el momento no existen tratamientos antivirales específicos ni vacunas aprobadas para su uso clínico. Las medidas preventivas continúan basándose en el control del vector, el uso de repelentes y barreras físicas, así como en recomendaciones sanitarias dirigidas a personas gestantes en zonas de circulación viral.

### 3. Estrategias terapéuticas y búsqueda de antivirales

Los antivirales pueden clasificarse, en líneas generales, según su blanco de acción: algunos actúan directamente sobre componentes virales (como enzimas o proteínas estructurales), mientras que otros interfieren con factores celulares esenciales para la replicación viral. Estos últimos suelen presentar un perfil de acción más amplio, ya que muchos virus dependen de vías celulares compartidas. Sin embargo, su desarrollo requiere especial cuidado, ya que la inhibición de procesos celulares puede comprometer la viabilidad celular o generar efectos adversos. En este contexto, cobran especial interés los antivirales de amplio espectro, capaces de actuar frente a múltiples virus mediante la alteración de procesos celulares comunes o estructuras conservadas<sup>11</sup>.

Una estrategia que ha cobrado protagonismo en los últimos años para identificar este tipo de compuestos es el reposicionamiento de fármacos. Esta herramienta permite acelerar la búsqueda de antivirales, especialmente en escenarios de emergencia sanitaria como el vivido durante la pandemia de COVID-19<sup>12,13</sup>. Consiste en evaluar el potencial antiviral de compuestos previamente aprobados para otros usos terapéuticos, lo que permite acortar tiempos y costos regulatorios. En este escenario, los que han cobrado un creciente interés como fuentes promisorias de antivirales, son los compuestos bioactivos. Muchos de estos bioactivos se han aislado de plantas con historial de uso terapéutico y presentan una gran diversidad estructural junto con una amplia gama de actividades biológicas. Diversos estudios han demostrado que estos compuestos pueden interferir en distintas etapas del ciclo viral o modular vías celulares clave en la infección, lo que los posiciona como candidatos atractivos para el desarrollo de antivirales de amplio espectro<sup>14-16</sup>. Además, su menor potencial citotóxico y el hecho de contar con antecedentes de uso en humanos favorecen su inclusión en estrategias de reposicionamiento y en el diseño de nuevos sistemas terapéuticos.

### 4. Estudio *in silico* aplicado a la búsqueda de antivirales

El abordaje computacional ha cobrado gran relevancia en el desarrollo de antivirales, especialmente en etapas iniciales donde técnicas como el *docking* y la dinámica molecular permiten seleccionar compuestos y predecir interacciones entre compuestos y proteínas blanco<sup>17,18</sup>. Este tipo de herramientas ofrece rapidez, bajo costo y capacidad

de exploración a gran escala. Sin embargo, sus limitaciones, como la simplificación de las condiciones celulares y la falta de información estructural precisa en algunos casos, hacen que sea imprescindible su complementación con estudios *in vitro* e *in vivo* que permitan validar las predicciones y analizar el comportamiento biológico real de los compuestos<sup>19</sup>.

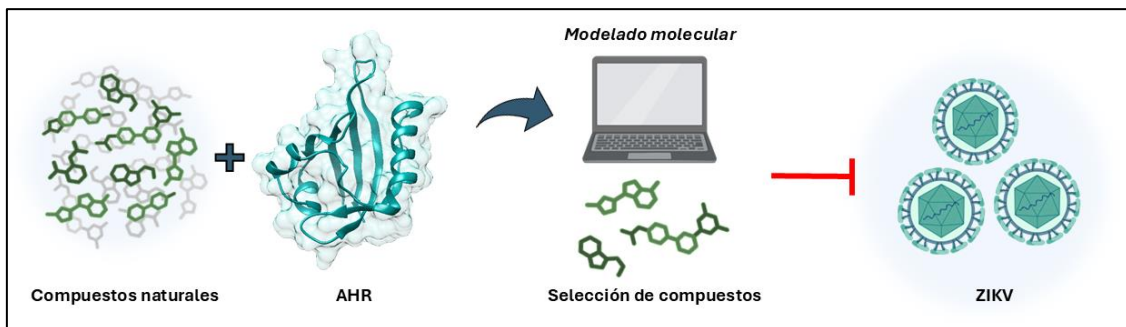
La comprensión del mecanismo de acción de los compuestos antivirales es un paso fundamental en este proceso. Además, identificar los blancos moleculares involucrados y las vías celulares afectadas no solo permite optimizar el diseño de nuevas estrategias terapéuticas, sino también anticipar efectos secundarios, evitar resistencias y comprender mejor la biología del virus y su interacción con la célula<sup>20</sup>.

El receptor de hidrocarburos de arilo (AHR) es un factor de transcripción sensible a señales ambientales y endógenas. Investigaciones previas realizadas en el Laboratorio de Estrategias Antivirales de la Dra. Cybele C. García han establecido que su activación durante infecciones virales ha sido asociada con una disminución de la respuesta inmune del hospedador, lo que lo posiciona como un factor proviral. Uno de los mecanismos implicados es la modulación negativa de rutas clave de la inmunidad innata, como la señalización mediada por el factor nuclear kappa B (NF-κB). Los estudios efectuados han demostrado que el uso de antagonistas de AHR permite limitar su activación, mejorar la respuesta antiviral y reducir la replicación de virus como ZIKV, DENV y SARS-CoV-2, lo que resalta su potencial como blanco terapéutico antiviral<sup>21-23</sup>.

En este contexto integral, esta tesis se enmarca en la búsqueda de compuestos naturales con actividad antiviral, abarcando desde el estudio *in silico*, hasta ensayos *in vitro*, describiendo el espectro y mecanismo de acción, así como el impacto sobre las membranas celulares y virales.

## HIPÓTESIS

Compuestos naturales identificados mediante estudios de modelado molecular, presentan actividad antiviral contra el ZIKV al actuar como antagonistas del receptor AHR. Esta acción modula la activación de vías inmunológicas, como la de NF- $\kappa$ B, promoviendo así una respuesta antiviral más eficiente por parte de la célula hospedadora (**Figura 4**).



**Figura 4.** Representación esquemática de la hipótesis: selección de bioactivos mediante modelado molecular dirigidos al receptor AHR con potencial efecto antiviral contra ZIKV.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Investigar el efecto antiviral de compuestos naturales y su posible mecanismo de acción.

### Objetivos específicos

1. Evaluar la interacción de AHR con compuestos naturales mediante estudios de *docking* y dinámica molecular, con el propósito de identificar posibles antagonistas.
2. Estudiar el efecto antiviral *in vitro* de los antagonistas identificados (vitaminas A y E, y cannabidiol [CBD]) frente al ZIKV, así como su impacto en la vía de señalización de AHR.
3. Determinar la actividad antiviral *in vitro* del compuesto seleccionado CBD contra virus estructuralmente no relacionados, evaluando su posible mecanismo de acción a través de la modulación de AHR.
4. Analizar el impacto del CBD sobre las membranas celulares, evaluando sus propiedades fisicoquímicas, organización, dinámica y funcionalidad.
5. Diseñar, desarrollar y caracterizar nanopartículas (NP) de naturaleza orgánica capaces de encapsular eficientemente al CBD con el fin de optimizar su actividad biológica. Evaluar la citotoxicidad y la capacidad antiviral de los nanosistemas obtenidos.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## Estudios *in silico*

### 1. Estructura tridimensional del sitio de unión al ligando del receptor AHR

#### 1.1. Exploración de la estructura de AHR y sus dominios funcionales

Se realizó una búsqueda de la estructura del receptor AHR humano (palabra clave: *aryl hydrocarbon receptor*; Entry: P35869) en la base de datos UniProtKB (<https://www.uniprot.org/>). Se confirmó que se trataba del gen de interés (*AHR*), cuya secuencia presenta alta confianza, ya que corresponde a una proteína anotada en Swiss-Prot con un elevado *score* de anotación. Los distintos dominios de la proteína, y en particular el dominio PAS-B, fueron caracterizados utilizando la base de datos Pfam (<http://pfam.xfam.org/>).

#### 1.2. Alineamiento de secuencias con BLASTP

La secuencia de aminoácidos en formato FASTA de AHR se descargó de la base de datos Swiss-Prot, y se seleccionaron los residuos correspondientes al dominio PAS-B (residuos 278–384), que contiene el sitio de unión al ligando. Posteriormente, se utilizó la herramienta BLASTP (*Protein Basic Local Alignment Search Tool*) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) para realizar un alineamiento local contra el banco de datos de proteínas PDB (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), empleando la matriz de sustitución BLOSUM62, tendiente a identificar estructuras disponibles con alta similitud en esta región.

#### 1.3. Generación de la estructura 3D mediante AlphaFold2

La estructura tridimensional (3D) del dominio PAS-B se predijo a través del servidor AlphaFold2\_advanced. AlphaFold es un sistema de inteligencia artificial entrenado con estructuras del PDB, para predecir la conformación 3D de una proteína a partir de su secuencia. Esta herramienta permite estimar distancias entre residuos y construir modelos 3D sin requerir homologías estructurales.

Se ingresó la secuencia FASTA del dominio PAS-B y se configuraron los siguientes parámetros de muestreo:

1. ***num\_models***: 5 modelos predichos.

2. **max\_recycles**: 48 recirculaciones como máximo. El modelo se detiene si converge antes.
3. **tol (tolerancia)**: 0,5 Å de RMSD (*Root Mean Square Deviation*).
4. **num\_samples**: 1 (número de muestras aleatorias o semillas).

Una vez completada la predicción, los modelos generados fueron descargados en formato PDB para su posterior análisis estructural.

#### **1.4. Generación de la estructura 3D de PAS-B mediante modelado por homología**

El modelado por homología es una técnica computacional que permite predecir la estructura 3D de una proteína a partir de su similitud con otras proteínas cuya estructura ya ha sido resuelta. Existen diferentes enfoques: el modelado basado en plantillas (*Template-Based Modeling*, TBM), que utiliza estructuras conocidas con alta identidad de secuencia; el modelado por *threading*, que detecta patrones estructurales conservados incluso con baja homología; y los métodos híbridos, que combinan ambas estrategias. También existen métodos *ab initio*, que predicen la estructura desde principios fisicoquímicos sin necesidad de plantillas.

En este trabajo, se generaron modelos del dominio PAS-B utilizando las plataformas **SWISS-MODEL**, **Modeller**, **I-TASSER** y **Phyre2**. Los modelos obtenidos se compararon para seleccionar el más adecuado para los análisis posteriores.

##### **1.4.1. I-TASSER**

Se utilizó la plataforma I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>), que combina alineamientos por *threading* con ensamblaje estructural por simulación. Se ingresó la secuencia FASTA del dominio PAS-B y se utilizaron los modelos generados por defecto, evaluando los puntajes *C-score*, *TM-score* (*Template Modeling score*) y RMSD reportados por el servidor para seleccionar el modelo más adecuado. El *C-score* es una medida de confianza del modelo, calculada a partir del nivel de similitud estructural entre las plantillas seleccionadas y el ensamblaje final; sus valores típicos oscilan entre -5 y 2, donde valores más altos indican mayor confiabilidad. El *TM-score* (que varía entre 0 y 1) es una medida de similitud estructural entre dos proteínas, normalmente, entre el modelo predicho y una estructura de referencia. Valores mayores a 0,5 reflejan una topología global correcta, mientras que valores menores a 0,17 sugieren una similitud

aleatoria. Por otro lado, el RMSD cuantifica la diferencia promedio en la posición de los átomos entre dos estructuras alineadas, en este caso entre el modelo y la plantilla. Valores inferiores a 2 Å indican alta similitud estructural, mientras que valores mayores reflejan diferencias significativas.

#### 1.4.2. Phyre2

El modelado se llevó a cabo mediante el servidor Phyre<sup>2</sup> (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>), en modo intensivo (*intensive mode*), el cual utiliza técnicas de *threading* combinadas con reconstrucción estructural. La calidad del modelo generado se evaluó en base al porcentaje de cobertura y confianza asignado por el servidor.

#### 1.4.3. SWISS-MODEL

El modelado por homología se realizó mediante el servidor web SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>), ingresando la secuencia del dominio PAS-B. Este servidor, que utiliza un enfoque TBM, identificó automáticamente plantillas compatibles a partir de la base de datos PDB (*Protein Data Bank*) y generó modelos 3D basándose en las estructuras seleccionadas. Se evaluaron los puntajes de GMQE (*Global Model Quality Estimation*) y QMEAN (*Qualitative Model Energy Analysis*) para seleccionar el modelo más confiable.

#### 1.4.4. Modeller

Este software es una herramienta de modelado por homología que implementa un abordaje TBM. Para la construcción del modelo, se utilizó el siguiente protocolo:

1. **Búsqueda de plantillas:** se empleó el script `build_profile.py` de Modeller para buscar plantillas en la base de datos local. A continuación, se usó `compare.py` para generar una matriz de distancia entre las plantillas encontradas, a partir de la cual se seleccionó la más adecuada.
2. **Alineamiento con la plantilla:** se ajustó la secuencia objetivo al formato `.ali` y se ejecutó el archivo `align2d.py` mediante `mod9.18`, generando los archivos `.ali` y `.pap` necesarios para la construcción del modelo.
3. **Generación del modelo:** se generaron seis modelos utilizando el script de modelado estándar, obteniéndose puntajes `molpdf` (*Molecular Probability*

*Density Function*) y DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*) para cada uno. El puntaje molpdf evalúa qué tan bien el modelo generado respeta las restricciones estructurales derivadas del alineamiento, mientras que el puntaje DOPE estima la calidad estructural global del modelo mediante un potencial estadístico. El modelo con mejor puntuación fue seleccionado, donde un puntaje más cercano a 1 indica una mayor calidad estructural.

## **1.5. Calidad y validación de los modelos**

### **1.5.1. SAVES v6.0 (*Structure Analysis and Verification Server*)**

Este servidor (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) integra herramientas como PROCHECK y Verify3D. PROCHECK permite evaluar la calidad estereoquímica de la estructura a través del análisis del gráfico de Ramachandran, donde se espera que un alto porcentaje de los residuos se ubique en regiones favorecidas. En el gráfico de Ramachandran se pueden visualizar todas las combinaciones posibles de ángulos diedros  $\psi$  y  $\phi$  en los aminoácidos de un polipéptido. No todos los pares de ángulos son realmente posibles dentro de las estructuras de los péptidos debido a los efectos estéricos entre los residuos (cadenas laterales) de los aminoácidos. La utilización de esta herramienta permite, por lo tanto, aproximar cuál será la estructura secundaria del péptido. Según lo informado por PROCHECK, se espera que un modelo de buena calidad tenga un 90% o más de los residuos en las regiones más favorables. Por otro lado, Verify3D analiza la compatibilidad de un modelo atómico 3D con su propia secuencia de aminoácidos en una dimensión (1D). Específicamente, el programa asigna puntuaciones a cada residuo en la estructura en función de su entorno 3D y luego compara estas puntuaciones con perfiles derivados de estructuras proteicas verificadas y conocidas. Este proceso permite identificar posibles errores en el modelo 3D de la proteína. Ambas herramientas se complementan para proporcionar una validación robusta de los modelos generados, asegurando su idoneidad para los análisis estructurales posteriores.

### **1.5.2. ProSA-web (*Protein Structure Analysis*)**

Este servidor (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) permite detectar posibles errores estructurales mediante la comparación del modelo con estructuras resueltas experimentalmente depositadas en el PDB. El análisis se basa en un potencial

de energía estadístico, y los resultados se expresan como un *Z-score*, que indica la desviación del modelo respecto a estructuras típicas de proteínas nativas de tamaño similar. Valores de *Z-score* dentro del rango observado para proteínas experimentales bien resueltas sugieren una buena calidad del modelo.

## **2. Simulaciones moleculares**

### **2.1. Preparación de ligandos**

Se generaron las estructuras 3D de los 11 ligandos seleccionados (**Tabla 5**) utilizando Avogadro (versión 21.93.0) y se optimizaron mediante cálculos semiempíricos utilizando el método PM6 en Gaussian 09. Posteriormente, se generaron los archivos `.pdb` con Molden, y los archivos `.pdbqt` se obtuvieron mediante AutoDock Tools (versión 1.5.6).

### **2.2. Preparación de las proteínas y generación de la grilla**

Se utilizaron tanto la estructura resuelta del dominio PAS-B humano (PDB ID: 7ZUB), descargada del RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>), como los modelos generados mediante predicción estructural. En la estructura resuelta, se eliminaron de manera manual los ligandos, moléculas de agua y otras entidades no proteicas presentes en el archivo `.pdb` original. A todos los archivos `.pdb` se incorporaron las cargas de Gasteiger, se asignaron los átomos AD4 y se añadieron hidrógenos polares utilizando las herramientas AutoDock 1.5.6. Luego, se generó el archivo `.pdbqt` correspondiente para cada proteína. La grilla se construyó con AutoGrid 4.2.6, asegurando que abarque completamente el sitio activo del dominio PAS-B.

### **2.3. Docking molecular**

Se utilizó el software AutoDock 4.2.6 para realizar el *docking* molecular. Las simulaciones se llevaron a cabo utilizando el algoritmo genético Lamarckiano (LGA). El protocolo involucró 2000 ejecuciones de LGA con 250 individuos por generación y hasta  $8 \cdot 10^6$  evaluaciones energéticas y 150 generaciones. Los resultados se agruparon utilizando el criterio de RMSD de 2,5 Å. Los complejos de menor energía se visualizaron en UCSF Chimera. En el caso del dominio PAS-B humano cristalizado, se validó el protocolo de *docking* mediante un acoplamiento con el inhibidor cocrystalizado indirubina, encontrando una excelente predicción de la pose cristalográfica en el PDB ID 7VNH.

## 2.4. Dinámica molecular

El complejo acoplado más estable obtenido del *docking* molecular para cada ligando se utilizó como geometría inicial para las simulaciones de dinámica molecular. Los complejos proteína-ligando se prepararon utilizando AMBER18 jump, parmchk2 y antechamber para la parametrización de los ligandos. La configuración general para las simulaciones fue la siguiente: I) 250 pasos de minimización de descenso más pronunciados de todo el sistema, manteniendo la proteína firmemente restringida en una caja de moléculas de agua TIP3P con una distancia mínima de 10 Å a cada pared, y Cl<sup>-</sup> y contraiones de Na<sup>+</sup> para alcanzar la electroneutralidad según fuese necesario. II) 6500 pasos de minimización de gradiente conjugado de todo el sistema. III) Calentamiento lento a 100 ps en el conjunto NTV con la proteína. IV) 60 ns de simulación en el conjunto NTP, a 1 atm y 300 K.

Las interacciones electrostáticas se calcularon utilizando el método PME (*Particle Mesh Ewald*) con un límite de 10 Å. Los enlaces que involucran átomos de hidrógeno se restringieron utilizando el algoritmo *SHAKE*, lo que permitió un paso de tiempo de integración de 0,002 ps. La integración se realizó utilizando el pmemd. Se utilizó el módulo CUDA del programa AMBER18 con el campo de fuerza auxiliar GAFF para los ligandos y ff14SB para la proteína. Las trayectorias se analizaron utilizando herramientas de análisis estándar AMBER cpptraj. Los cálculos de energía libre se realizaron utilizando el módulo MMPBSA (*Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area*) de AMBER 18 aplicando los modelos Poisson-Boltzmann (PB) y Generalized Born (GB). Los análisis de energía se realizaron para los últimos 10 ns de simulación como promedio en al menos dos trayectorias independientes. Los fotogramas se muestrearon una vez cada 5 a 10 fotogramas guardados. Los análisis de agrupamiento para la visualización de conformaciones representativas y la representación de algunas figuras se realizaron utilizando UCSF Chimera.

Las simulaciones moleculares se realizaron en colaboración con el Dr. Mariano Vera y la Dra. Priscila Ailín Castronuovo, del Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología (INBIOTEC, Universidad Nacional de Mar del Plata - CONICET), Grupo de Química Analítica y Modelado Molecular.

### 3. Alineamiento estructural (*TM-align*)

Para comparar las diferencias estructurales entre el dominio PAS-B humano resuelto (7ZUB) y los modelos generados por modelado por homología, se empleó la herramienta *TM-align*. Este servidor permitió evaluar la similitud estructural mediante cálculos de RMSD y *TM-score*. Se consideraron valores de *TM-score* mayor a 0,5 como indicativos de estructuras con el mismo pliegue global.

## Estudios *in vitro*

### 1. Reactivos y solventes

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Las drogas, los solventes utilizados en cada caso, así como las concentraciones de las soluciones stock, se encuentran resumidos en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Reactivos y solventes utilizados.

Reactivo	Solventes	Soluciones stock
CBD	Etanol absoluto (droga libre)	10 mM
	Acetato de etilo (NP)	32 mM
CH-223191	Dimetilsulfóxido (DMSO)	10 mM
Sal potásica de sulfato de indoxilo (I3S)	Agua estéril ultrapura 18 MΩ (MilliQ system)	200 mM
Interleucina-1 $\beta$ humana (IL-1 $\beta$ )	Agua estéril ultrapura 18 MΩ (MilliQ system)	0,1mg/mL
Vitamina A (retinol)	Etanol absoluto	50 mM
Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol).	Etanol absoluto	50 mM

El CBD fue generosamente provisto por la Dra. Cristina Ramírez, del Departamento de Química Biológica y Bioquímica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Mar del Plata, quien brindó su invaluable apoyo en la investigación de la presente tesis doctoral. Este compuesto presentó una pureza de 99,8%.

Los compuestos I3S e IL-1 $\beta$  fueron amablemente proporcionados por el Dr. Peter Hemmerich durante la pasantía realizada en 2024 en el Instituto Fritz Lipmann (FLI) en Jena, Alemania, a quien se le agradece profundamente por su colaboración.

Asimismo, las vitaminas A y E fueron gentilmente donadas por Laboratorios Raymos S.A.I.C., a quienes expresamos nuestro sincero agradecimiento por su generoso aporte.

## 2. Células y stocks virales

Se utilizaron las siguientes líneas celulares:

- Vero, células de riñón de mono verde africano (ATCC; CCL-81).
- Huh-7, células de carcinoma de hígado humano, provisto por el Dr. Pablo J. Schwarzbaum, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Química Biológica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- A549, células de adenocarcinoma de pulmón humano (ATCC; CCL-185).
- hRPE, células de epitelio pigmentario de retina humano (ATCC; CRL-2302TM).

Estas líneas celulares se cultivaron en medio esencial mínimo de Eagle (MEM; Gibco, Carlsbad, CA, EE. UU.) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) inactivado y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de gentamicina.

- Células Swan 71, células trofoblásticas de primer trimestre de embarazo, se crecieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) y mezcla de factores de crecimiento (GF) F12 suplementada con 10% de SFB, glutamina 2 mM y una solución de estreptomina 100 U/mL – penicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Estas células fueron provistas por la Dra. Daiana Vota del Laboratorio de Inmunofarmacología del IQIBICEN-CONICET.
- Células neurales progenitoras humanas (NPCs) de células de madre embrionarias humanas H9 (*WiCell Research Institute*) utilizando un kit comercial de ThermoFisher Scientific (medio *PSC Neural Induction*; Gibco). Esta línea celular se mantuvo en medio DMEM-F12 suplementado con 2 mM de B27 1X, N2 1X, glutamina, y aminoácidos no esenciales, una solución de estreptomina 100 U/mL y penicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 20 ng/mL, GF epidérmico y 20 ng/mL de GF básico de fibroblasto. Estas células fueron provistas por el Dr. Leonardo Romorini y la

Dra. Soledad Rodríguez Varela del Laboratorio de Investigación Aplicada a Neurociencias (LIAN), Fleni-CONICET, Buenos Aires.

- U2OS, línea celular de osteosarcoma humano, se crecieron en DMEM (Gibco) suplementado con 10% de SFB, sin antibióticos.

Todos los cultivos celulares fueron crecidos y mantenidos en estufa a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Se utilizaron los siguientes stocks virales:

- ZIKV, cepa argentina (INEVH116141).
- ZIKV, cepa Puerto Rico (PRVABC59).
- Virus del dengue, serotipo 2 (DENV-2), cepa Tailandia/16681/1984.
- Virus de la fiebre amarilla (YFV), cepa 17D.
- Virus chikungunya que expresa la proteína fluorescente ZsGreen (CHIKV ZsGreen) obtenido tras la transfección de células BHK con el ARN genómico sintetizado *in vitro* utilizando el clon de ADNc infeccioso del virus que expresa ZsGreen como plantilla.
- Virus Junín (JUNV), cepa IV4454.
- Virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1), cepa F.
- Adenovirus tipo 5 (ADV-5).
- Poliovirus tipo 1 (PV-1).

### **3. Ensayo de viabilidad celular**

Las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos y se expusieron durante 72 h a las drogas de interés.

#### **3.1. Ensayo de citotoxicidad con cristal violeta**

Las células fueron expuestas durante 72 h a los compuestos y luego las células se fijaron con formaldehído al 10% y se tiñeron con cristal violeta al 0,05% en etanol al 10%. El violeta cristal se solubilizó con una solución de etanol al 50% y ácido acético al 0,1%. La absorbancia a 570 nm se midió en un lector de microplacas POLARstar Omega (BMG LABTECH, Ortenberg, Alemania).

### **3.2. Ensayo de citotoxicidad por el método de MTT**

Para evaluar la actividad enzimática de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, se utilizó el método del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE. UU.). Tras exponer a las células a los distintos principios activos, se retiró el medio y se añadieron 100  $\mu$ L de medio conteniendo MTT (0,5 mg/mL). Las placas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, y posteriormente los cristales de formazán formados se disolvieron en 100  $\mu$ L de etanol al 96 % v/v. La absorbancia se midió a 570 nm en un lector de placas de microtitulación POLARstar Omega (BMG LABTECH, Ortenberg, Alemania).

## **4. Infecciones virales y tratamientos**

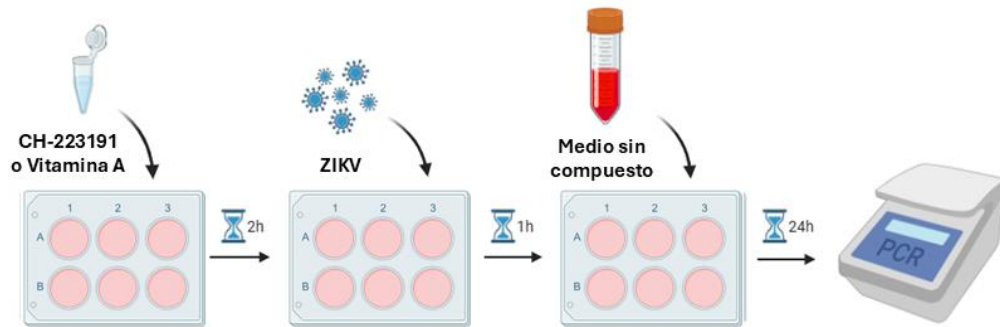
### **4.1. Ensayo de inhibición del rendimiento viral**

Las células se infectaron con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 para ZIKV, DENV-2, YFV, JUNV y ADV-5. Las infecciones con HSV-1 y PV-1 se hicieron con una MOI de 0,07. En particular, las células Swan-71 fueron infectadas con ZIKV a una MOI de 1. Después de 1 h de incubación a 37°C, los inóculos se retiraron y se añadió medio que contenía distintas soluciones de los distintos principios activos con concentraciones no citotóxicas. MEM complementado con 1,5 % de SFB se utilizó para las células Vero, Huh-7, hRPE y A549; DMEM-F12 suplementado con 10% de SFB fue utilizado para células Swan-71 y DMEM-F12 complementado con B27 1X, N2 1X, EGF (20 ng/mL) y bFGF (20 ng/mL) para las NPCs. Las células infectadas y tratadas se incubaron a 37°C durante 24 h para PV-1 y 48 h para los otros virus. Luego de la incubación, se recogieron los sobrenadantes y se titularon mediante el ensayo de formación de placas de lisis. Los cultivos celulares infectados con ZIKV y DENV-2 se conservaron para su posterior análisis por RT-qPCR, descrito más adelante.

### **4.2. Pretratamientos**

Se incubaron células hRPE tratadas con soluciones de vitamina A (800  $\mu$ M) y CH-223191 (10  $\mu$ M) durante 2 h a 37 °C. Luego, las células se infectaron con ZIKV durante 1 h (MOI=0,1). Transcurrido este tiempo, se removieron los sobrenadantes y posteriormente se añadió medio sin principio activo. Las células se incubaron durante 24 h a 37°C. Los

cultivos se conservaron para la cuantificación de los mensajeros ZIKV-*ns5*, *TDO*, *AHR*, *CYP1A1* e *IFNB1* mediante RT-qPCR, según se describe más adelante (**Figura 5**).



**Figura 5.** Esquema del protocolo de pretratamiento antiviral.

### **4.3. Ensayo de inactivación viral**

El ZIKV fue expuesto a 5 y 10  $\mu\text{M}$  de CBD durante 1 h 30 min a 37°C. Luego, las mezclas se diluyeron 1:100 y 1:1000 con PBS y se titularon mediante el ensayo de formación de placas de lisis.

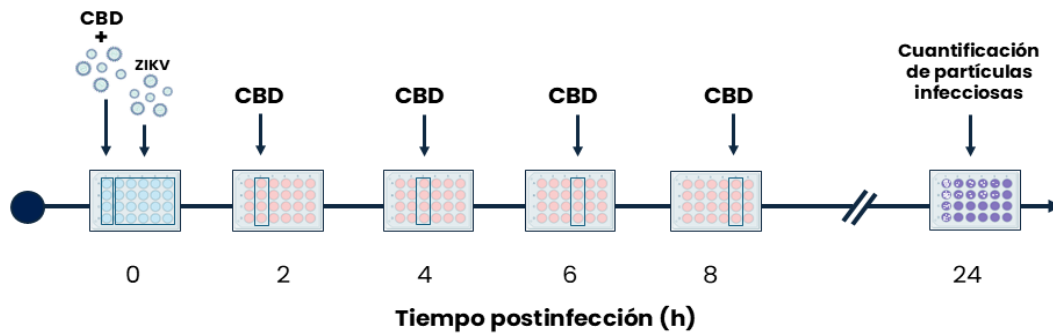
### **4.4. Ensayo de formación de focos**

El experimento se llevó a cabo en células Vero cultivadas en microplacas de 96 pocillos. Las células se infectaron con el virus reportero CHIKV-ZsGreen (MOI = 0,02) y se agregaron soluciones de CBD con diferentes concentraciones (1,25–10  $\mu\text{M}$ ). Los cultivos tratados se incubaron durante 20 h a 37°C con 5% de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, se descartaron los sobrenadantes, las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 1 h a 4°C. Inmediatamente, se realizaron nuevamente lavados con PBS y se añadió 30  $\mu\text{l}$  de PBS. Finalmente, el recuento de focos fluorescentes se realizó en un equipo ELISpot y el software InmunoSpot 7.0.30.2 (ImmunoSpot C.T.L, Germany). Estos experimentos se llevaron a cabo por el Dr. Diego Álvarez y la Dra. Eliana Castro de la Universidad Nacional de San Martín.

### **4.5. Ensayo de tiempos de adición**

Se cultivaron células Vero y Huh-7 en microplacas de 24 pocillos y se incubaron durante 24 h. Las células se infectaron con ZIKV ( $t = 0$  h; MOI= 0,5) en presencia o ausencia de 10  $\mu\text{M}$  de CBD a 4°C para permitir la adsorción, pero no la internalización. Después de 1 h 30 min, las células se lavaron tres veces con PBS y se adicionó medio. 10  $\mu\text{M}$  de CBD se

adicionó a las 0, 2, 4, 6 y 8 h post infección (hpi). Luego de 24 hpi, los sobrenadantes se recogieron y se titularon mediante ensayo de placa (**Figura 6**).



**Figura 6.** Esquema del ensayo de tiempos de adición.

#### 4.6. Ensayo de adsorción e internalización viral

Las células Huh-7 fueron sembradas en placas de 6 pocillos y cultivadas durante 24 h hasta alcanzar una confluencia del 100%. Para evaluar la adsorción viral, las células se infectaron en presencia de CBD (10  $\mu$ M) a 4 °C, condición que permite la unión del virus a la MP, pero inhibe su internalización. Tras 1 h 30 min de incubación, se lavaron las células con PBS y se recolectaron para su análisis.

Con el fin de estudiar los procesos de internalización y desnudamiento, las células se infectaron durante 1 h 30 min a 4 °C sin CBD, permitiendo únicamente la adsorción. Posteriormente, se incubaron con CBD durante 2 o 4 h a 37 °C, para permitir la internalización y el desnudamiento del genoma viral, respectivamente. Tras estas incubaciones, las células se trataron durante 1 min con proteinasa K para eliminar las partículas virales adheridas a la superficie celular que no habían sido internalizadas. A continuación, se agregó fenilmetilsulfonyl fluoruro (PMSF) (2 mM en PBS con 3% de BSA) para inhibir la actividad de la enzima. Finalmente, los cultivos celulares fueron recolectados y se cuantificó la expresión del mensajero viral ZIKV-*ns5* mediante RT-qPCR, según se describe más adelante (**Figura 7**).

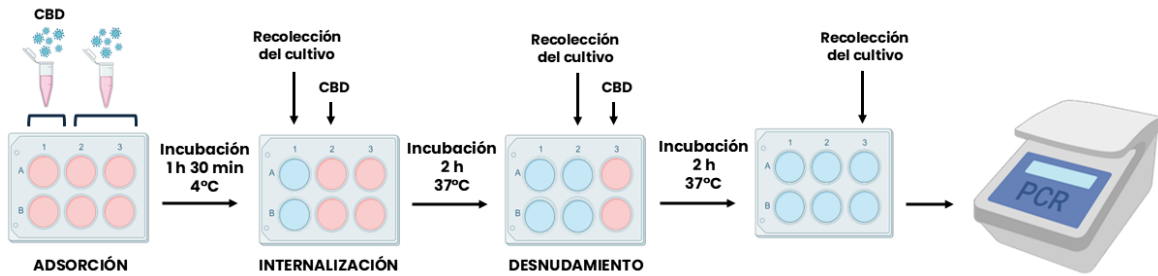


Figura 7. Ensayo de adsorción e internalización viral.

## 5. Cuantificación de partículas infecciosas por el ensayo de formación de placas de lisis

Se sembraron células Vero en microplacas de 24 pocillos y se incubaron durante 24 h. Para la cuantificación del rendimiento viral de ADV-5 se utilizaron células A549. Se adicionaron a estos cultivos diluciones seriadas al décimo de las distintas muestras y se incubaron a 37°C durante 1 h. Después de este tiempo, se removieron los inóculos y se añadió MEM que contenía 1% de metilcelulosa a los cultivos celulares. Las células se incubaron a 37°C durante 24 h (para PV-1), 72 h (para ZIKV y HSV-1), 5 días (para ADV-5 y YFV) y 7 días (para DENV-2 y JUNV). Finalmente, las microplacas se fijaron con formaldehído al 10% y se tiñeron con cristal violeta al 1% en etanol al 10%. Se cuantificaron las placas y se determinaron los títulos, los cuales se expresaron como unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL).

## 6. Cuantificación de la expresión relativa por la reacción en cadena en tiempo real con transcripción inversa (RT-qPCR)

El ARN se extrajo de los cultivos celulares utilizando el reactivo TRIzol (TRI Reagent® MRC de Molecular Research Center, Inc.). El ADNc se sintetizó con la enzima transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV) y la PCR en tiempo real se realizó utilizando la mezcla real FastStart™ Universal SYBR® Green Master (Rox). La expresión génica se normalizó con el control génico endógeno *ACTB* (gen de la  $\beta$ -actina) y los datos se analizaron mediante el método del ciclo umbral ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ). En la **Tabla 2** se encuentran las secuencias *forward* y *reverse* de los cebadores utilizados.

**Tabla 2.** Cebadores utilizados en RT-qPCR.

<b>Genes</b>	<b>Forward (5'-3')</b>	<b>Reverse (5'-3')</b>
<i>ACTB</i>	TTAGTTGCGTTACACCCTTTCTTG	TCACCTTCACCGTTCCAGTTT
<i>ZIKV-ns5</i>	GCCGCCACCAAGATGAACTGATTG	GCAGTCTCCCGGATGCTCCATC
<i>AHR</i>	ATCCTTCCAAGCGGCATAGAGACC	CAAAGAAGCTCTTGCTCTCAGG
<i>TDO</i>	GAGGAACAGGTGGCTGAATTT	GCTCCCTGAAGTGCTCTGTA
<i>CYP1A1</i>	GAACTGCTTAGCCTAGTCAACCTG	AGAATAGGGATGAAGTCAGCTGGG
<i>IFNB1</i>	TAGCACTGGCTGGAATGAGA	TCCTTGGCCTTCAGGTAATG

## 7. Evaluación funcional de la vía NF-κB mediante ensayo de la luciferasa

El procedimiento se realizó según lo descrito por Vicente et al. (2023)<sup>24</sup>. Brevemente, las células Huh-7 fueron transfectadas con un vector reportero NF-κB-LUC, que contiene el gen reportero luciferasa bajo el control del promotor de NF-κB y con un plásmido control RSV-β-galactosidasa, utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A las 24 h postransfección, las células fueron infectadas con ZIKV (MOI=0,1) y tratadas o no con CBD (10 μM) durante 6 h. Luego de la incubación, las células fueron lisadas. La cuantificación del reportero se realizó con el Sistema de Ensayo de Luciferasa E1500 y el Sistema de Ensayo de Enzima β-Galactosidasa E2000 (Promega, Madison, WI, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las mediciones se obtuvieron con un lector de microplacas FLUOstar OPTIMA y los resultados se expresaron como unidades relativas de luminiscencia (ULR).

## 8. Cuantificación de IL-6 e IL-8 mediante ELISA

Las concentraciones de las interleuquinas IL-6 e IL-8 se determinaron mediante un ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima). Para ello, células Huh-7 fueron infectadas con ZIKV (MOI = 0,1) y tratadas con 10 μM de CBD durante 48 h. También se cuantificaron las interleuquinas proinflamatorias en células Huh-7 no infectadas. Las mediciones se realizaron en los sobrenadantes de cultivo utilizando el kit BD OptEIA™ ELISA (Becton Dickinson), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Estas mediciones y el ensayo de la luciferasa fueron realizados por la Lic. Josefina Vicente, bajo la supervisión del Dr. Carlos Bueno, en el Laboratorio de Virología del IQUBICEN (UBA-CONICET).

## 9. Obtención de vesículas

### 9.1. Vesículas multilameles grandes (MLVs)

Se sintetizaron vesículas que contenían 1,2-dioleoil -sn -glicero-3-fosfocolina (DOPC), esfingomiolina de cerebro (bSM), en ausencia o presencia de colesterol (COL) y CBD. Los MLV se prepararon generando una película lipídica uniforme en la pared de un tubo de ensayo de vidrio. Para ello, se colocaron mezclas de lípidos en tubos de vidrio disueltos en cloroformo:metanol (2:1, v/v) y se secaron mediante evaporación bajo una corriente de N<sub>2</sub> (g). Posteriormente, se eliminaron las trazas de disolvente durante 2 h de tratamiento en una cámara de vacío. Los lípidos se hidrataron con una solución tampón que contenía HEPES 10 mM, NaCl 200 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, a pH 7, MgCl<sub>2</sub> 2 mM. Las muestras se sometieron a cinco ciclos de 2 min de congelación y descongelación (-195 °C en nitrógeno líquido y 60 °C en un baño calefactor, respectivamente) y luego se agitaron durante 5 min utilizando un vórtex. Las muestras de liposomas se mantuvieron a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) y se utilizaron en un plazo de 4 h. Para las mediciones de fluorescencia, se agregaron alícuotas apropiadas de la sonda fluorescente Laurdan a la suspensión de lípidos inicial, alcanzando 1% en moles. Las muestras se excitaron a 360 nm y la fluorescencia se midió en un rango de 400 a 600 nm (**Figura 8**).

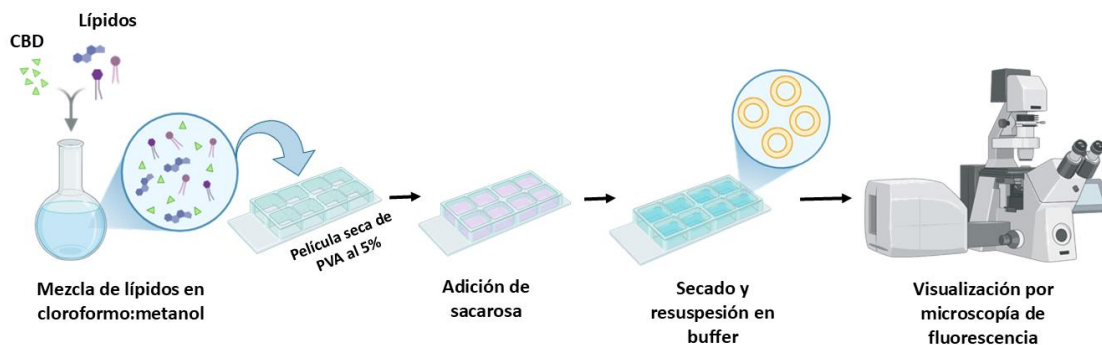


**Figura 8.** Esquema del procedimiento de la obtención de las MLVs.

### 9.2. Vesículas unilameles gigantes (GUVs)

Las GUVs se prepararon mediante el método de hinchamiento espontáneo de lípidos en película seca, una técnica común para generar vesículas GUVs a partir de mezclas lipídicas (**Figura 9**). Los lípidos (DOPC, bSM y COL) y el CBD se disolvieron en una mezcla

2:1 de cloroformo:metanol, y se depositaron (10  $\mu$ L) sobre cubetas conductoras previamente recubiertas con una película seca de alcohol polivinílico (PVA) al 5% en H<sub>2</sub>O, la cual fue secada en estufa a 60 °C durante 2 h. Luego se dejó evaporar el solvente en campana durante 30 min y posteriormente en vacío por otros 30 min. A continuación, se adicionaron 200  $\mu$ L de sacarosa 0,5 M sobre la película seca. La sacarosa hidrata la película de PVA, y genera una diferencia de potencial químico que favorece la formación de las GUVs. Las cubetas se incubaron en estufa a 37 °C durante 1 h en una cámara húmeda. Luego, las vesículas fueron transferidas a pocillos de observación que contenían un buffer de *imaging* isotónico con glucosa y BSA. Se empleó BODIPY-FL-C<sub>5</sub>-HPC (Invitrogen) como marcador de la fase líquida desordenada (Ld) (verde), y la sonda carbocianina fluorescente roja DiI<sub>C16</sub> (Invitrogen), que se asocia preferentemente a la fase líquido ordenada (Lo). Estas sondas se adicionaron a la suspensión inicial de lípidos. Las vesículas se visualizaron utilizando un microscopio confocal Olympus FV1200 (Tokio, Japón) acoplado a un sistema invertido, utilizando un objetivo de 100x con inmersión en aceite (NA 1.40).



**Figura 9.** Esquema del procedimiento de la obtención de las GUVs.

Los experimentos descritos en esta sección se llevaron a cabo durante una pasantía realizada en 2023 en el Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC, CONICET), Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, bajo la supervisión del Dr. Ernesto Ambroggio.

## 10. Microscopía de fluorescencia

### 10.1. Reactivos

Las sondas fluorescentes utilizadas fueron:

- Laurdan (6-Dodecanoyl-2-Dimethylaminonaphthalene) (Invitrogen™).
- BODIPY-colesterol (BODIPY-COL, MedChemExpress).
- Solución lista para usar Filipina III (Sigma-Aldrich).
- Subunidad B de la toxina colérica (CTxB) conjugada con Alexa Fluor™ 555 (Thermo Fisher Scientific).
- Aglutinina de germen de trigo (WGA, *Wheat Germ Agglutinin*) conjugada con isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) (Sigma-Aldrich Co.). Esta sonda fue donada gentilmente por la Dra. Andrea Barquero, del Laboratorio de Virología del IQUIBICEN-CONICET.

Los anticuerpos utilizados fueron:

- Anti-dsRNA (IgG de conejo, clone J2; SCICONS).
- Anti-proteína E de ZIKV (IgG de ratón; Abcam).
- Anti-AHR (IgG de conejo; GeneTex).
- Anti-NF-κB p65 (IgG de ratón, clone F-6; Santa Cruz Biotechnology Inc.).
- Anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen).
- Anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen).
- Anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a Alexa Fluor™ 568 (Invitrogen).

### 10.2. Técnicas con células fijadas

#### 10.2.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

##### a. Cuantificación de células proteína E y dsRNA positivas.

Las células Vero se cultivaron en cubreobjetos dispuestos en una microplaca de 24 pocillos durante 24 h. Posteriormente, los cultivos fueron infectados con ZIKV (MOI = 0,1) durante 1 h y tratados con 10 μM de CBD durante 48 h. Las células se fijaron con

metanol frío al 100% durante 10 min. Las muestras se incubaron con los anticuerpos anti-dsRNA (1:100) o anti- E (1:300) durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego, las muestras marcadas con anti-proteína E se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario anti-ratón IgG Alexa Fluor 488 (1:300), mientras que para aquellas marcadas con anti-dsRNA se utilizó el anticuerpo secundario anti-conejo IgG Alexa Fluor 488 (1:300). Finalmente, se realizó la tinción de núcleos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; 1:1000) (Sigma-Aldrich Co.) y las muestras se montaron con un medio de montaje a base de glicerol conteniendo DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano) como agente antifotoblanqueante. Las muestras se visualizaron con un microscopio de epifluorescencia Olympus IX71 (Tokio, Japón). El análisis y la cuantificación de la fluorescencia se realizaron con el software ImageJ 1.54p (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EE. UU.).

#### **b. Cuantificación de AHR y NF- $\kappa$ B**

Las células U2OS se cultivaron en cubreobjetos dispuestos en una microplaca de 24 pocillos durante 24 h. Se realizaron los siguientes tratamientos:

- IL-1 $\beta$  durante 2 h (10 ng/ $\mu$ L).
- I3S durante 2 h (300  $\mu$ M).
- CBD durante 2 h (10  $\mu$ M).
- Tratamiento combinado de CBD (10  $\mu$ M) con IL-1 $\beta$  (10 ng/ $\mu$ L) durante 2 h.
- Tratamiento combinado de CBD (10  $\mu$ M) con I3S (300  $\mu$ M) durante 2 h.
- Tratamiento de células durante 1 h con CBD (10  $\mu$ M) y luego 1 h con IL-1 $\beta$  (10 ng/ $\mu$ L).
- Tratamiento de células durante 1 h con CBD (10  $\mu$ M) y luego 1 h con I3S (300  $\mu$ M).
- Tratamiento de células durante 1 h con IL-1 $\beta$  (10 ng/ $\mu$ L) y luego 1 h con CBD (10  $\mu$ M).
- Tratamiento de células durante 1 h con I3S (300  $\mu$ M) y luego 1 h con CBD (10  $\mu$ M).

Luego de los tratamientos, las células fueron fijadas con formaldehído (FA) al 4% durante 10 min y permeabilizadas con Triton X-100 al 0,25% durante 3 min.

Posteriormente, se incubaron con anticuerpos primarios anti-AHR (1:100) y anti-NFκB p65 (1:100), y se revelaron con los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 568 anti-IgG de conejo (1:200) y Alexa Fluor 488 anti-IgG de ratón (1:300), respectivamente. Las muestras fueron montadas con ProLong™ Gold Antifade con DAPI y posteriormente visualizadas mediante un microscopio Zeiss ApoTome 5, utilizando un objetivo de inmersión 63x/1.4 NA. La cuantificación de la fluorescencia se realizó con el software ImageJ 1.54p (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EE. UU.).

### **10.2.2. Transporte de CTxB-Alexa Fluor™ 555**

Para el estudio del transporte retrógrado de la CTxB, se utilizó la CTxB conjugada con Alexa Fluor 555 (5 µg/mL), la cual se une específicamente al gangliósido GM1, localizado principalmente en las balsas lipídicas de la MP. Las células fueron pretratadas con CBD durante 1 h y, posteriormente, incubadas con CTxB-Alexa Fluor 555 durante distintos tiempos (2, 15, 30 y 120 min) a 37 °C. Finalmente, las muestras fueron fijadas con FA al 4% durante 10 min a temperatura ambiente. Los núcleos fueron visualizados con Hoechst y montadas con ProLong™ Gold Antifade sin DAPI. Las imágenes fueron adquiridas mediante utilizando un microscopio Zeiss ApoTome 3 utilizando un objetivo de 63x/1.4NA.

### **10.2.3. Marcaje de membranas celulares**

Las células Vero, sembradas sobre cubreobjetos insertos en placas de multipocillos, fueron infectadas con ZIKV (MOI = 0,1) durante 1 h y tratadas con 10 µM de CBD por 48 h. Luego, las células fijadas con PFA al 4 % y permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,1%, se incubaron con WGA-TRITC durante 1 h a 37°C en cámara húmeda. Adicionalmente, las células se marcaron con el anticuerpo anti-dsRNA como se indicó anteriormente. Finalmente, se realizó la tinción de núcleos con DAPI durante 10 min. Las muestras se visualizaron con un microscopio confocal Zeiss LSM 980 (Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemania) utilizando un objetivo de inmersión 63x/1.4 NA. El análisis y cuantificación de fluorescencia se realizó con el software ImageJ 1.54p (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EE. UU.).

#### 10.2.4. Cuantificación de colesterol no esterificado

Las células U2OS fueron tratadas con CBD en dos esquemas experimentales:

- Dosis-respuesta: 1,2; 2,5; 5 y 10  $\mu\text{M}$  de CBD durante 60 min.
- Cinética de tratamiento: 10  $\mu\text{M}$  de CBD durante 30, 60, 120 y 240 min.

Tras el tratamiento, las células fueron fijadas con FA al 4% en PBS. Luego, se incubaron con filipina (0,2 mg/mL en PBS) durante 30 min. Esta sonda fluorescente se une al COL no esterificado. Posteriormente, las muestras fueron montadas con ProLong™ Gold Antifade sin DAPI. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio Zeiss ApoTome 5 utilizando un objetivo de 63x/1.4NA. La cuantificación de fluorescencia se realizó con el software ImageJ 1.54p (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EE. UU.).

### 10.3. Técnicas con células vivas

#### 10.3.1. Determinación del orden de membranas celulares

Las células U2OS fueron incubadas con CBD (10  $\mu\text{M}$ ) durante 1 h. Posteriormente, se añadieron 5  $\mu\text{M}$  de Laurdan en DMEM sin suero ni antibióticos, manteniendo la incubación por 1 h. Luego de este período, se retiró la sonda, se realizaron lavados y se reemplazó el medio por DMEM fresco sin Laurdan. Las imágenes fueron adquiridas mediante un microscopio confocal de superresolución Zeiss LSM 880 Airyscan (Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemania), utilizando un objetivo de inmersión 63x/1.4 NA DIC M27. Se seleccionaron regiones correspondientes a MP y membranas perinucleares (MPn), donde se calculó la polarización generalizada (GP) utilizando la siguiente ecuación:

$$GP = \frac{I_{450} - I_{494}}{I_{450} + I_{494}}$$

Donde  $I_{450}$  e  $I_{494}$  corresponden a las intensidades de fluorescencia medidas en 450 nm y 494 nm, respectivamente. El análisis de las imágenes y el cálculo de GP se realizaron utilizando el software Zeiss Zen Blue 3.10 (Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemania).

#### 10.3.2. Estudio de la difusión del COL mediante ensayos de FRAP

Las células U2OS fueron tratadas con 10  $\mu\text{M}$  de CBD durante 1 h antes de la incubación con BODIPY-COL (2  $\mu\text{M}$ ) en DMEM sin suero ni antibióticos durante 40 min.

Posteriormente, se realizaron lavados y se incubaron en medio libre de sonda por 30 min para permitir la redistribución del fluoróforo en las membranas celulares. Se seleccionaron regiones correspondientes a MP y MPn, donde se llevó a cabo el ensayo de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*). El fotoblanqueo se realizó con un láser Argón de 488 nm, aplicando 100 iteraciones en la región de interés. La recuperación de fluorescencia se registró mediante una serie de tiempo de 200 ciclos, utilizando el modo Airyscan para mejorar la resolución espacial. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal de superresolución Zeiss LSM 880 Airyscan (Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemania), con un objetivo de inmersión 63x/1.4 NA DIC M27. Los datos de FRAP fueron analizados con el software Zeiss Zen Blue 3.10 (Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemania).

Los parámetros se obtuvieron a partir de las curvas de recuperación de fluorescencia obtenidas tras el blanqueo de una región de interés (ROI) definida. Las curvas fueron normalizadas considerando como 0 la intensidad inmediatamente posterior al blanqueo y como 1 la intensidad máxima recuperada. A partir de estas curvas, se calcularon los siguientes parámetros:

- **Tiempo medio de recuperación ( $t_{1/2}$ ):** corresponde al tiempo necesario para alcanzar la mitad de la recuperación máxima de fluorescencia. Se extrajo directamente de la curva de recuperación promedio.
- **Fracción móvil (fM):** se definió como la proporción de la señal fluorescente que se recupera tras el blanqueo, calculada mediante la fórmula:  $fM = \frac{F_{\infty} - F_0}{F_i - F_0}$

donde  $F_i$  es la intensidad previa al blanqueo,  $F_0$  la intensidad inmediatamente posterior al blanqueo y  $F_{\infty}$  la intensidad final tras alcanzar el *plateau*.

- **Fracción inmóvil (fIM):** se estimó como el complemento de la fracción móvil:  $fIM = 1 - fM$ .
- **Coefficiente de difusión (D):** se calculó usando la siguiente ecuación:

$$D = \frac{W^2}{4t_{1/2}}$$

donde  $W$  es el radio efectivo de la ROI, estimado a partir de las dimensiones del cuadrado definido durante la adquisición, y el  $t_{1/2}$  descrito previamente.

Los experimentos realizados con BODIPY-COL, Filipina III, Laurdan y anticuerpos anti-AHR y anti-NF- $\kappa$ B p65, fueron llevados a cabo en el Leibniz Institute on Aging – Fritz Lipmann Institute (FLI) durante una pasantía realizada en 2024, bajo la supervisión del Dr. Peter Hemmerich y en colaboración con Tobias Ulbricht y Christian Hoischen. El Dr. Hemmerich y su equipo brindaron orientación científica, apoyo técnico y generosa disposición, lo cual fue fundamental para el desarrollo de una parte significativa de este trabajo. Su colaboración y compromiso son profundamente agradecidos.

## **11. Purificación de partículas virales de ZIKV**

### ***11.1. Preparación del stock viral y clarificación***

Para la generación del stock viral, se utilizaron células Vero crecidas en frascos de cultivo T150 a una confluencia del 100 %. Los frascos se infectaron con ZIKV (MOI = 0,1); dos fueron tratados con CBD y los otros dos se mantuvieron sin tratamiento como control. Transcurridos tres días postinfección, se recolectaron los sobrenadantes de cultivo de todas las botellas y se procedió a una etapa de clarificación para eliminar restos celulares. Para esto, se centrifugaron las muestras a 3000 rpm durante 10 min en tubos Falcon de 50 mL, utilizando una centrífuga Eppendorf 5810 R (Hamburgo, Alemania).

### ***11.2. Concentración del virus***

Se realizó una primera ultracentrifugación para concentrar el virus. Las muestras se cargaron de manera equilibrada en los buckets del rotor SW28 y se centrifugaron a 40.000 rpm durante 1 h 30 min a 8 °C, utilizando una ultracentrífuga Class S XL-90 (Beckman, Brea, California, EE. UU.). El *pellet* fue resuspendido cuidadosamente en PBS estéril.

### ***11.3. Purificación del virus***

La purificación del ZIKV se realizó mediante un gradiente discontinuo de sacarosa. Se prepararon tubos con capas sucesivas de 1 mL de sacarosa al 60%, seguida de 4 mL de sacarosa al 5%. Finalmente, se agregó la muestra viral concentrada en la parte superior. Tras balancear los tubos, se llevó a cabo una ultracentrifugación a 40.000 rpm durante 1 h 30 min a 8 °C en el rotor 55Ti en la ultracentrífuga Class S XL-90 (Beckman, Brea, California, EE. UU.). Al finalizar, se observó una banda opalescente correspondiente a la fracción viral purificada, la cual se extrajo cuidadosamente con una pipeta Pasteur y se

transfirió a un tubo nuevo. Para remover los restos de sacarosa, se realizó una tercera ultracentrifugación bajo las mismas condiciones (40.000 rpm, 1 h 30 min, 8 °C). Finalmente, el *pellet* obtenido se resuspendió en PBS para su posterior análisis.

## **12. Medición de colesterol total**

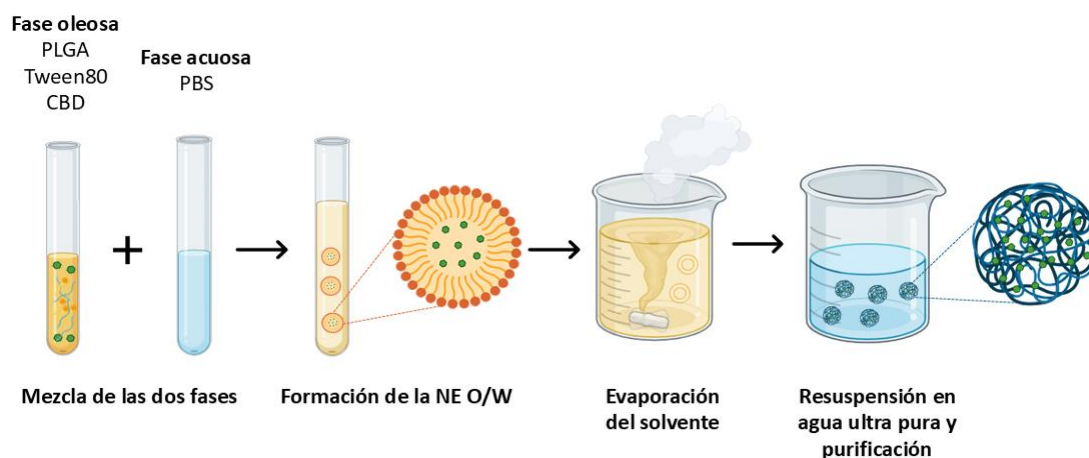
Se cuantificó el COL total (esterificado y no esterificado) de cultivos celulares infectados y no infectados. Para esto, se cultivaron células Vero en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 h. Luego de alcanzar el 90% de confluencia, las células fueron infectadas con ZIKV y DENV-2 (MOI = 0,1) durante 1 h a 37°C. Las células infectadas y no infectadas fueron tratadas con concentraciones de 5 y 10 µM de CBD durante 48 h. El COL total se midió utilizando el kit Amplex™Red Cholesterol Assay (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit fue donado gentilmente por la Dra. Andrea Barquero (IQUIBICEN-CONICET).

## **13. Obtención de nanopartículas**

### **13.1. Nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA)**

Para la generación de nanopartículas (NP) de PLGA (NP-PLGA) se empleó el método de inversión de fase, utilizando una fase acuosa compuesta por PBS con sales de sodio a 0,16 M, y una fase orgánica que contenía PLGA (4% en acetato de etilo), Tween®80 y CBD disuelto en etanol absoluto. Se siguió el protocolo descrito por Fornaguera et al. (2015) y por Fornaguera et al. (2016), con modificaciones optimizadas por Castañeda Cataña en su tesis doctoral (2022)<sup>25,26</sup>. La mezcla fue homogeneizada para formar una nanoemulsión (NE) tipo O/W (aceite en agua). Posteriormente, se evaporó el acetato de etilo y se purificaron las NP-PLGA por dos rondas de ultracentrifugación a 20.000 rpm durante 2 h empleando una ultracentrífuga Beckman Coulter Class S XL-90 (Brea, California, Estados Unidos). Los pellets obtenidos se resuspendieron en agua ultrapura estéril mediante sonicación en tres ciclos de 5 min, a una frecuencia de 20 kHz y una potencia total de 125 W, utilizando un equipo de ultrasonido con baño de hielo (Qsonica, EE. UU.). Los sobrenadantes recuperados en este paso fueron utilizados para calcular la eficiencia de encapsulación (EE). Tanto las NE como las NP-PLGA fueron almacenadas bajo distintas condiciones para evaluar su estabilidad y caracterizadas por dispersión de

luz dinámica (DLS). Se tomaron alícuotas de las suspensiones purificadas para los análisis posteriores (**Figura 10**).



**Figura 10.** Esquema del procedimiento de la obtención de las NP-PLGA.

### 13.2. Obtención de vesículas lipídicas: niosomas

Para la generación de los niosomas (NIO), se utilizó la técnica de hidratación de película delgada, según lo descrito por Bayindir & Yuksel (2010), Sadeghi Ghadi et al. (2019) y Thabet et al. (2021), con adaptaciones optimizadas por Castañeda (2022, tesis doctoral)<sup>27-29</sup>. Para la formación de la película delgada, se disolvieron Span<sup>®</sup>20, COL y diacetilfosfato de sodio (DCP) en cloroformo, homogeneizando la solución. El CBD fue incorporado en este paso, a una concentración de 1 mg/mL disuelto en etanol absoluto, o bien 10 mg/mL cuando se utilizó acetato de etilo como solvente. Una vez formada, la película delgada se rehidrató con PBS estéril a 60 °C, y la suspensión resultante se homogeneizó mediante agitación con vórtex y tres ciclos de sonicación de 5 min, a una frecuencia de 20 kHz y una potencia total de 125 W, utilizando un equipo de ultrasonido con baño de hielo (Qsonica, EE. UU.), con el objetivo de obtener una dispersión uniforme. La suspensión coloidal obtenida fue purificada mediante dos ultracentrifugaciones consecutivas a 20.000 rpm durante 2 h a 10 °C (ultracentrífuga Class S XL-90, Beckman). Los sobrenadantes recuperados en cada paso fueron conservados para el posterior cálculo de la EE. Los *pellets* resultantes se resuspendieron en agua ultrapura estéril (**Figura 11**). Finalmente, se almacenaron alícuotas para su caracterización y evaluación posterior.

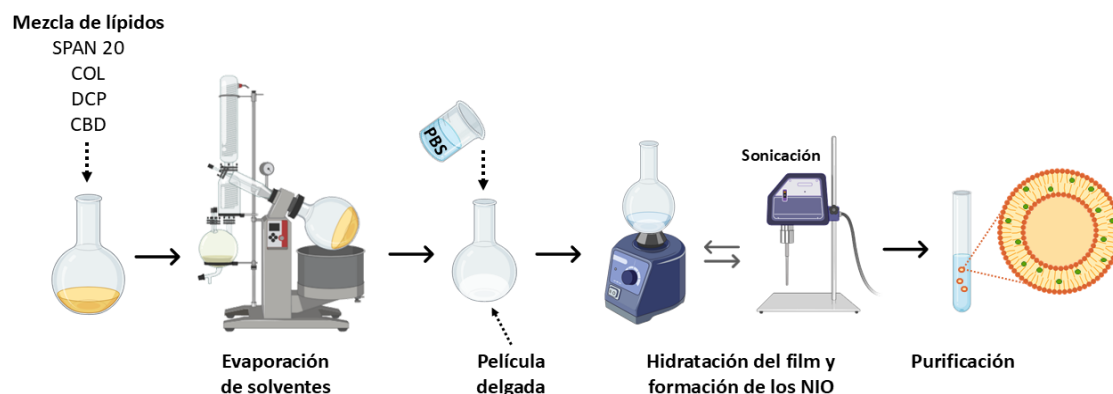


Figura 11. Esquema del procedimiento de la generación de los NIO.

### 13.3. Cuantificación del CBD por espectrofotometría de absorción y determinación de la eficiencia de encapsulación

La cuantificación del CBD se realizó mediante espectroscopía UV-Vis. Se registraron espectros de absorción entre 200 y 600 nm, y se seleccionó 220 nm como longitud de onda para la curva de calibración, por corresponder al máximo de absorción observado.

La EE se calculó cuantificando el CBD libre presente en el sobrenadante tras la purificación de las NP, y comparándolo con la cantidad inicial de CBD incorporado. Para ello, se utilizó la siguiente fórmula:

$$EE (\%) = \frac{(CBD_{inicial} - CBD_{sobrenadante})}{CBD_{inicial}} \times 100$$

Todos los experimentos de esta sección se realizaron en colaboración con la Dra. Alejandra Castañeda Cataña (Laboratorio de Virología del IQUBICEN, UBA-CONICET; Instituto de Química Rosario (IQUIR), Universidad Nacional de Rosario-CONICET) y la Dra. Margarita Sánchez Domínguez (Centro de Investigación en Materiales Avanzados S.C., México).

## 14. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

### 14.1. Preparación de partículas virales inactivadas

Se tomaron 200  $\mu$ L de la suspensión viral purificada y se transfirieron en microtubos estériles. La inactivación se realizó mediante una combinación de métodos: primero, se

expusieron los microtubos con la tapa abierta a luz UV durante 45 min dentro de una cabina de flujo laminar. Posteriormente, los microtubos se cerraron y se incubaron a 56 °C durante una hora utilizando un termobloque. Finalmente, las partículas virales se mantuvieron a temperatura ambiente durante 48 h. La titulación posterior confirmó la ausencia de partículas virales infecciosas.

#### **14.2. Preparación de los NIO**

De la suspensión inicial, se tomaron 500 µL, se completó el volumen a 1 mL con agua ultrapura y se centrifugó a 15.000 rpm durante 2 h. El pellet obtenido se resuspendió en 1 mL de agua ultrapura, repitiendo el lavado dos veces. Finalmente, el último pellet se resuspendió en 500 µL, y de esa suspensión se tomaron 50 µL para el sembrado.

#### **14.3. Caracterización de morfología superficial por AFM**

Los portaobjetos de vidrio fueron limpiados con etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemania) y se dejaron secar. Se colocaron 10 µL de cada muestra (virus inactivado o NIO) sobre la superficie y se cubrieron con otro portaobjetos para distribuir la suspensión de forma homogénea. Las muestras se colocaron en una estufa con vacío a temperatura moderada durante 5 min para eliminar el agua. Luego de retirar el cubreobjetos, se agregaron 10 µL de agua ultrapura y se repitió el proceso de lavado tres veces para eliminar posibles impurezas. Las muestras secas se analizaron mediante AFM (Keysight Technologies, modelo 5500, California, EE.UU.) para caracterizar su morfología.

Estas mediciones fueron gentilmente realizadas la Dra. Andrea Rivas y la Dra. Mayra Alejandra Castañeda Cataña en el Centro de Investigación y Desarrollo en Materiales Avanzados y Almacenamiento de Energía de Jujuy-CIDMEJu (CONICET-Universidad Nacional de Jujuy).

### **15. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 8 (San Diego, CA, EE. UU.). Para las comparaciones entre dos grupos se utilizó la prueba t de Student, mientras que para comparaciones múltiples se aplicó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de una prueba *post hoc* de Tukey (comparación entre

todos los grupos) o de Dunnett (comparación de múltiples grupos contra un control). Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias con valores de  $p < 0,05$  (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

## **16. Ilustraciones y diseño de figuras**

Las figuras esquemáticas que representan mecanismos biológicos, procedimientos experimentales y modelos celulares fueron diseñadas utilizando la plataforma BioRender (<https://www.biorender.com/>)

# **CAPÍTULO 1**

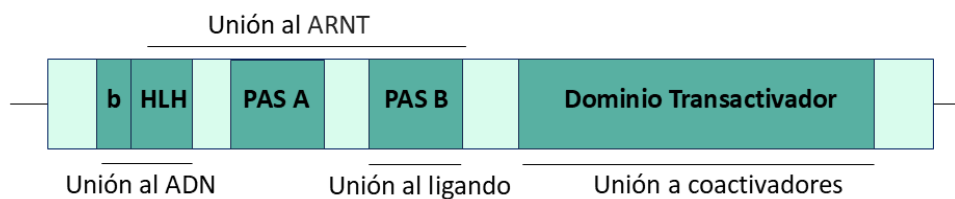
*Evaluación in silico del receptor AHR  
como blanco molecular de bioactivos  
y validación preliminar in vitro*

## Introducción

### 1. Actividad y organización estructural de AHR

La proteína AHR es un factor de transcripción citosólico activado por ligandos, ampliamente reconocido por su rol en la respuesta celular a xenobióticos. Su activación regula la expresión de múltiples genes, en especial aquellos que codifican enzimas metabolizadoras de fase I y II, incluyendo *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, y *UGT1A6*. Además de su papel en la biotransformación de compuestos exógenos, AHR ha emergido como un regulador clave de procesos fisiológicos e inmunológicos, modulando vías de señalización implicadas en inflamación, diferenciación celular y homeostasis de barreras epiteliales<sup>30,31</sup>.

En cuanto a su estructura molecular, la proteína AHR pertenece a una familia de factores de transcripción que poseen dos motivos característicos: el dominio básico hélice-bucle-hélice (bHLH) y el dominio PAS (denominado así por las primeras tres proteínas identificadas con esta estructura: Per, ARNT y Sim). El dominio bHLH, localizado en el extremo N-terminal, está formado por dos hélices  $\alpha$  separadas por un bucle. Este dominio contiene la región responsable de la unión al ADN, la señal de translocación nuclear y participa en la dimerización con ARNT. El dominio PAS se encuentra en la región C-terminal del bHLH y está conformado por 260–310 aminoácidos que incluyen dos repeticiones conservadas, PAS-A y PAS-B, separadas por una región poco conservada. El dominio PAS-A actúa como sitio de interacción con otras proteínas PAS y constituye el punto de unión para la proteína de choque térmico 90 (Hsp90), mientras que el dominio PAS-B alberga el sitio de unión al ligando, que se superpone parcialmente con el sitio de unión a Hsp90. El dominio transactivador del AHR se localiza en la región C-terminal y es esencial para la activación de genes diana, ya que permite la interacción con coactivadores de la transcripción (**Figura 12**)<sup>32,33</sup>.



**Figura 12.** Organización estructural de AHR.

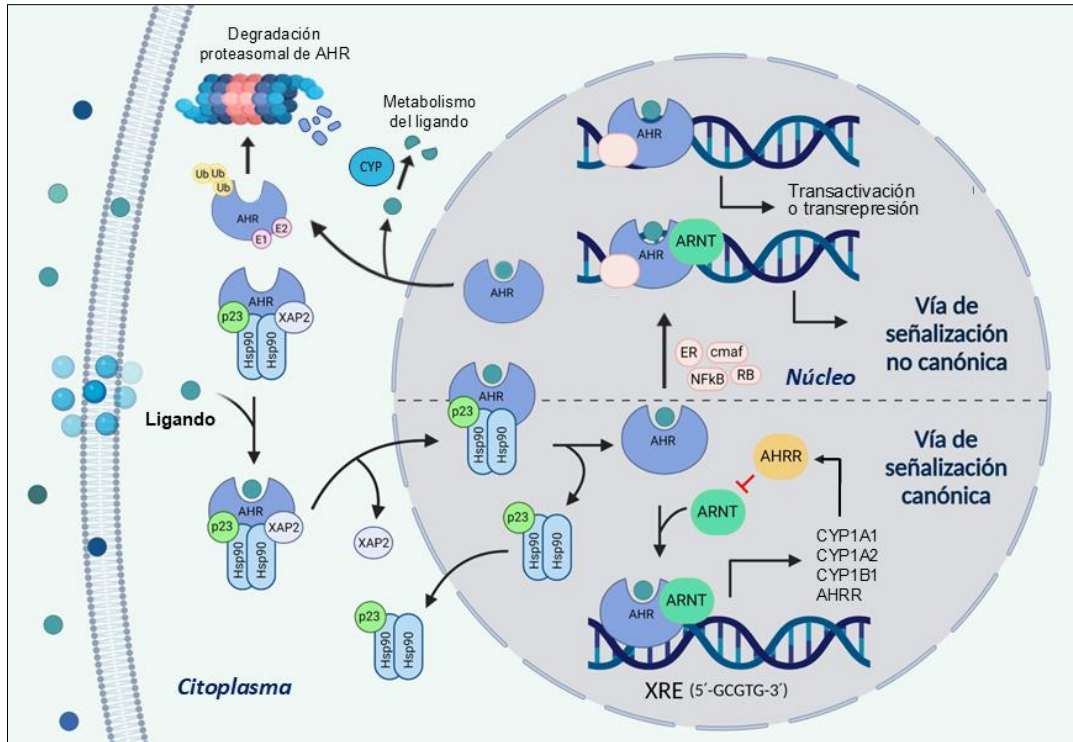
## **2. Vía de señalización de AHR**

### ***2.1. Vía de señalización canónica***

En su forma inactiva, AHR se localiza en el citoplasma formando un complejo multiproteico con dos moléculas de Hsp90, la proteína asociada al virus de la hepatitis B X (XAP2), y la chaperona p23. La unión a un ligando activa al receptor, induciendo un cambio conformacional que expone su señal de localización nuclear (NLS) y permite su translocación al núcleo. Una vez allí, se disocia de sus chaperonas y forma un heterodímero con el translocador nuclear de AHR (ARNT). Este complejo AHR-ARNT se une a secuencias específicas de ADN conocidas como elementos de respuesta a dioxinas o elementos de respuesta a xenobióticos (DREs/XREs, con la secuencia consenso 5'-GCGTG-3'), localizadas en los promotores de sus genes blanco. Entre los genes regulados se incluyen aquellos que codifican para enzimas metabolizadoras de xenobióticos<sup>34</sup>.

### ***2.2. Vía de señalización no canónica***

Además de su rol clásico como activador transcripcional a través de XREs, AHR también participa en vías no canónicas de señalización. Estas rutas se caracterizan por su independencia de la activación clásica vía AHR-ARNT-XRE y, en muchos casos, por una independencia funcional de ARNT. En estas vías, AHR regula la expresión génica mediante interacciones proteína-proteína, modulando la transcripción a través de coactivación o represión cruzada, incluso en ausencia de sitios XRE en los promotores. Este tipo de señalización resalta su papel como modulador inmunológico e inflamatorio, cuya acción puede variar significativamente en función del tipo celular, el estímulo presente y el ligando que lo activa<sup>35</sup>.

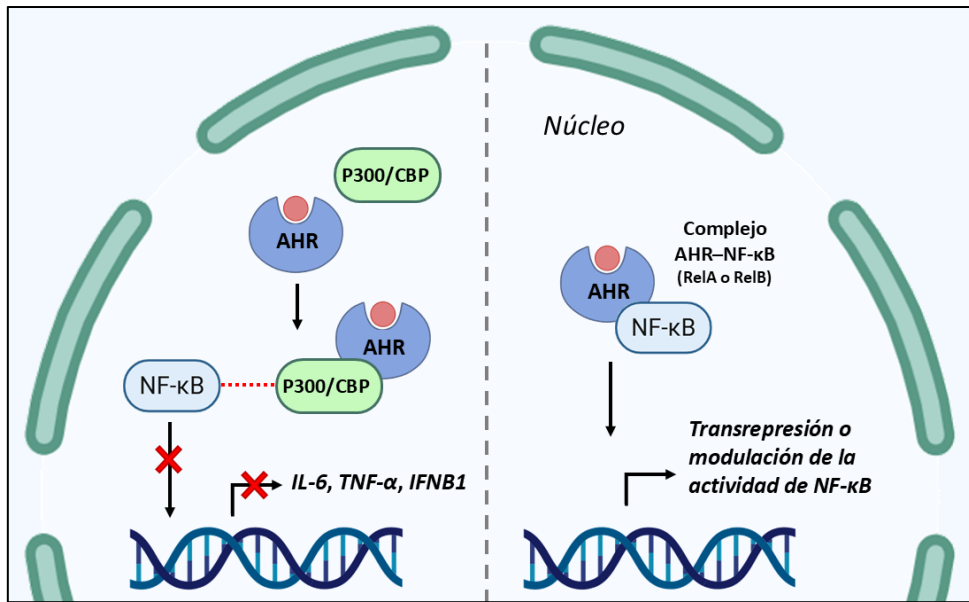


**Figura 13.** Vías de señalización canónica y no canónica de AHR

Uno de los mecanismos no canónicos más relevantes es la interacción nuclear de AHR con NF- $\kappa$ B, principalmente con las subunidades p65/RelA y RelB (**Figura 14**). Esta interacción, independiente de ARNT, puede interferir con la actividad transcripcional clásica de NF- $\kappa$ B sobre genes proinflamatorios como *IL6*, *TNF* o *IFNB1*<sup>36,37</sup>. La regulación puede deberse a varios mecanismos:

- Competencia por cofactores compartidos (p300/CBP) necesarios para la activación transcripcional de NF- $\kappa$ B; cuando AHR secuestra estos coactivadores, inhibe la transcripción de los genes diana de NF- $\kappa$ B<sup>36,38</sup>.
- Formación del complejo AHR–NF- $\kappa$ B, que puede funcionar como represor o modulador transcripcional, dependiendo del promotor implicado y el entorno molecular. Es frecuente la inhibición de genes como *IL-6* o *TNF*; para *IFNB1*, el efecto puede variar según la presencia de factores adicionales (IRFs, AP-1)<sup>39</sup>.

Este fenómeno es altamente contexto-dependiente, y su efecto puede variar según el tipo celular, el estado basal del sistema inmune y el tipo de ligando que activa a AHR<sup>37,40</sup>.



**Figura 14.** Mecanismos no canónicos de regulación de NF-κB por AHR. A la izquierda, AHR compite por el coactivador p300/CBP, lo que impide la activación de genes proinflamatorios como *IL6*, *TNFA* e *IFNB1*. A la derecha, AHR forma un complejo con NF-κB (subunidad RelA/p65 o RelB), que puede actuar como transrepresor o coactivador, según el promotor y el contexto celular.

### 3. Ligandos de AHR

Los ligandos de AHR se clasifican en exógenos y endógenos, y presentan gran diversidad estructural y funcional<sup>41,42</sup>. Entre los exógenos se incluyen contaminantes ambientales persistentes, como el 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) y el benzo[a]pireno, así como fármacos y compuestos naturales derivados de plantas, como los flavonoides resveratrol y quercetina, que pueden actuar como agonistas o antagonistas según el contexto<sup>43-46</sup>. Los ligandos endógenos comprenden principalmente metabolitos del triptófano, como la quinurenina (Kyn), así como derivados del hemo (bilirrubina, hemina) y del ácido araquidónico (lipoxina A<sub>4</sub>). Algunos de estos compuestos, como la indirubina, se comportan como agonistas parciales, capaces de inducir una activación limitada del receptor.

Más allá de la distinción clásica entre agonistas y antagonistas, muchos ligandos funcionan como moduladores selectivos del AHR. Estos compuestos promueven una activación selectiva del receptor que depende de múltiples variables: su afinidad, la concentración utilizada, el tipo celular, el repertorio de cofactores disponibles, y la presencia de otros estímulos intracelulares (**Figura 15**)<sup>47</sup>. En general, la mayoría de los ligandos caracterizados hasta el momento son agonistas, mientras que los antagonistas

son menos frecuentes. Entre estos últimos, CH-223191 es uno de los más utilizados experimentalmente, ya que bloquea la activación del AHR inducida por ligandos como el TCDD, sin inducir una respuesta propia.

Esta complejidad funcional convierte al AHR en un sensor químico altamente adaptable, cuya respuesta biológica está modulada por el entorno fisiológico, químico y molecular<sup>23</sup>.

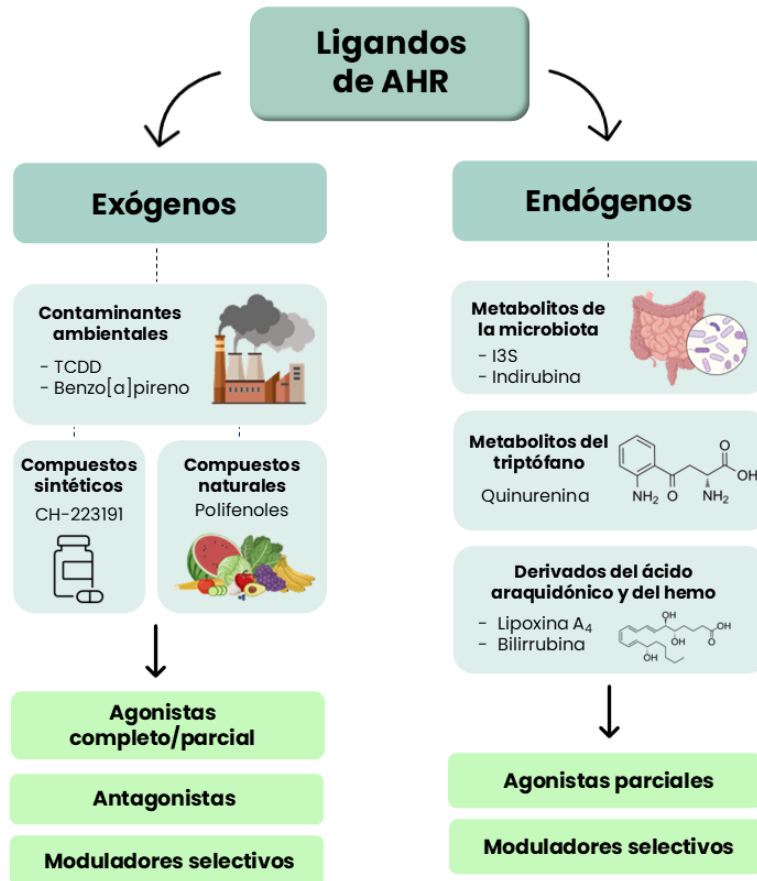
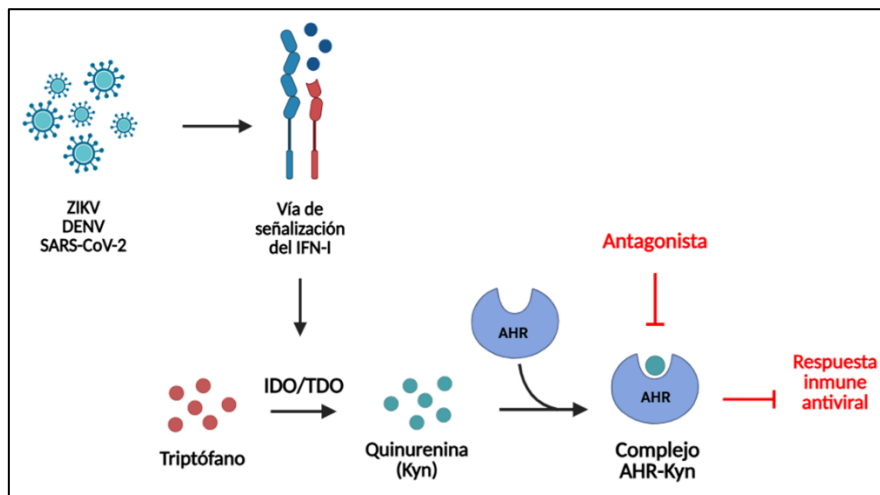


Figura 15. Clasificación de los ligandos de AHR.

#### 4. AHR en el contexto de las infecciones virales

Investigaciones previas realizadas en nuestro laboratorio han establecido que durante la infección con ZIKV, DENV y SARS-CoV-2, la activación de la vía del interferón tipo I (IFN-I) induce la sobreexpresión de las enzimas indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO) y triptófano-2,3-dioxigenasa (TDO), responsables de catalizar la conversión de triptófano a Kyn. Este metabolito actúa como ligando endógeno del receptor AHR, promoviendo

su activación, lo que limita las respuestas antivirales celulares mediadas por NF- $\kappa$ B e IFN-I, favoreciendo así la replicación viral. Los antagonistas de AHR (ej. CH-223191) limitan su activación, mejorando la respuesta antiviral y reduciendo la replicación viral tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (**Figura 16**)<sup>21,22</sup>. IFN-I y NF- $\kappa$ B desempeñan un papel central en la inmunidad antiviral, aunque su señalización desregulada puede derivar en inflamación e inmunopatología. Dado que el IFN-I y otras citoquinas pueden inducir la expresión de AHR, se sugiere que este factor participa en un circuito de retroalimentación negativa que busca limitar el daño inmunopatológico<sup>23</sup>. De hecho, se ha demostrado que AHR restringe la actividad de células inmunes innatas y linfocitos T efectoras<sup>48</sup>. Estos hallazgos proporcionan apoyo a la hipótesis de que ZIKV emplea mecanismos inmunorreguladores mediados por AHR para evadir la respuesta inmune.



**Figura 16.** Activación de AHR durante las infecciones virales.

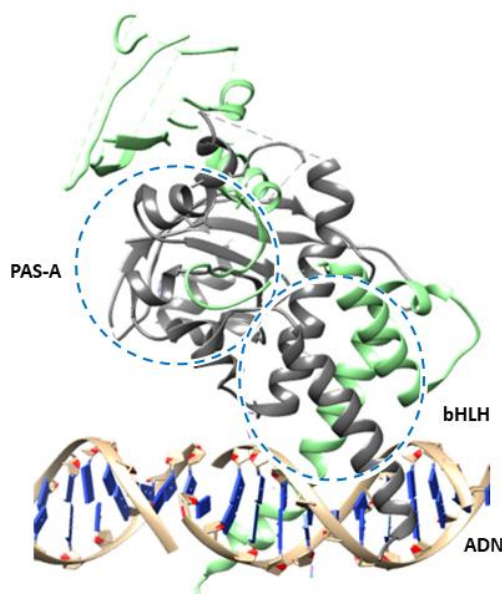
La pandemia ocasionada por SARS-CoV-2 afectó principalmente la actividad experimental durante el primer año del doctorado, por lo que se optó por realizar estudios *in silico* que permitieron iniciar con el desarrollo de la tesis. Basándose en estos antecedentes, el primer paso fue investigar la posible interacción de distintos compuestos naturales con AHR, con el objetivo de identificar posibles antagonistas capaces de bloquear su efecto proviral.

## Resultados

### Estudios *in silico*

#### 1. Caracterización del dominio PAS-B

La búsqueda en UniProt nos permitió determinar que el AHR humano (hAHR) tiene una longitud de 848 aminoácidos y que el dominio PAS-B se encuentra localizado del aminoácido 275 al 342. Hasta el año 2022, solo una región de 254 aminoácidos del hAHR se encontraba cristalizada y disponible en la base de datos RSCB PDB (PDB ID: 5NJ8) (**Figura 17**). Esta región abarcaba los aminoácidos 23 al 273, es decir el dominio PAS-B no estaba resuelto. La proteína se encontraba en su forma de heterodímero con ARNT y unida al ADN. El método de obtención fue difracción de rayos X y la resolución 3,30 Å. Las proteínas de gran tamaño o aquellas con múltiples dominios como lo es AHR son difíciles de cristalizar debido a su complejidad estructural y funcional. AHR contiene regiones intrínsecamente desordenadas que no adoptan una estructura fija. Estas regiones pueden interferir con la cristalización al introducir heterogeneidad y desorden en el cristal<sup>49</sup>. En particular, el dominio PAS-B es muy flexible y puede adoptar múltiples conformaciones en respuesta a la unión a diferentes ligandos y a otras proteínas como ARNT<sup>50</sup>. Esta flexibilidad puede dificultar la formación de cristales estables y ordenados. Además, como se mencionó anteriormente, AHR forma complejos con distintas proteínas, como Hsp90 y XAP2. Estas interacciones pueden complicar la cristalización del receptor en su forma nativa o funcionalmente relevante. La cristalización de complejos multiproteicos es más difícil debido a la necesidad de cristalizar simultáneamente varias proteínas en una conformación específica. Adicionalmente, AHR puede sufrir diversas modificaciones postraduccionales que afectan su conformación y estabilidad<sup>51</sup>. Estas modificaciones pueden introducir heterogeneidad en la muestra, dificultando el proceso de cristalización<sup>52</sup>.



**Figura 17.** Estructura cristalizada AHR (gris) en complejo con ARNT (verde) y el ADN (beige) visualizado en UCSF Chimera.

Se ha reportado que el dominio PAS-B es principalmente hidrofóbico. Esta característica se corresponde con el tipo de ligandos con los que interactúa, muchos de los cuales son moléculas apolares y lipofílicas. La hidrofobicidad del dominio PAS-B facilita la interacción con estos ligandos hidrofóbicos a través de interacciones no polares como las interacciones  $\pi$ - $\pi$  *stacking* y las fuerzas de Van der Waals. Los aminoácidos hidrofóbicos, como la fenilalanina, la leucina, la isoleucina y el triptófano, predominan en el sitio de unión, creando un entorno favorable para la estabilización de este tipo de ligandos. Sin embargo, a pesar de esta característica, el dominio PAS-B también exhibe una notable capacidad para interactuar con ligandos más polares o hidrofílicos. Esta versatilidad se explica por la presencia de residuos polares dentro del bolsillo de unión, como histidina, ácido glutámico, ácido aspártico y arginina, que permiten la formación de enlaces de hidrógeno e interacciones iónicas<sup>53</sup>. Un ejemplo de ello es el ligando I3S, una molécula de carácter hidrofílico que ha demostrado capacidad de unión al PAS-B<sup>54</sup>. Así, el receptor posee una capacidad de unión a ligandos estructuralmente diversos, permitiendo la interacción tanto con compuestos altamente hidrofóbicos como con otros de naturaleza más polar.

## 2. Generación de la estructura 3D

Como no se disponía de una estructura cristalográfica del dominio PAS-B de AHR, se descargó su secuencia de aminoácidos en formato FASTA y se realizó una búsqueda de homologías estructurales mediante la herramienta BLAST, restringida a la base de datos del PDB, con el fin de identificar una estructura 3D adecuada para modelar dicho dominio.

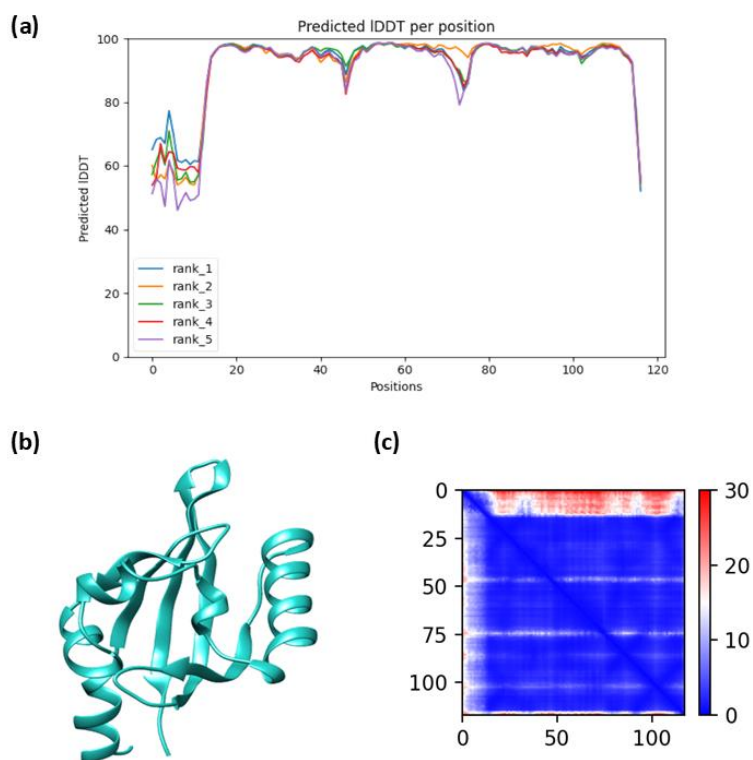
El alineamiento arrojó como resultado más cercano al factor 1- $\alpha$  inducible por hipoxia (*Hypoxia-inducible factor 1-alpha*; HIF-1 $\alpha$ ), cuya estructura (PDB: 4ZPR) presenta un 31,48 % de identidad de secuencia y fue resuelta por cristalografía de rayos X a 3,90 Å de resolución<sup>55</sup>. Cabe aclarar que este análisis se realizó en 2020, durante la etapa inicial del doctorado, en base a las estructuras disponibles en la base de datos del PDB en ese momento. En años posteriores, se incorporaron modelos estructurales más recientes, con mayor identidad de secuencia, los cuales se describen más adelante.

Debido a que el porcentaje de identidad encontrado en ese momento está por debajo del umbral recomendado para modelado por homología (menor del 30-35 %), se procedió en una primera instancia a generar el dominio PAS-B de AHR mediante un enfoque alternativo basado en aprendizaje automático (*machine learning*)<sup>56,57</sup>.

### 2.1. PAS-B generado por AlphaFold

Se utilizó la secuencia de aminoácidos de PAS-B de hAHR en formato FASTA descargada previamente. Se obtuvieron 5 modelos, el modelo más preciso de PAS-B generado por AlphaFold2 se encuentra representado en la **Figura 18b**. Los gráficos pLDDT (*Predicted Local Distance Difference Test*) y PAE (*Predicted Aligned Error*) de los cinco modelos se pueden observar en la **Figura 18a** y **18c**, respectivamente. AlphaFold proporciona puntuaciones de confianza para sus predicciones. La puntuación más común es el pLDDT, que indica la confianza en la posición de cada residuo en la estructura predicha en una escala de 0 a 100. Puntuaciones más altas indican una mayor confianza en la precisión de la estructura predicha. Por otro lado, el PAE es una matriz que proporciona información sobre el error esperado en las posiciones relativas de diferentes partes de la proteína. Esta matriz determina la incertidumbre en las relaciones espaciales entre distintas regiones de la estructura de la proteína. En el gráfico de pLDDT del modelo

generado se observa que, en los extremos del dominio, los valores de pLDDT son bajos, especialmente en el extremo N-terminal, lo que indica zonas donde no se pudo predecir la estructura con una alta confianza. Esto se encuentra en concordancia con el análisis del PAE, el cual presenta una zona entre 0 y 25, lo que representa un alto error. Adicionalmente, se observan dos picos en las posiciones de 50 y 80, esto corresponde a aminoácidos que se encuentran ubicados en bucles.

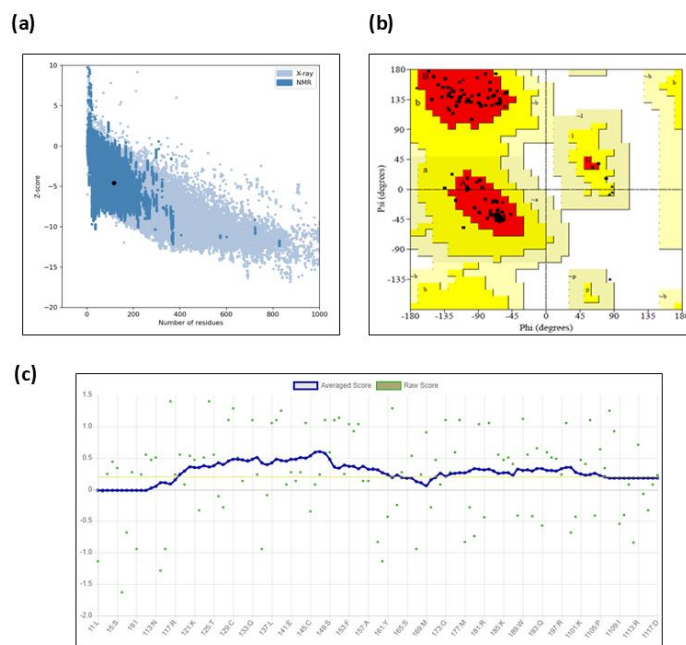


**Figura 18.** Resultados de AlphaFold2 de PAS-B. **(a)** pLDDT predicho para los modelos; **(b)** Estructura 3D del modelo más preciso; **(c)** PAE calculado para dicho modelo. El gradiente de colores, que va desde el rojo hasta el azul, indica áreas de baja y alta confianza, respectivamente, en la predicción de la estructura de la proteína.

Una vez obtenido el modelo, se procedió a evaluar su calidad estructural utilizando los servidores SAVESv6.0 y ProSA. ProSA mostró una puntuación Z de -4,6, esto representa que el modelo es comparable con proteínas cristalizadas por resonancia magnética nuclear (RMN), lo que indica una calidad óptima (**Figura 19a**) (**Tabla 3**).

Por otro lado, la herramienta PROCHECK del servidor SAVES indicó que el modelo tiene un 95,1% de los residuos en las regiones más favorecidas (**Figura 19b**) (**Tabla 3**). Finalmente, Verify3D predijo que el 68,38% de los residuos del modelo generado por AlphaFold2 tenían un  $score\ 3D-1D \geq 0,2$  (**Figura 19c**) (**Tabla 3**), lo que indica que la

estructura generada no supera los estándares de calidad. Verify3D establece que un modelo debe tener más del 80% de los residuos de aminoácidos con puntaje  $\geq 0.2$  en el perfil 3D/1D.



**Figura 19.** Calidad esteoquímica del modelo generado por AlphaFold2. **(a)** Gráfico generado por ProSA **(b)** Gráfico de Ramachandran. El color rojo muestra el área favorable de residuos estructurales. El amarillo brillante muestra las regiones permitidas. El amarillo claro representa las regiones poco permitidas mientras que el color amarillo más tenue muestra las regiones de residuos no permitidas. **(c)** Gráfico generado por Verify3D.

**Tabla 3.** Puntuaciones y estadística de los servidores utilizados para evaluar la calidad del modelo de AlphaFold2.

ProSA (Puntaje Z)	Estadística del gráfico de Ramachandran				Verify3D
	Regiones favorables	Regiones permitidas	Regiones poco permitidas	Regiones no permitidas	
-4,6	97 (95,1%)	5 (4,9%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	68,38 %

### 2.1.1. Docking molecular con el modelo generado por AlphaFold

En primera instancia, se evaluó la interacción del dominio PAS-B con dos ligandos bien caracterizados: el agonista TCDD y el antagonista CH-223191, mediante *docking* molecular. Dado que estas interacciones han sido ampliamente estudiadas, se esperaba una alta afinidad de unión. Sin embargo, las energías obtenidas fueron de  $-5,26$  kcal/mol para TCDD y  $-6,21$  kcal/mol para CH-223191. Si bien no existe un valor umbral

universalmente aceptado para definir una interacción de alta afinidad, en general se considera que valores inferiores a  $-7.0$  kcal/mol indican una unión estable y específica<sup>58,59</sup>. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio sugieren una interacción de baja afinidad entre los ligandos y el modelo de proteína analizado.

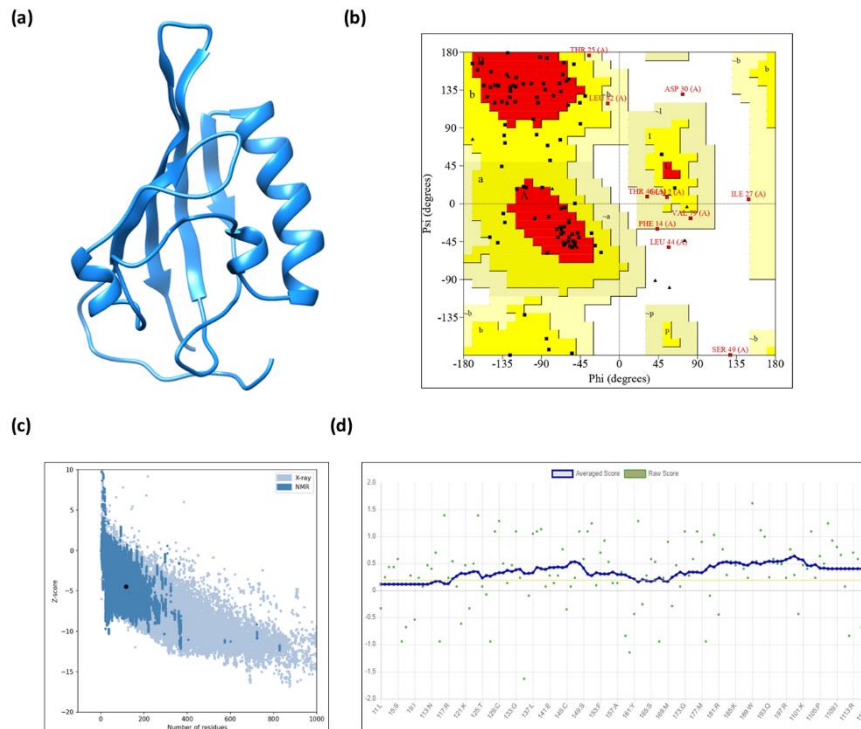
Dado que los resultados de Verify3D indicaron que el modelo no presentaba una calidad estructural aceptable, y que además los estudios de *docking* mostraron resultados poco satisfactorios, se optó por utilizar una estrategia alternativa basada en modelado por homología para generar una nueva estructura proteica.

## 2.2. Método basado en modelado por homología

### 2.2.1. Modelo construido utilizando al heterodímero HIF-2 $\alpha$ :ARNT como plantilla

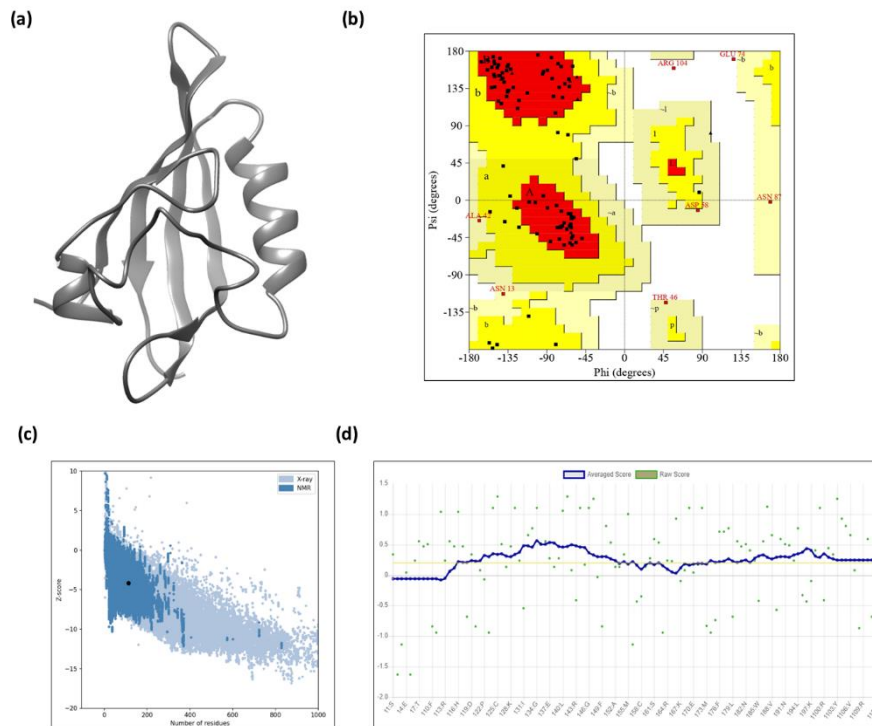
Para modelar la estructura se utilizaron tres servidores distintos: SWISS-MODEL, I-TASSER y Phyre2. Con el objetivo de comparar estos resultados y elegir el modelo con la calidad estructural óptima, se validaron los modelos con PROCHECK, Verify3D, y ProSA.

En el análisis del gráfico de Ramachandran del modelo generado por I-TASSER, solo el 65,7% de los residuos se ubicaron en regiones favorablemente permitidas, lo cual indica una calidad estructural subóptima, ya que los modelos bien conformados suelen presentar más del 90% de sus residuos en estas regiones (**Figura 20b**). El puntaje obtenido en ProSA fue de  $-4,48$ , valor considerado aceptable para proteínas de tamaño similar. Verify3D indicó que el 81,2% de los residuos presentaron compatibilidad entre la estructura y su secuencia, superando levemente el umbral mínimo aceptable (**Figura 20c**).



**Figura 20.** Análisis de calidad del modelo de PAS-B generado por I-TASSER. **(a)** Estructura del modelo. **(b)** Gráfico de Ramachandran. **(c)** Resultados de ProSA. **(d)** Resultado de Verify3D.

Por otro lado, Phyre2 utiliza un método híbrido o integrado ya que combina diferentes enfoques de modelado por homología, como TBM y *threading*, para mejorar la precisión y la cobertura de la predicción estructural. Los resultados indicaron que, si bien la estructura 3D construida por Phyre2 obtuvo una puntuación Z de -4,19, lo que indica una calidad estructural similar a proteínas resueltas por RMN, el modelo no cumplió con los estándares de calidad de PROCHECK y Verify3D. El gráfico de Ramachandran indicó que solo el 78% de los residuos se encontraban en las regiones más favorecidas y Verify3D estableció que solo el 71,7% de los residuos tuvieron una puntuación promedio 3D-1D  $\geq 0,2$  (Figura 21 y Tabla 4).



**Figura 21.** Análisis de calidad del modelo de PAS-B generado por Phyre2. **(a)** Estructura del modelo. **(b)** Gráfico de Ramachandran. **(c)** Resultados de ProSA. **(d)** Resultado de Verify3D.

Como se mencionó anteriormente, SWISS-MODEL se basa en el método de TBM y además de construir la estructura de una proteína, este software ofrece herramientas de evaluación para determinar la calidad y confiabilidad de los modelos generados, proporcionando métricas como la puntuación Z, QMEAN, y GMQE. Estas métricas ayudan a evaluar la fiabilidad y precisión del modelo generado. Además, el servidor muestra el alineamiento entre la secuencia de la proteína objetivo y la secuencia de la plantilla, mostrando qué partes de la secuencia se alinean bien y dónde puede haber gaps o regiones mal alineadas. Adicionalmente, el servidor provee información como posibles problemas en el modelo construido (ej. regiones que no se alinearon bien) y una comparación entre las estructuras 3D de la plantilla y el modelo. Por otro lado, se calculó el RMSD entre el modelo generado y la estructura cristalográfica utilizada como plantilla con el objetivo de evaluar la fidelidad estructural del modelo obtenido, ya que este parámetro permite cuantificar qué tan similar es un modelo teórico a una estructura experimental de referencia.

La estructura del dominio se generó utilizando como plantilla la estructura cristalina del heterodímero HIF-2 $\alpha$ :ARNT unido a proflavina ("Heterodimeric HIF-2 $\alpha$ :ARNT Complex

with Proflavine"; PDB: 4ZPH), determinada por difracción de rayos X con una resolución de 2,8 Å<sup>55</sup>. Esta estructura fue preferida por sobre HIF-1α (PDB: 4ZPR) previamente mencionado, debido a diferencias funcionales relevantes.

Tanto HIF-1α como HIF-2α, al igual que AHR, pertenecen a la superfamilia bHLH-PAS y contienen los dominios PAS-A y PAS-B, lo que las vuelve estructuralmente compatibles como moldes para modelado<sup>60</sup>. Sin embargo, existen diferencias funcionales importantes entre ambas isoformas<sup>61</sup>.

HIF-1α no se activa por unión directa a un ligando; su regulación ocurre a nivel postraducciona: en condiciones normóxicas, la subunidad α es hidroxilada y degradada por el proteasoma, mientras que bajo hipoxia esta degradación se inhibe, permitiendo su acumulación, translocación nuclear y dimerización con ARNT<sup>55,62</sup>. Por esta razón, la conformación del dominio PAS-B en HIF-1α no representa un estado funcional activado por unión de ligandos y, por lo tanto, no es ideal para modelar interacciones moleculares mediante *docking*.

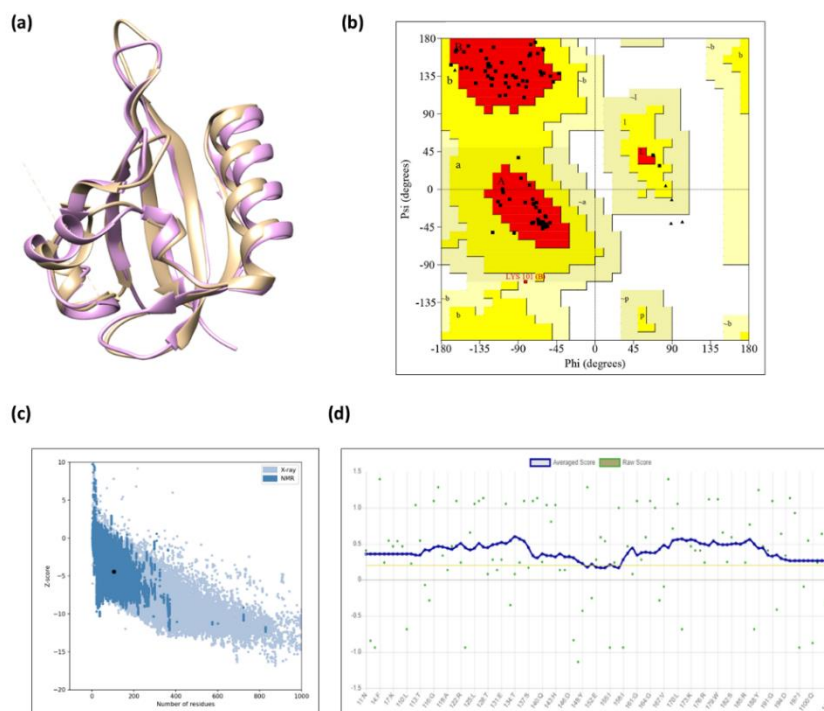
En cambio, el heterodímero HIF-2α:ARNT (PDB: 4ZPH) ha sido reportado como capaz de unir ligandos pequeños en su dominio PAS-B<sup>63,64</sup>. Aunque el ligando cocrystalizado (proflavina) en esta estructura no se encuentra dentro del PAS-B, este molde se consideró más adecuado que el de HIF-1α porque el PAS-B de HIF-2α posee una cavidad interna funcional, validada estructuralmente, que ha sido ampliamente utilizada como referencia para modelar el dominio PAS-B de AHR en estudios previos de *docking* molecular<sup>65</sup>.

Cabe destacar que, a pesar de que la identidad de secuencia de HIF-2α fue ligeramente menor (27,59 %), se optó por esta plantilla atendiendo a la necesidad de reflejar una conformación estructural biológicamente plausible para la unión de ligandos. Modelar sobre una estructura con cavidad funcional y potencial actividad de unión mejora significativamente la precisión y relevancia biológica del *docking* molecular, al permitir identificar interacciones clave en un sitio de unión preformado y adaptar el receptor a conformaciones compatibles con ligandos<sup>66</sup>.

El modelo construido por SWISS-MODEL se muestra en la **Figura 22a**. El RMSD calculado fue 1,127 Å, este valor se encuentra dentro del rango considerado aceptable (<2 Å), es

decir, el modelo presenta una baja desviación y una alta fidelidad respecto a la estructura experimental utilizada. La puntuación QMEAN fue -1,60 y el GMQE fue 0,66. El GMQE es un valor entre 0 y 1, donde valores más altos indican mayor confiabilidad del modelo. En cambio, el QMEAN refleja el grado de desviación del modelo respecto a estructuras experimentales de alta resolución; valores cercanos a 0 indican buena calidad, mientras que valores inferiores a -4 sugieren modelos de baja confiabilidad. Por lo tanto, estos resultados indican que el modelo es confiable y adecuado para los análisis estructurales posteriores.

La validación del modelo utilizando el gráfico de Ramachandran disponible con PROCHECK reveló que el 91,3% de los residuos se encontraban en las regiones más favorecidas, el 7,6% en las regiones permitidas, el 1,1% en las regiones generosamente permitidas y el 0,0% en las regiones no permitidas (**Figura 22b y Tabla 4**). El análisis con Verify3D mostró un 94,3 % de residuos con puntuaciones aceptables, cumpliendo con los estándares de calidad estructural (**Figura 22c y Tabla 4**).



**Figura 22.** Análisis de calidad del modelo de PAS-B generado por SWISS-MODEL utilizando al heterodímero HIF-2 $\alpha$ :ARNT como plantilla. **(a)** Superposición del modelo generado (rosa) y de la plantilla (beige). **(b)** Gráfico de Ramachandran. **(c)** Resultados de ProSA. **(d)** Resultado de Verify3D.

De acuerdo con los resultados obtenidos por los tres servidores, el modelo que cumplió con todos los criterios de calidad fue el generado por SWISS-MODEL (**Tabla 4**). Posteriormente, se evaluó la energía de unión de este modelo con los ligandos TCDD y CH-223191 mediante *docking* molecular, obteniéndose valores de -8,33 y -9,21 kcal/mol, respectivamente, lo que indica una alta estabilidad de los complejos. En función de estos resultados, se seleccionó el modelo de SWISS-MODEL para los estudios de *docking* posteriores.

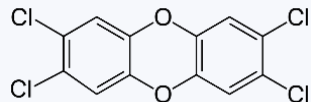
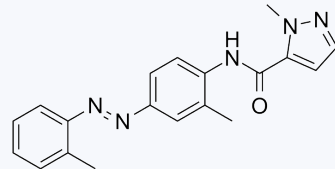
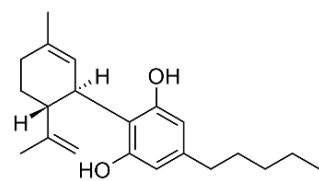
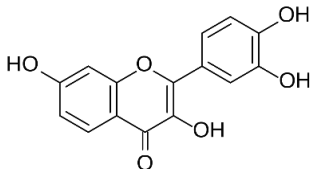
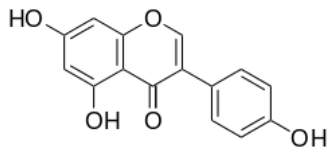
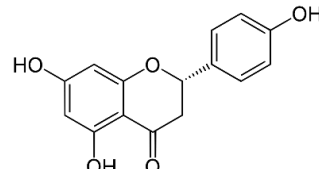
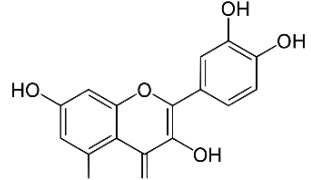
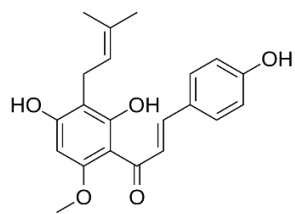
**Tabla 4.** Análisis calidad de las estructuras de PAS-B modeladas por I-TASSER, Phyre<sup>2</sup> y SWISS-MODEL utilizando al heterodímero HIF-2 $\alpha$ :ARNT como plantilla (PDB: 4ZPH).

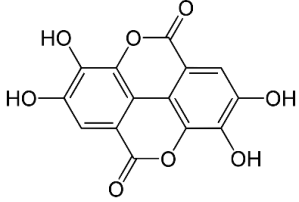
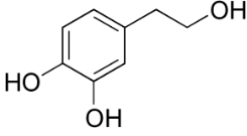
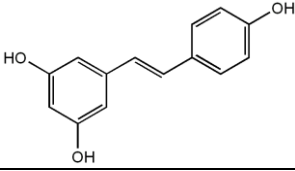
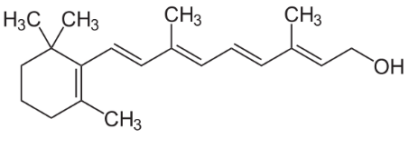
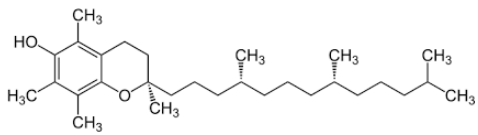
Servidor	Estadística del gráfico de Ramachandran				Verify3D	ProSA
	Regiones favorables	Regiones permitidas	Regiones poco permitidas	Regiones no permitidas		
I-TASSER	67 (65,7%)	25 (24,5%)	6 (5,9%)	4 (3,9%)	81,2%	-4,48
Phyre2	78 (78,0%)	15 (15,0%)	5 (5,0%)	2 (2,0%)	71,7%	-4,19
SWISS-MODEL	84 (91,3%)	7 (7,6%)	1 (1,1%)	0 (0,0%)	94,3%	-4,42

#### **2.2.1.1. Simulaciones de docking molecular del modelo generado utilizando al heterodímero HIF-2 $\alpha$ :ARNT como plantilla**

Para los ensayos de *docking* molecular se seleccionaron diversos bioactivos, muchos de los cuales se comercializan como suplementos nutricionales o poseen antecedentes de uso terapéutico. Esta estrategia, basada en el reposicionamiento de compuestos con perfiles de seguridad conocidos, permitió enfocar la búsqueda en moléculas con potencial aplicabilidad farmacológica. Los compuestos elegidos, así como los ligandos control (TCDD y CH-223191) se encuentran en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Estructuras químicas de los compuestos naturales seleccionados.

	Compuesto	Nombre químico	Estructura química
Ligandos de AHR (controles)	TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina	
	CH-223191	N-(2-methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-2-methyl-2H-pyrazole-3-carboxamide	
Cannabinoides	CBD	5-Pentil-1,3-bencenodiol	
Polifenoles flavonoides	Fisetina	3,7,3',4'-Tetrahidroxiflavona	
	Genisteína	5,7,4'-Trihidroxiflavona	
	Naringenina	5,7,4'-Trihidroxiflavano	
	Quercetina	3,3',4',5,7-Pentahidroxiflavona	
	Xantohumol	2',4,4',6'-Tetrahidroxi-3'-prenilchalcona	

Polifenoles no flavonoides	Ácido elágico	Ácido 2,3-dihidroxi-5,10-diona	
	Hidroxitirosol	4-(2-Hidroxietil) benzendiol	
	<i>trans</i> -resveratrol	3,5,4'-Trihidroxiestilbeno	
Vitaminas liposolubles	Vitamina A	<i>trans</i> -retinol	
	Vitamina E	$\alpha$ -Tocoferol	

Los resultados del *docking* molecular permitieron identificar varios compuestos con alta afinidad de unión al receptor. Como se observa en la **Tabla 6**, las vitaminas A y E, el CBD y el xanthohumol formaron los complejos más estables.

A partir de los resultados obtenidos, se llevaron a cabo los primeros ensayos *in vitro*, seleccionando las vitaminas A y E, las cuales fueron los primeros bioactivos disponibles en el laboratorio, gracias a la donación proporcionada por el Laboratorio Raymos S.A.I.C. Este experimento constituyó la validación empírica de las predicciones realizadas *in silico*, permitiendo contrastar la concordancia entre los modelos computacionales y la realidad observada a nivel celular y molecular.

**Tabla 6.** Energía de unión de los complejos obtenidos por *docking* molecular utilizando el modelo generado por homología a partir del heterodímero HIF-2 $\alpha$ :ARNT.

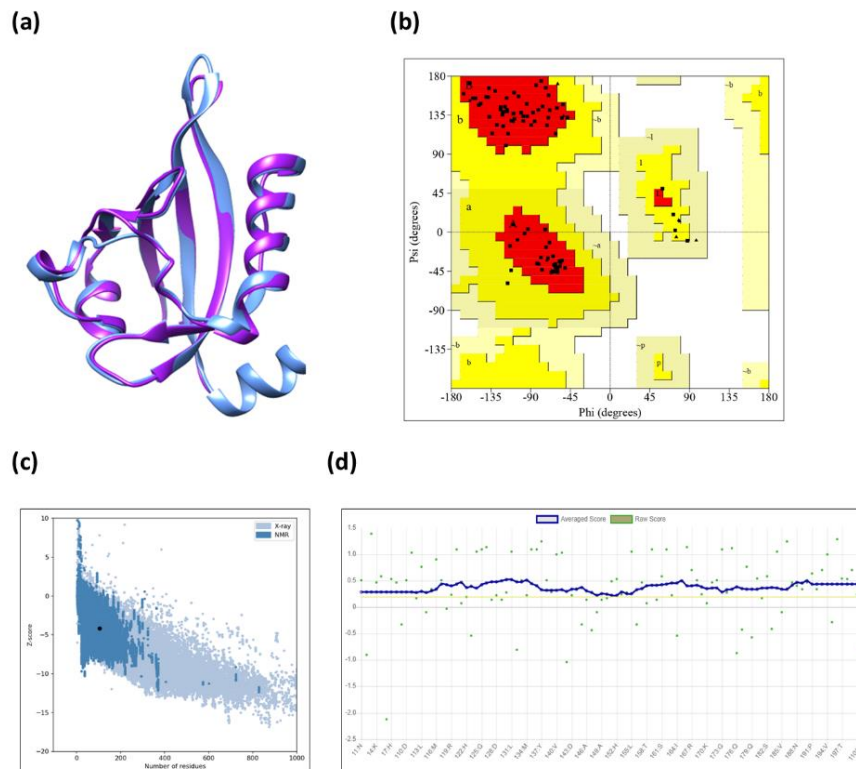
Compuesto	Energía de unión (kcal/mol)
TCDD	-8,33
CH-223191	-9,21
<b>CBD</b>	<b>-9,26</b>
Fisetina	-7,52
Genisteína	-7,65
Naringenina	-8,58
Quercetina	-7,34
<b>Xanthumol</b>	<b>-10,91</b>
Ácido elágico	-6,97
Hidroxitirosol	-4,72
<i>trans</i> -resveratrol	-7,42
<b>Vitamina A</b>	<b>-9,84</b>
<b>Vitamina E</b>	<b>-13,23</b>

### **2.2.2. Modelo construido utilizando el dominio PAS-B de *Drosophila melanogaster* como plantilla**

En el año 2022 se publicó en la base de datos RCSB PDB, la estructura PAS-B unida al antagonista  $\alpha$ -naftoflavona de *Drosophila melanogaster* (PDB: 7VNH)<sup>32</sup>. Este cristal se había resuelto por difracción de rayos X con una resolución de 2,40 Å y presentaba un 45% de identidad con el dominio PAS-B del hAHR, un valor E2e-34 y una cobertura de la secuencia del 93%. El porcentaje de identidad era significativamente más alto que el heterodímero HIF-2 $\alpha$ :ARNT utilizado anteriormente por lo que se generó un nuevo modelo de PAS-B utilizando como plantilla esta estructura.

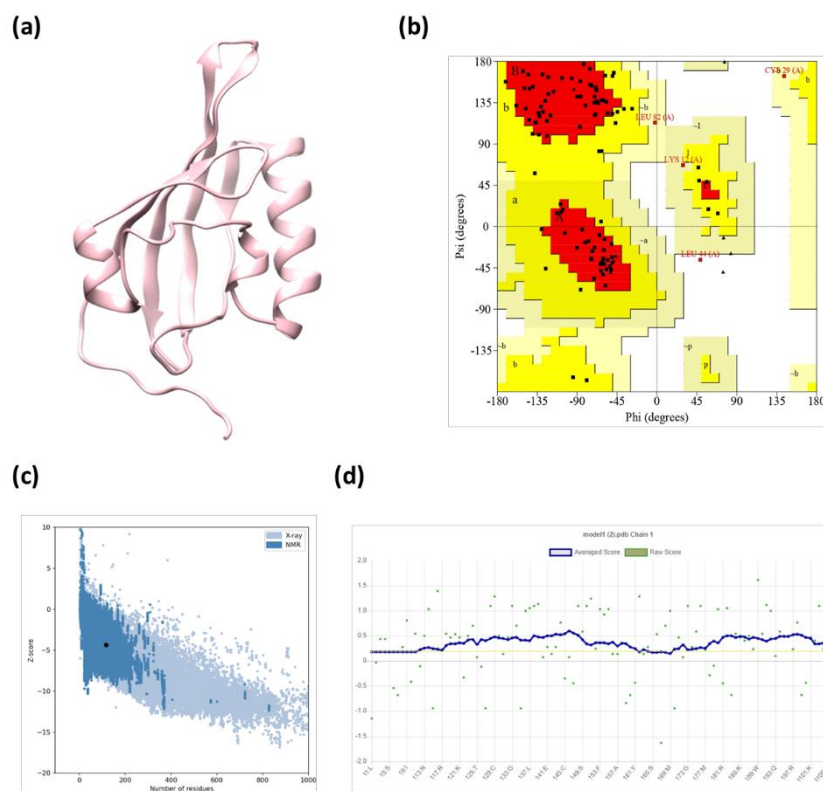
Se generó la estructura de PAS-B utilizando SWISS MODEL, I-TASSER y Modeller. Posteriormente, basándonos en los parámetros de calidad informados por los programas PROCHECK, Verify3D y ProSA, seleccionamos la mejor proteína para llevar a cabo las simulaciones de *docking* molecular. Estos resultados están resumidos en la **Tabla 7**.

El RMSD entre el modelo generado por SWISS MODEL y la estructura cristalina fue de 0,594 Å (**Figura 23a**). Considerando que un modelo confiable suele tener valores de RMSD por debajo de 2 Å, la construcción del modelo se llevó a cabo con éxito. La validación del modelo utilizando el gráfico de Ramachandran reveló que el 92,3% de los residuos estaban en las regiones más favorecidas, el 7,7% en regiones permitidas, el 0,0% en regiones generosamente permitidas y el 0,0% en las regiones no permitidas (**Figura 23b**). Las estadísticas del gráfico de parámetros sugirieron que la calidad del modelo predicho era óptima (**Tabla 7**). El Z-score calculado por la herramienta ProSA para el modelo fue -4,17, que se encuentra dentro del rango de puntajes típicamente encontrados para estructuras proteicas de tamaño similar obtenidas por RMN (**Figura 23c**). El factor de calidad de los residuos del dominio AHR cuando se evaluó mediante el servidor Verify3D mostró que el 88,42% de los residuos tenían un puntaje promedio 3D-1D  $\geq 0,2$ , lo que representa un buen puntaje (**Figura 23d**).



**Figura 23.** Validación del LBD del AHR generado por SWISS MODEL. **(a)** Alineamiento entre el modelo (violeta) y 7VNH (azul). **(b)** Gráfico de Ramachandran. **(c)** Puntaje Z estimado por ProSA. **(d)** Factor de calidad de los residuos calculado por Verify3D.

Por otro lado, el gráfico de Ramachandran correspondiente al modelo generado por I-TASSER mostró que el 76,5% de los residuos se ubicaron en regiones favorablemente permitidas (**Figura 24b**). Considerando que PROCHECK indica que un buen modelo tiene más del 90% de residuos en un área favorable, este modelo no cumple con los estándares de calidad. Verify3D reportó que el 85,47% de los residuos tienen un puntaje promedio 3D-1D  $\geq 0,2$  y el z-score calculado por ProSA fue -4,17, lo que representan valores aceptables (**Figura 24c y 24d**).



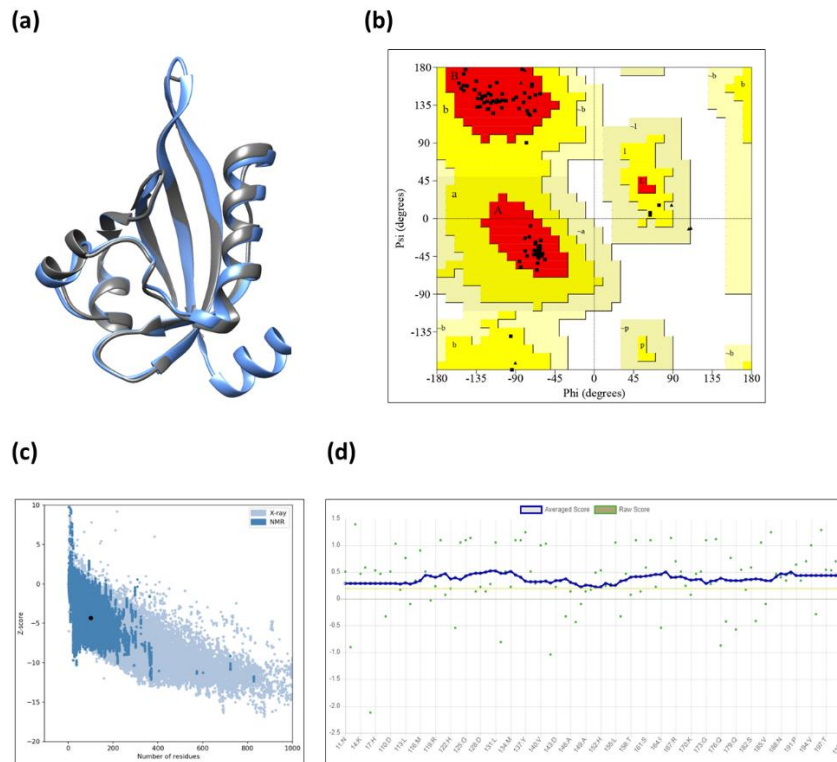
**Figura 24.** Validación del LBD del AHR generado por I-TASSER. **(a)** Modelo generado por el servidor. **(b)** Gráfico de Ramachandran. **(c)** Puntaje Z estimado por ProSA. **(d)** Factor de calidad de los residuos calculado por Verify3D.

En cuanto a la proteína generada por Modeller, el puntaje RMSD fue de 0,622 Å, lo que sugiere un modelo 3D confiable (**Tabla 7**). Como era de esperar, se observaron mayores diferencias entre el modelo y la estructura de referencia en los bucles (**Figura 25a**). El análisis PROCHECK de la estructura 3D muestra que el 93,4% estaba en la región favorecida y el 6,6% estaba en la región permitida sin ningún residuo de aminoácido en la región atípica del gráfico de Ramachandran (**Figura 25b**). Además, el factor de calidad de los residuos del servidor Verify3D mostró que el 100% de los residuos tenían un puntaje promedio 3D-1D  $\geq 0,2$ , lo que representa un excelente puntaje (**Figura 25d**). El Z-score calculado por ProSA fue -4,32, un puntaje típicamente encontrado en proteínas nativas de tamaño similar determinadas por RMN (**Figura 25c**).

Aunque el modelo generado por SWISS-MODEL cumple con los parámetros de calidad, seleccionamos el modelo generado por Modeller para llevar a cabo los estudios posteriores de acoplamiento molecular ya que la calidad de la proteína fue superior.

En cuanto a los resultados de *docking*, el complejo formado por el dominio AHR y TCDD mostró una energía de unión de -8,26 kcal/mol mientras que la estructura compuesta

por el dominio AHR y CH-223191 presentó una energía de -9,91 kcal/mol. En resumen, los resultados sugieren que el modelo construido por Modeller es razonablemente bueno en geometría y estereoquímica y es apropiado para los estudios de acoplamiento ligando-proteína.



**Figura 25.** Calidad del modelo generado por Modeller. **(a)** Alineamiento entre el modelo (gris) y 7VNH (azul). **(b)** Gráfico de Ramachandran. **(c)** Puntaje Z estimado por ProSA. **(d)** Factor de calidad de los residuos calculado por Verify3D.

**Tabla 7.** Análisis calidad de las estructuras de PAS-B modeladas por SWISS-MODEL, I-TASSER y Modeller utilizando al dominio PAS-B de *Drosophila* (PDB: 7VNH).

Servidor	Estadística del gráfico de Ramachandran				Verify3D (%)	ProSA
	Regiones favorables	Regiones permitidas	Regiones poco permitidas	Regiones no permitidas		
SWISS-MODEL	84 (92.3%)	7 (7.7%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	88.46	-4.17
I-TASSER	78 (76.5%)	20 (19.6%)	3 (2.9%)	1 (1.0%)	85.47	-4.36
Modeller	85 (93.4%)	6 (6.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	100	-4.32

### 2.2.2.1. Docking y dinámica molecular con el modelo utilizando el dominio PAS-B de *Drosophila melanogaster* como plantilla

En esta ocasión, se incorporó un ligando control adicional, la  $\alpha$ -naftoflavona, presente en la estructura cristalina de la plantilla seleccionada. La energía de unión obtenida para este compuesto fue de  $-11,26$  kcal/mol, lo que respalda la validez del modelo y la calidad del sitio de unión predicho.

Las energías de unión mostraron una tendencia similar entre el modelo generado por Modeller y el modelo generado con la plantilla heterodímero HIF-2 $\alpha$ :ARNT, lo que sugiere que la conformación global del sitio de unión se conserva razonablemente entre ambas predicciones. Los resultados indicaron que los cuatro compuestos con mayor afinidad por la proteína fueron las vitaminas A y E, el CBD y el xantohumol, lo que destaca su potencial como moduladores de AHR (**Tabla 8**).

**Tabla 8.** Energía de unión de los complejos obtenidos por *docking* molecular utilizando el modelo generado por homología a partir del dominio PAS-B de *Drosophila melanogaster*.

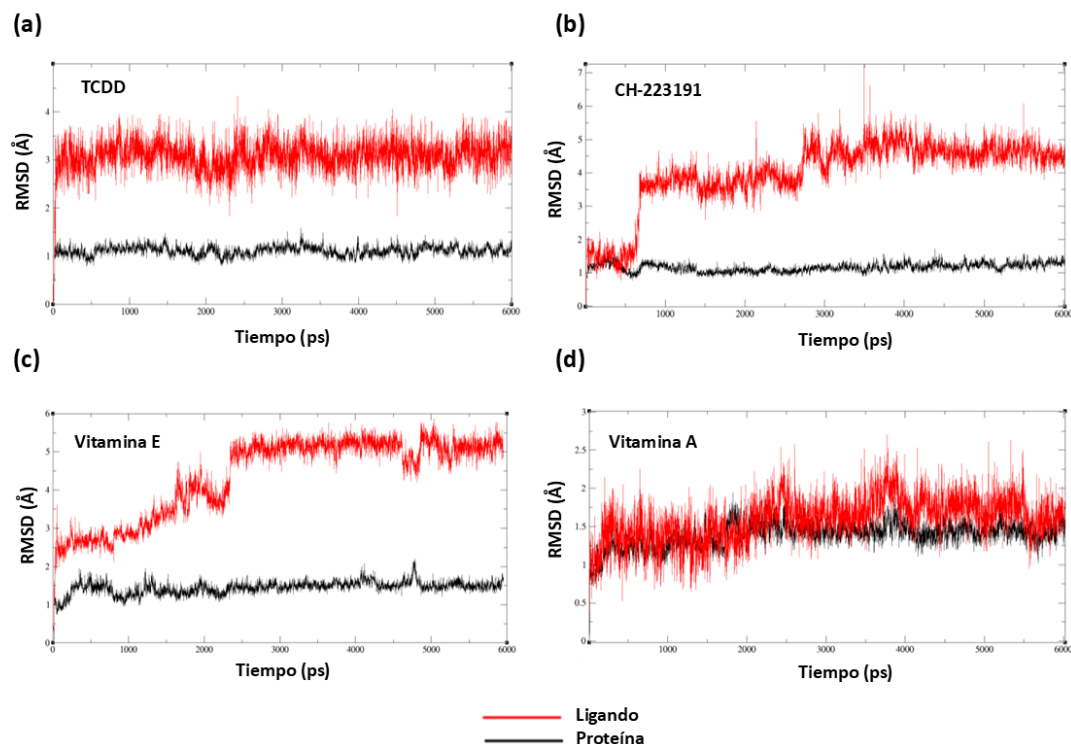
Compuesto	Energía de unión (kcal/mol)
$\alpha$ -naftoflavona	-11,26
TCDD	-8,26
CH-223191	-9,91
<b>CBD</b>	<b>-9,56</b>
Fisetina	-9,14
Genisteína	-8,38
Naringenina	-9,12
Quercetina	-8,20
<b>Xantohumol</b>	<b>-10,22</b>

Ácido elágico	-8,34
Hidroxitirosol	-5,92
<i>trans</i> -resveratrol	-7,85
<b>Vitamina A</b>	<b>-10,29</b>
<b>Vitamina E</b>	<b>-11,57</b>

En el marco de una colaboración con el Dr. Mariano Vera y la Dra. Priscila Ailín Castronuovo (INBIOTEC, Universidad Nacional de Mar del Plata - CONICET), se llevaron a cabo estudios de dinámica molecular para evaluar la estabilidad de los complejos más estables identificados por *docking*. Esta etapa permite considerar la flexibilidad estructural de las moléculas y simular condiciones más cercanas al entorno biológico, aportando información adicional sobre la persistencia y el comportamiento del complejo a lo largo del tiempo. Dado que los primeros estudios *in vitro* se realizaron con las vitaminas A y E, en una primera instancia se priorizó la evaluación de la estabilidad de sus respectivos complejos con AHR. Esta selección también se vio respaldada por los resultados de *docking* molecular, en los que las vitaminas mostraron las energías más favorables dentro de los cuatro compuestos mejor posicionados. Se utilizaron como ligandos controles TCDD y CH-223191. El complejo con TCDD presentó una estabilidad moderada del ligando (RMSD promedio = 3,082 Å) y una proteína estable (1,106 Å), con energías de interacción de -30,05 kcal/mol (PB) y -38,04 kcal/mol (GB) (**Figura 26a**). Por su parte, el antagonista CH-223191 mostró un mayor desplazamiento del ligando (3,982 Å), con una subida abrupta alrededor de los 1000 ps, mientras que la proteína permaneció estable (1,154 Å), con valores de energía similares a TCDD (**Figura 26b**).

En cuanto a los compuestos de interés, la vitamina E presentó el RMSD más elevado del ligando (4,349 Å), lo que sugiere una interacción menos estable o más flexible, aunque con energías de interacción muy favorables (-51,41 kcal/mol PB y -60,13 kcal/mol GB) (**Figura 26c**). En contraste, la vitamina A formó un complejo particularmente estable, con un RMSD bajo tanto para el ligando (1,587 Å) como para la proteína (1,385 Å), y energías de interacción moderadas (-32,13 kcal/mol PB y -42,68 kcal/mol GB) (**Figura 26d**). Estos

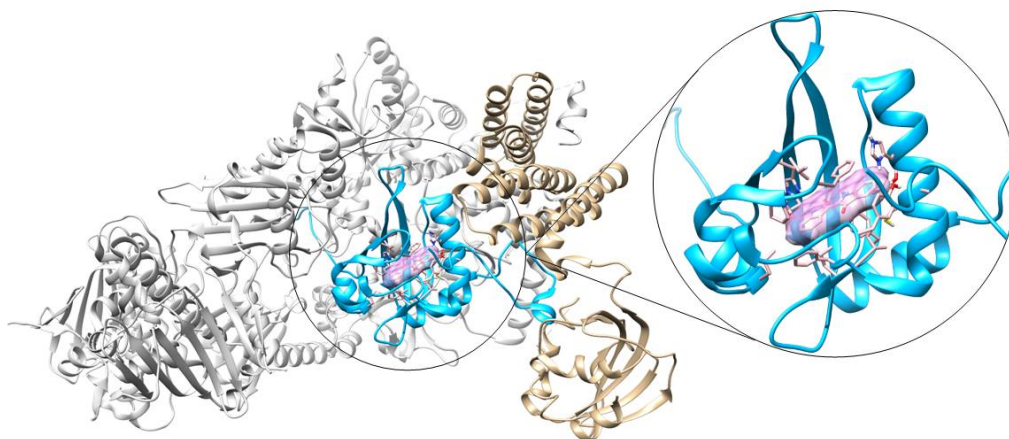
resultados sugieren que la vitamina A se comporta como un ligando estable y con buena afinidad hacia AHR, mientras que vitamina E podría interactuar fuertemente, aunque de forma menos rígida.



**Figura 26.** Dinámica estructural de los complejos entre AHR y distintos ligandos obtenida mediante simulaciones de dinámica molecular. Se representan los valores de RMSD para el ligando (línea roja) y la proteína (línea negra) en función del tiempo. Se incluyen los ligandos (a) TCDD (b) CH-223191 (c) Vitamina E (d) Vitamina A.

### 3. Simulaciones de *docking* y dinámica molecular utilizando el dominio PAS-B humano resuelto experimentalmente

Fines del año 2022 se depositó en la base de datos PDB RCSB, la primera estructura PAS-B humana (PDB: 7ZUB)<sup>53</sup>. La estructura de 2,85 Å del complejo PAS-B unido a indirubina con la chaperona Hsp90 y la cochaperona XAP2 fue resuelta por criomicroscopía electrónica (*cryo-EM*) (Figura 27).



**Figura 27.** Estructura del complejo Hsp90 (gris), XAP2 (beige) y PAS-B (celeste) en presencia de indirubina (rosa), determinada por cryo-EM (PDB: 7ZUB). El dominio PAS-B se encuentra ampliado para mayor claridad.

Si bien ya se habían realizado experimentos *in vitro* preliminares con las vitaminas y el CBD, se decidió complementar dichos resultados mediante estudios de *docking* molecular. Como parte del proceso de validación de la metodología, se realizó un ensayo de *redocking* utilizando la indirubina como ligando de referencia. Además, se calcularon los valores de energía de unión a partir de simulaciones de dinámica molecular, con el objetivo de obtener resultados más robustos y representativos del comportamiento del sistema en condiciones dinámicas.

El análisis de *docking* molecular reveló diferencias notables en los valores de energía de unión de diversos ligandos entre la proteína AHRh y los modelos generados por homología. Incluso los ligandos control, como TCDD y CH-223191, presentaron variaciones importantes según la estructura utilizada. Estas diferencias fueron aún más marcadas en el caso de varios polifenoles, como el ácido elágico, la fisetina, el resveratrol y la quercetina, que presentaron una energía de unión más favorable con el PAS-B humano. Un caso particular fue el de la vitamina E, que mostró una baja afinidad en el *docking* con la estructura cristalina ( $-7,7$  kcal/mol), pero una unión altamente favorable en estudios posteriores de dinámica molecular, con valores de  $-50,77$  kcal/mol (MMGBSA, *Molecular Mechanics/GB Surface Area*) y  $-41,03$  kcal/mol (MMPBSA), lo que indica una estabilización significativa del complejo en condiciones más dinámicas (**Tabla 9**).

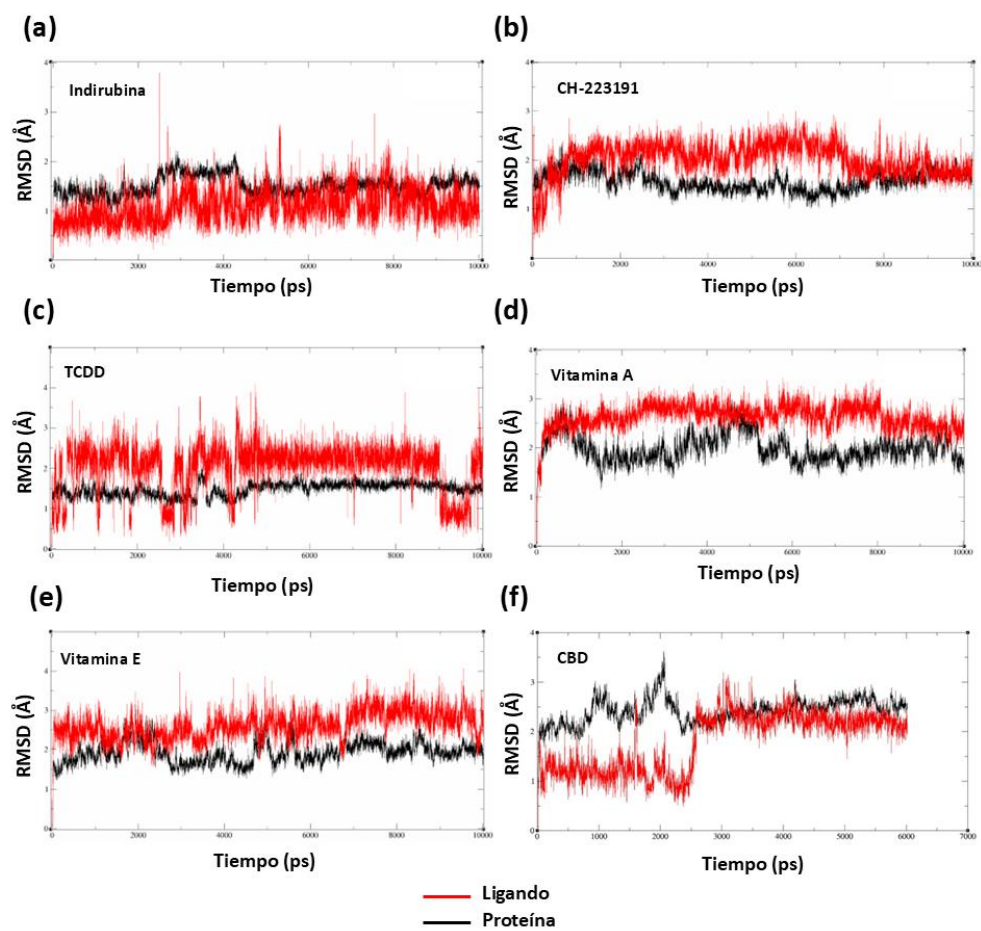
**Tabla 9.** Energías de unión de *docking* y dinámica molecular de los complejos formados con el cristal de AHRh.

Compuesto	<i>Docking</i> molecular	Dinámica molecular	
	Energía de unión (kcal/mol)	MMGBSA–GB (kcal/mol)	MMPBSA–PB (kcal/mol)
TCDD	-10,12	-40,11	-28,8
CH-223191	-7,8	-42,76	-29,37
$\alpha$ -naftoflavona	-12,19	-34,76	-19,07
Indirubina	-12,75 ( <i>redocking</i> )	-36,55	-29,3
CBD	-9,67	-22,12	-18,67
Fisetina	-10,32	-38,04	-31
Genisteína	-8,95	-31,01	-17,97
Naringenina	-10,2	-32,83	-24,02
Quercetina	-10,78	-37,72	-26,67
Xantohumol	-9,38	-32,13	-28,42
Ácido elágico	-10,78	-34,31	-28,36
Hidroxitirosol	-7,01	-23,32	-18,65
<i>trans</i> -Resveratrol	-9,26	-27,87	-17,99
Vitamina A	-9,1	-40,85	-31,08
Vitamina E	-7,7	-50,77	-41,03

Adicionalmente, se analizaron las trayectorias de dinámica molecular de los complejos entre AHR y distintos ligandos mediante el cálculo de RMSD para evaluar la estabilidad conformacional de la proteína y del ligando a lo largo del tiempo (**Figura 28**). Los ligandos

de referencia (indirubina, CH-223191 y TCDD) mostraron un comportamiento esperable: la proteína se mantuvo estable (RMSD  $\sim 1.5$  Å) y los ligandos presentaron desplazamientos moderados (entre 2 y 3 Å), sin grandes fluctuaciones. Las energías de unión obtenidas por MMPBSA estuvieron en el rango de -28,8 a -29,4 kcal/mol, lo cual confirma su alta afinidad y valida el sistema simulado (**Figura 28a, 28b y 28c**).

Entre los compuestos en estudio, la vitamina A mostró un perfil muy similar al de los controles: RMSD estable para la proteína y el ligando ( $\sim 3$  Å) y una energía de unión favorable (-31,08 kcal/mol por MMPBSA) (**Figura 28d**). En el caso de la vitamina E, se observó una energía de unión aún más favorable (-41,03 kcal/mol), aunque el RMSD del ligando fue levemente más variable (**Figura 28e**). Finalmente, el CBD presentó un comportamiento distintivo. Si bien su energía de unión fue considerablemente menor que la de los demás compuestos analizados (-18,67 kcal/mol por MMPBSA), se observó un perfil dinámico distinto: tras un inicio inestable, el ligando experimentó una reorganización conformacional entre los 2000–3000 ps, seguida de una estabilización sostenida (RMSD  $\sim 2$  Å). Esta dinámica puede sugerir una interacción más flexible con el receptor (**Figura 28f**).

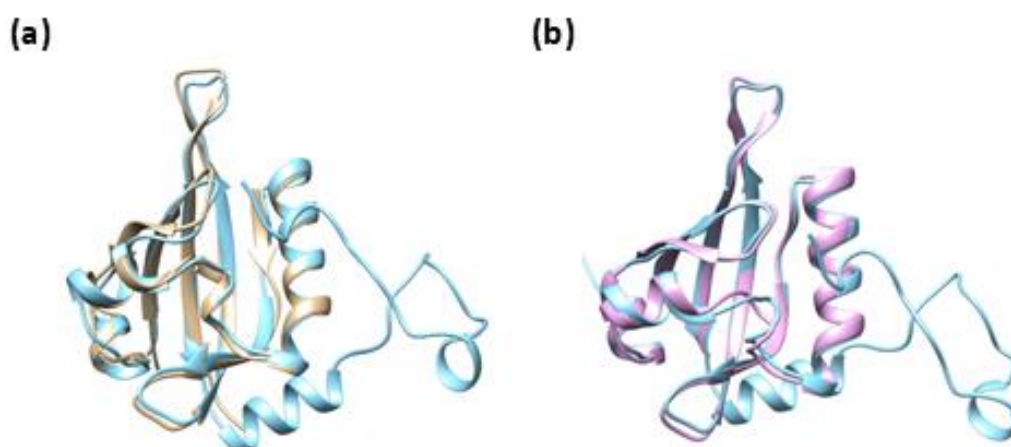


**Figura 28.** Dinámica estructural de los complejos entre AHR y distintos ligandos obtenida mediante simulaciones de dinámica molecular. Se representan los valores de RMSD para el ligando (línea roja) y la proteína (línea negra) en función del tiempo. Se incluyen los ligandos **(a)** Indirubina **(b)** CH-223191 **(c)** TCDD **(d)** Vitamina A **(e)** Vitamina E y **(f)** CBD.

#### 4. Comparación estructural entre modelos *in silico* y la referencia experimental

Dadas las importantes diferencias observadas entre los valores de energía de la estructura experimental (resuelta por cryo-EM) y las proteínas modeladas, se procedió a realizar una comparación estructural entre la estructura experimental y los modelos generados, utilizando *TM-align*. Los modelos generados por homología mostraron una alta similitud estructural con la proteína cristalizada, con *TM-scores* superiores a 0,9, lo que indica que mantienen el mismo pliegue 3D en la región funcional evaluada. El modelo generado con Modeller presentó una superposición más precisa (RMSD = 0,83 Å) respecto a la estructura cristalina que el modelo de SWISS-MODEL (RMSD = 1,29 Å), lo cual resulta coherente considerando que en ese caso se utilizó una plantilla con mayor

identidad de secuencia respecto al hAHR (**Figura 29**). Estas diferencias estructurales, aunque sutiles, podrían contribuir a las variaciones observadas en los valores de energía de unión obtenidos en los análisis de *docking* y dinámica molecular. No obstante, sería necesario un análisis más detallado para comprender en qué medida estas diferencias impactan específicamente en la interacción con cada ligando. Esta cuestión excede los objetivos del presente trabajo, pero se plantea como una posible línea de investigación futura.



**Figura 29.** Superposición estructural del dominio PAS-B del receptor AHR humano cristalizado (en celeste) con los modelos generados por homología. **(a)** Comparación con el modelo obtenido mediante SWISS-MODEL (beige). **(b)** Comparación con el modelo generado mediante Modeller (rosa).

## Estudios *in vitro*

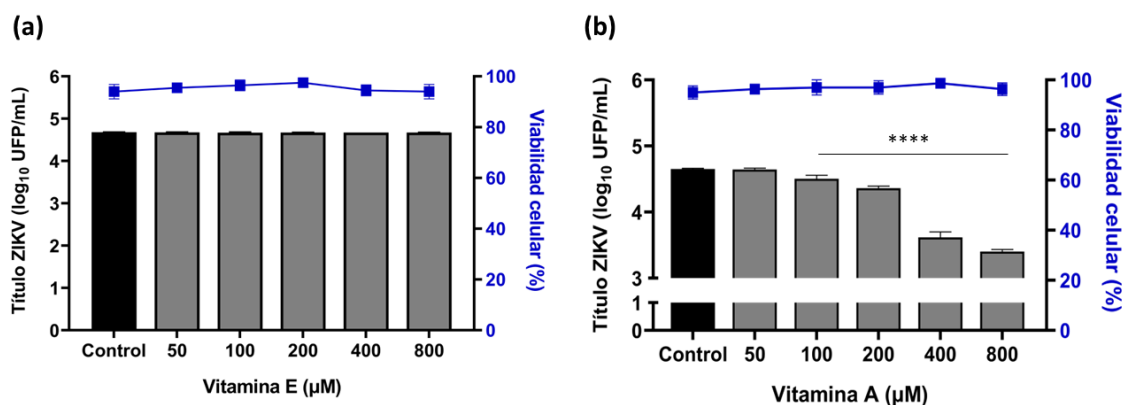
De acuerdo con los resultados obtenidos en los primeros ensayos *in silico* realizados mediante *docking*, los compuestos naturales que presentaron mayor afinidad por AHR fueron el CBD, el xanthumol y las vitaminas A y E. En función de su disponibilidad para los estudios experimentales, se seleccionaron el CBD y las vitaminas A y E para su evaluación *in vitro*. A continuación, se presentan los resultados obtenidos en relación con las vitaminas. En los capítulos subsiguientes, se abordaron los estudios relativos a la actividad antiviral del CBD y el mecanismo de unión subyacente a dicha actividad.

### 1. Actividad antiviral e impacto inmunomodulador de las vitaminas A y E frente al ZIKV

La infección por ZIKV puede provocar defectos congénitos en los recién nacidos, incluyendo alteraciones oculares significativas, y se ha demostrado que el RPE constituye

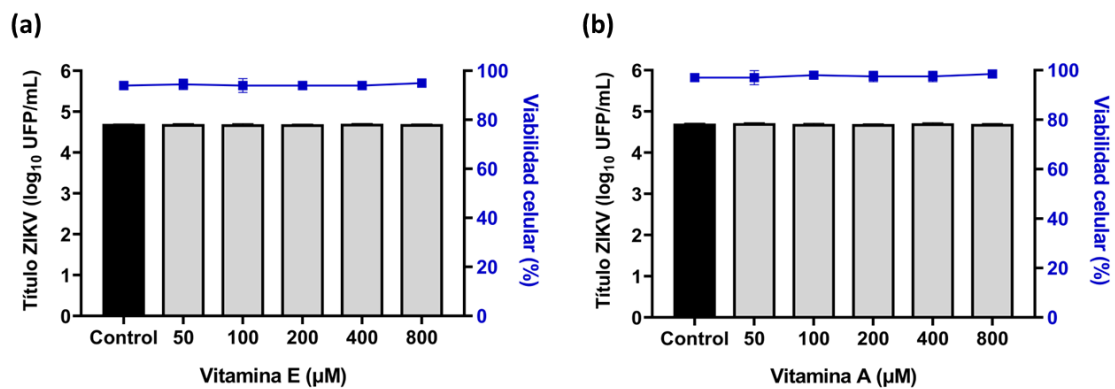
uno de los blancos primarios del virus. Además, existe evidencia de que la vía de señalización de AHR está activa en células hRPE, donde cumple un rol fundamental en la protección frente al estrés ambiental prolongado<sup>67-69</sup>. En base a estos antecedentes, los experimentos se llevaron a cabo en la línea celular hRPE. Estas células se caracterizan por poseer la capacidad de producir y responder a IFN-I, lo cual resulta crucial para evaluar el impacto de la activación de AHR en la infección viral<sup>70,71</sup>. Como se mencionó anteriormente, la activación de esta vía puede bloquear la producción de IFN-I, generando un efecto proviral. Por lo tanto, el hecho de trabajar con un sistema celular que conserve esta respuesta resulta esencial para estudiar cómo es que las vitaminas podrían modular la señalización de AHR e influir en la respuesta antiviral mediada por IFN durante la infección.

En primer lugar, se exploró el efecto de las vitaminas sobre la viabilidad de las células hRPE mediante la tinción con cristal violeta. Para ello, las células fueron expuestas durante 72 h a un amplio rango de concentraciones de vitaminas (50–800  $\mu\text{M}$ ). La **Figura 30** muestra que las vitaminas no ejercen efectos citotóxicos dentro del rango evaluado. A partir de estos resultados, se procedió a cuantificar los títulos virales tras el tratamiento con las vitaminas en las mismas concentraciones. La vitamina E no logró superar el 20 % de inhibición en ninguna de las condiciones evaluadas (**Figura 30a**). En cambio, la vitamina A mostró una reducción significativa en la replicación viral, alcanzando un 90,13 % de inhibición a 800  $\mu\text{M}$ , 82,01 % a 400  $\mu\text{M}$ , 47,48 % a 200  $\mu\text{M}$  y 37,2 % a 100  $\mu\text{M}$  (**Figura 30b**), con una  $\text{CE}_{50}$  calculada de 208,35  $\mu\text{M}$ .



**Figura 30.** Actividad antiviral de **(a)** vitamina E y **(b)** vitamina A frente al ZIKV en células hRPE.

Por otro lado, se estudió el efecto de las vitaminas en la línea celular Vero, la cual, a diferencia de las células hRPE, no produce IFN-I debido a una deleción espontánea del locus genético que contiene los genes de interferón tipo I (IFN- $\alpha/\beta$ ). La elección de estas dos líneas permitió evaluar el posible rol inmunomodulador de las vitaminas durante la infección por ZIKV. En este caso, no se observó inhibición del rendimiento viral con ninguna de las vitaminas. Dado que la vitamina E no mostró inhibición en ninguna de las dos líneas celulares, se decidió discontinuar su estudio y continuar únicamente con la vitamina A.

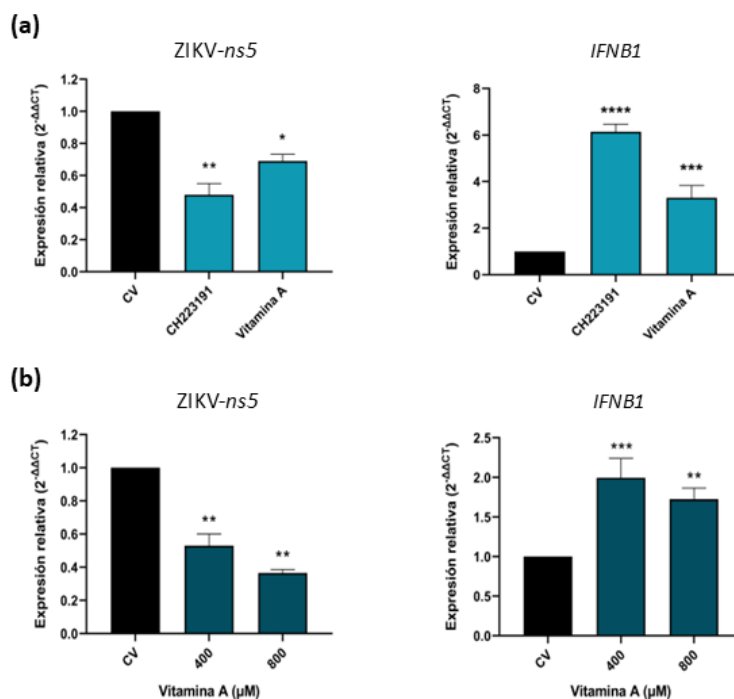


**Figura 31.** Actividad antiviral de (a) vitamina E y (b) vitamina A frente al ZIKV en células Vero.

La capacidad de la vitamina A de reducir la replicación viral en las células hRPE, pero no en las células Vero, sugiere que su mecanismo de acción podría involucrar una respuesta antiviral mediada por IFN-I. Para evaluar este posible efecto, se cuantificaron los niveles de *IFNB1* y de *ZIKV-ns5* en células hRPE mediante qPCR.

Se ha demostrado que el efecto antiviral del antagonista CH-223191 es más pronunciado cuando las células son expuestas antes de la infección (pretratamiento)<sup>22</sup>. En consecuencia, se realizaron ensayos en los que las células fueron expuestas durante 2 h a CH-223191 (10 μM) y vitamina A (800 μM), respectivamente, luego infectadas con ZIKV y finalmente incubadas en medio libre de fármacos durante 24 h. Adicionalmente, considerando que los ensayos de actividad antiviral se realizaron bajo condiciones de postratamiento (con tratamiento administrado durante 48 h después de la infección), se procedió igualmente a cuantificar la expresión génica en estas condiciones utilizando concentraciones de vitamina A de 400 y 800 μM.

En condiciones de pretratamiento, se observó una disminución en la expresión de *ZIKV-ns5* tanto con CH-223191 como con vitamina A, acompañada de un aumento en la expresión de *IFNB1* (Figura 32a). Por otro lado, en el postratamiento, también se evidenció una reducción de *ZIKV-ns5* y un incremento en *IFNB1* en presencia de ambos compuestos (Figura 32b). Estos resultados indican que el efecto antiviral observado podría estar mediado por el rol inmunomodulador de la vitamina A en la célula.



**Figura 32.** Cuantificación de la expresión relativa de los mensajeros *ZIKV-ns5* e *IFNB1* en las células hRPE, en (a) pretratamiento (b) postratamiento.

A partir de estos hallazgos, se planteó un estudio más detallado de la vía de señalización de AHR, con el fin de evaluar si la vitamina A actúa como modulador de dicha vía y, en consecuencia, afecta la producción de IFN-I durante la infección por ZIKV.

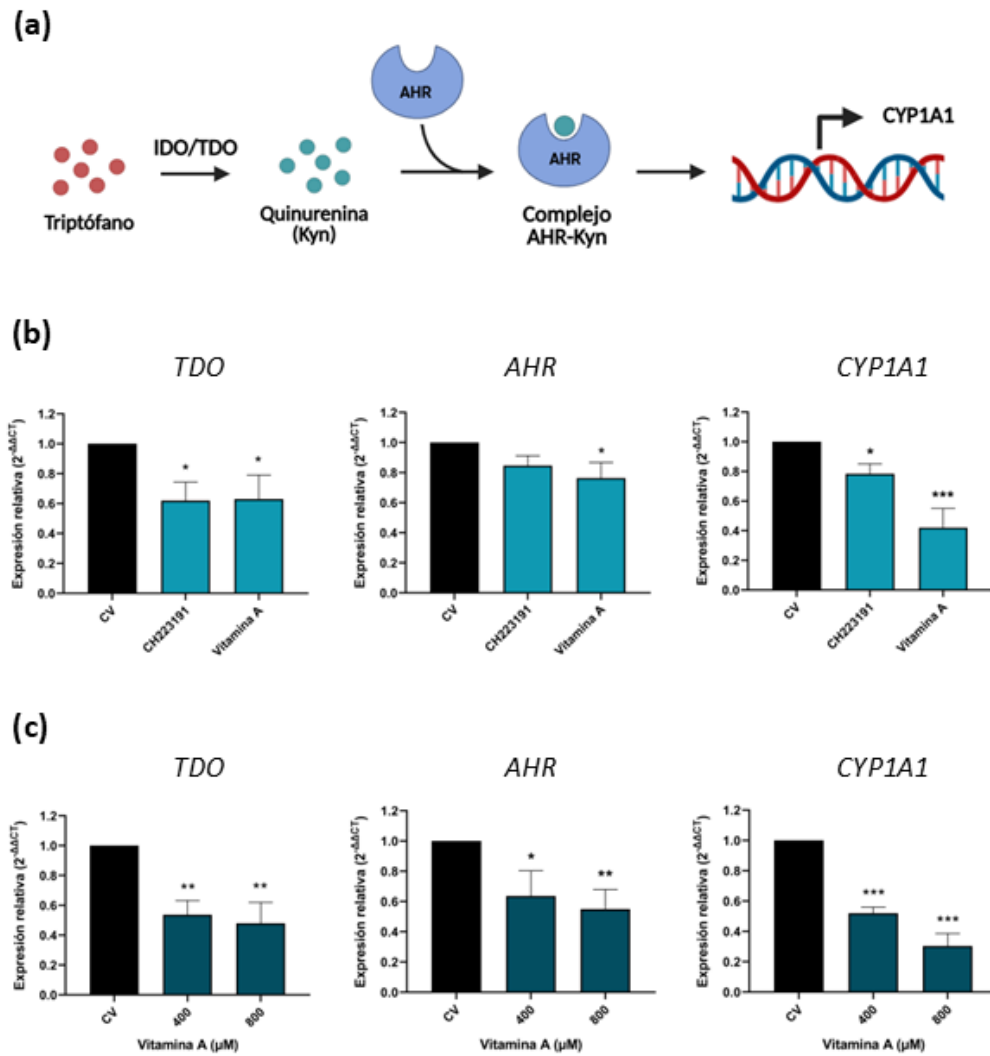
## 2. Efecto de la vitamina A sobre la vía de señalización de AHR

Para evaluar si la vitamina A modulaba efectivamente la vía de señalización AHR, se analizó la expresión del ARNm de proteínas relevantes en esta vía. Las expresiones relativas de *TDO*, *AHR* y *CYP1A1* se determinaron mediante RT-qPCR. Siguiendo el mismo esquema experimental utilizado para *ZIKV-ns5* e *IFNB1*, se evaluaron los niveles de ARNm en condiciones de pre y postratamiento.

En relación con la expresión de *AHR*, se observó que la vitamina A regula negativamente sus niveles de ARNm tanto en condiciones de pretratamiento como de postratamiento. En el caso de CH-223191, si bien se detectó una tendencia a la disminución, la diferencia no resultó estadísticamente significativa (**Figura 33**). Esto concuerda con reportes previos que indican que este antagonista actúa principalmente sobre la expresión de ARNm de otras proteínas de la vía de señalización de AHR, y que su efecto sobre *AHR* puede variar según el tipo celular<sup>22</sup>.

Con el fin de obtener una visión más completa del impacto sobre la vía, se cuantificó la expresión de *TDO* y *CYP1A1*, genes relevantes en esta ruta. En el caso de los pretratamientos, tanto la vitamina A como CH-223191 redujeron significativamente los niveles de expresión relativa. En cuanto a los postratamientos, la vitamina A produjo una reducción aún más marcada en ambas concentraciones evaluadas (800 y 400  $\mu$ M). (**Figura 33**).

En conjunto, estos resultados respaldan la hipótesis de que la vitamina A modula la vía de señalización de AHR en células hRPE.



**Figura 33.** Expresión relativa de *TDO*, *AHR* y *CYP1A1* en las células hRPE-1. **(a)** Esquema representativo y simplificado de la vía de señalización de AHR, indicando la participación de las proteínas TDO, AHR y CYP1A1. **(b)** Condiciones de pretratamiento. **(c)** Condiciones de postratamiento.

## Conclusiones parciales

En este capítulo, se evaluó la potencial actividad antiviral de compuestos naturales mediante un enfoque integral que combinó estudios *in silico* e *in vitro*, con el objetivo de identificar aquellos que pudieran tener un impacto en la replicación viral del ZIKV. A través de un análisis detallado por *docking* y dinámica molecular, se identificaron varios compuestos naturales con alta afinidad por el receptor AHR, entre los cuales se destacaron especialmente las vitaminas A y E, las cuales poseen un perfil de seguridad farmacológico conocido<sup>72</sup>.

Con respecto a los experimentos *in vitro*, la vitamina E no mostró un efecto antiviral relevante en las líneas celulares hRPE y Vero, lo que sugiere que no ejerce un efecto directo sobre la inhibición viral en las condiciones evaluadas.

Por el contrario, los ensayos realizados con la vitamina A en células hRPE revelaron un efecto inhibitorio significativo sobre la replicación del ZIKV, evidenciado por una disminución notable en los títulos virales en comparación con las células control. La ausencia de actividad antiviral de esta vitamina en células Vero, que carecen de producción de IFN-I, sugiere que el efecto observado de la vitamina A podría depender de una respuesta antiviral mediada por IFN, un mecanismo inmunológico clave en la defensa contra infecciones virales. Además, se cuantificó la expresión de ARNm de distintos genes clave de la vía de señalización de AHR (*AHR*, *CYP1A1* y *TDO*), observándose que la vitamina A modula de manera negativa la expresión de estos mensajeros tanto en condiciones de pretratamiento como de postratamiento. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la vitamina A podría estar modulando la respuesta inmune a través de la señalización mediada por AHR, lo que permitiría una respuesta antiviral más efectiva en células capaces de inducir la producción de IFN-I.

Estos hallazgos destacan el valor de los estudios *in silico* como herramienta eficaz para el cribado inicial de compuestos bioactivos, permitiendo identificar posibles candidatos para posteriores evaluaciones experimentales. Sin embargo, también subrayan la importancia de validar dichos resultados mediante ensayos *in vitro*, ya que las interacciones biológicas complejas no siempre pueden reflejarse de manera exacta en modelos informáticos.

Por lo tanto, en la **Figura 34**, se propone un modelo mecánico en el cual la vitamina A actúa como un modulador negativo de la vía de señalización de AHR, potenciando la actividad antiviral contra el ZIKV mediante un mecanismo inmunomodulador que involucra la inhibición funcional de este receptor.

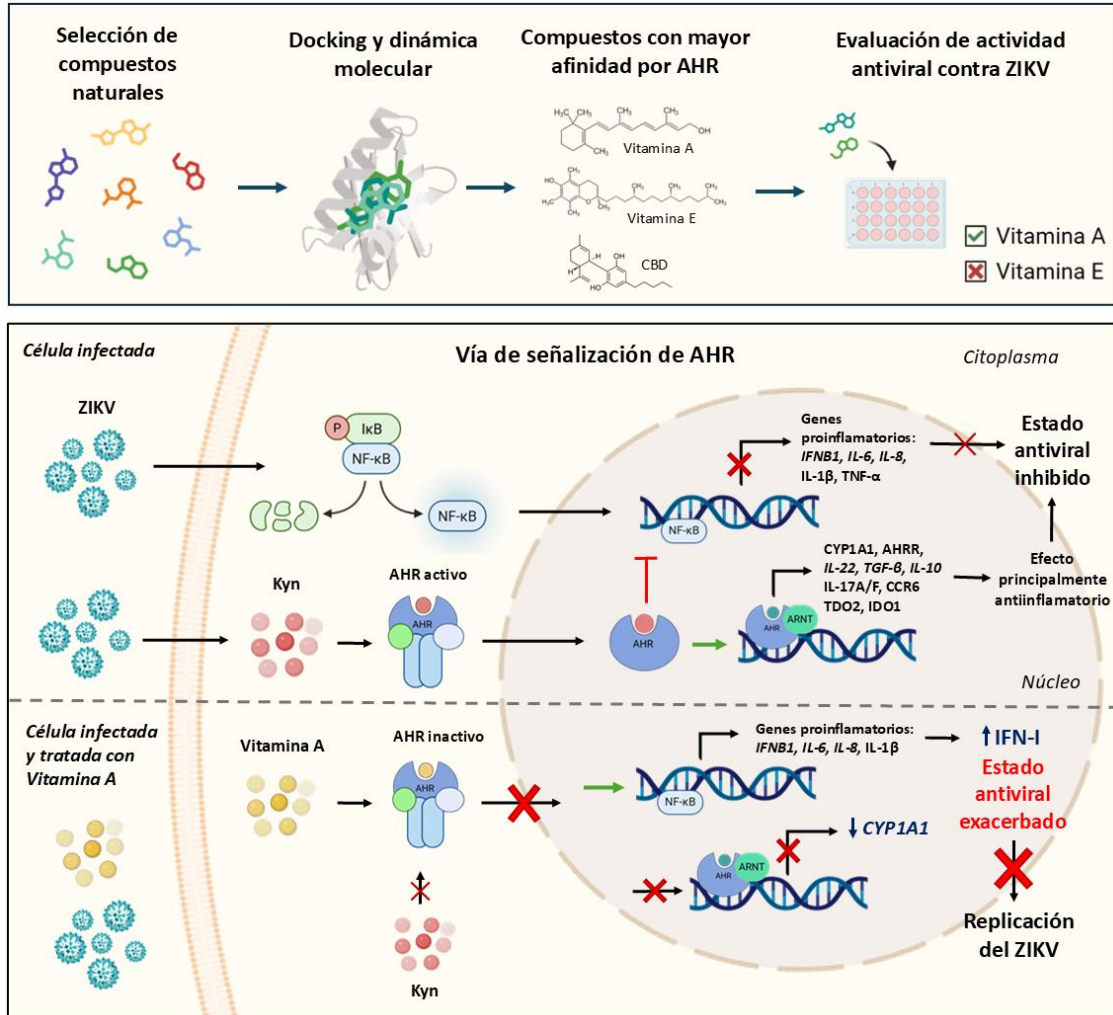


Figura 34. Modelo esquemático del capítulo 1.

## **CAPÍTULO 2**

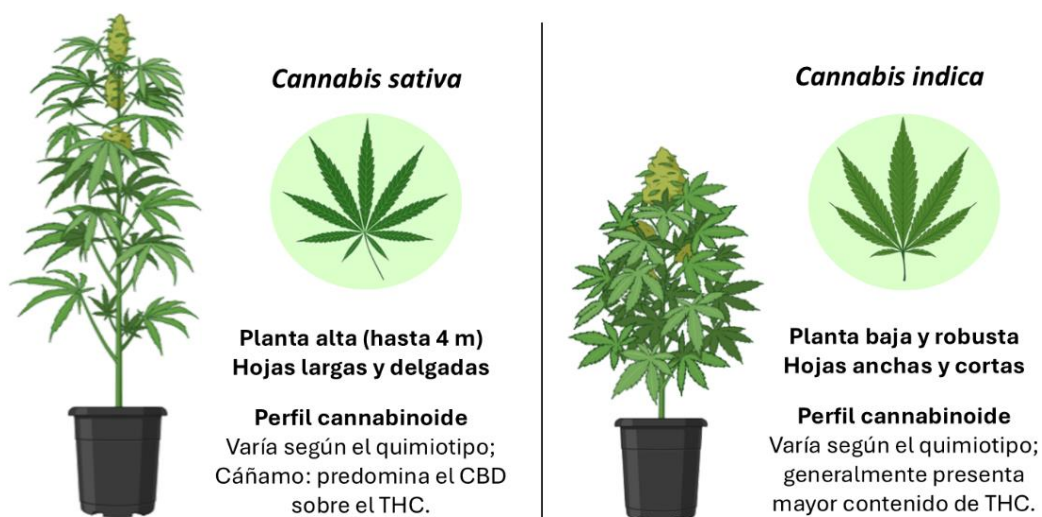
*El CBD como agente antiviral e  
inmunomodulador: estudio de su acción  
sobre la vía de señalización de AHR*

## Introducción

### 1. Aspectos generales del cannabis y el CBD

En los últimos años, el interés científico por el cannabis y sus aplicaciones terapéuticas ha crecido notablemente. Esta planta es rica en compuestos bioactivos como cannabinoides, terpenos y flavonoides. Hasta el momento se han identificado más de 120 fitocannabinoides, siendo el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC) y el CBD los más abundantes y estudiados<sup>73</sup>. Dentro del género *Cannabis*, las especies *Cannabis sativa* y *Cannabis indica* son las más relevantes desde el punto de vista medicinal, y han sido ampliamente estudiadas por su perfil fitoquímico y potencial terapéutico<sup>73</sup> (**Figura 35**). Además, el desarrollo de cepas híbridas, producto del cruce entre estas dos especies, ha permitido generar variedades con características agronómicas y farmacológicas optimizadas, lo que ha impulsado su uso clínico y comercial en la actualidad<sup>74</sup>.

En particular, ciertas variedades de *Cannabis sativa* cultivadas industrialmente, conocidas como cáñamo, se destacan por su elevado contenido de CBD y niveles muy bajos de THC (habitualmente <0,3 %), lo que las convierte en la principal fuente utilizada para la obtención de CBD con fines terapéuticos<sup>75</sup>. A diferencia del THC, el CBD no posee efectos psicoactivos, lo que lo hace especialmente atractivo para aplicaciones clínicas.



**Figura 35.** Comparación morfológica y perfil general de *Cannabis sativa* y *Cannabis indica*. El contenido de THC y CBD varía ampliamente entre variedades dentro de cada especie, y está determinado por el quimiotipo. El cáñamo, una variedad de *C. sativa*, se cultiva por su alto contenido de CBD y bajo THC (<0,3 %).

## 2. Marco regulatorio del cannabis medicinal en Argentina

El uso medicinal del cannabis en Argentina fue legalizado mediante la Ley N.º 27.350, sancionada en marzo de 2017<sup>76</sup>. Esta ley estableció un marco regulatorio para la investigación médica y científica, así como para el acceso controlado de pacientes al uso medicinal, terapéutico y/o paliativo del dolor de derivados de la planta de cannabis, bajo la supervisión del Ministerio de Salud. Si bien la normativa contemplaba una aplicación amplia, en su implementación inicial estuvo principalmente orientada al tratamiento de epilepsias refractarias. Posteriormente, el Decreto N.º 883/2020 reglamentó la ley y creó el Registro del Programa de Cannabis (REPROCANN), permitiendo a los pacientes acceder al tratamiento mediante la inscripción voluntaria y autorizando el cultivo controlado para uso personal o de terceros autorizados<sup>77</sup>. En 2024, la Resolución 3132/2024 introdujo modificaciones en los criterios de inscripción de profesionales de la salud, en la regulación de asociaciones civiles y en los parámetros de cultivo establecidos en el marco del REPROCANN<sup>78</sup>.

## 3. Aplicaciones terapéuticas del CBD

### 3.1. Efectos sobre el sistema nervioso central

El CBD ha sido ampliamente investigado por sus efectos sobre el sistema nervioso, tanto en estudios preclínicos como clínicos. Se han documentado propiedades ansiolíticas, analgésicas, anticonvulsivantes, neuroprotectoras y antioxidantes, que lo posicionan como un compuesto de interés para el tratamiento de trastornos neurológicos y neuropsiquiátricos<sup>79-82</sup>. En particular, ha demostrado eficacia clínica en epilepsias refractarias. Diversos ensayos evidenciaron una reducción significativa en la frecuencia de crisis en pacientes con síndrome de Dravet, síndrome de Lennox-Gastaut y esclerosis tuberosa, lo que llevó a su aprobación por parte de la FDA para estas indicaciones<sup>83,84</sup>.

### 3.2. Actividad inmunomoduladora y antiinflamatoria

Numerosos estudios preclínicos y clínicos han demostrado que el CBD ejerce efectos inmunomoduladores, especialmente sobre el sistema inmune innato<sup>85,86</sup>. Se ha reportado que este compuesto regula la función de monocitos, macrófagos y células dendríticas, e inhibe la vía NF- $\kappa$ B mediante la inducción de I $\kappa$ B $\alpha$ , lo que reduce la liberación de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ <sup>87</sup>. También modula la

respuesta al interferón al disminuir la expresión de IFN- $\beta$  y de genes estimulados por interferones (ISGs) como *CXCL10* y *CCL5*, a través de la vía TRIF/TBK1–IRF3. Además, se ha observado una menor producción de IFN- $\gamma$  en células inmunes activadas, reforzando su potencial como modulador en contextos de inflamación exacerbada, como enfermedades autoinmunes o infecciosas<sup>88</sup>.

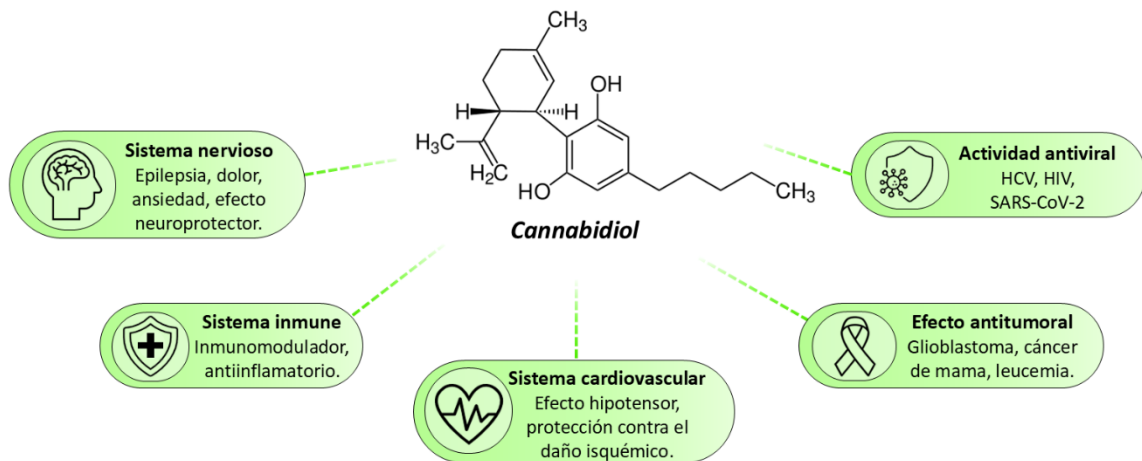
### **3.3. Actividad antiviral**

El CBD ha despertado creciente interés por su posible efecto antiviral. Se ha reportado actividad frente al virus de la hepatitis C (HCV), HIV y SARS-CoV-2, así como beneficios sintomáticos en pacientes con HIV/SIDA, incluyendo alivio del dolor neuropático, náuseas, vómitos y caquexia<sup>89–91</sup>. En el caso específico de SARS-CoV-2, se han propuesto diversos mecanismos para explicar su acción antiviral, incluyendo la inhibición de proteasas virales, la regulación negativa de receptores de entrada viral (como ACE2 y TMPRSS2), y la modulación de la respuesta inmune innata<sup>92–94</sup>. Sin embargo, aún existen áreas poco exploradas, especialmente en relación con virus transmitidos por vectores, como ZIKV, y sobre los mecanismos inmunológicos implicados en su acción antiviral.

### **3.4. Otras aplicaciones terapéuticas**

Además de sus efectos sobre el sistema nervioso, la inflamación y la inmunidad, el CBD ha sido explorado en otras áreas terapéuticas. En oncología, diversos estudios preclínicos han demostrado que puede inducir apoptosis, inhibir la proliferación y reducir la migración de células tumorales, particularmente en modelos de glioblastoma, cáncer de mama triple negativo y leucemia<sup>95–97</sup>.

Por otro lado, en el sistema cardiovascular, se han descrito efectos hipotensores leves, acción antioxidante en células endoteliales y protección frente al daño por isquemia-reperfusión<sup>98–100</sup>. También se han reportado beneficios potenciales en trastornos metabólicos, enfermedades gastrointestinales como colitis, y condiciones dermatológicas como acné o psoriasis, aunque estos efectos requieren mayor validación clínica<sup>101–103</sup>.



**Figura 36.** Principales aplicaciones terapéuticas del CBD

A partir del análisis *in silico* mostrado en el capítulo anterior, en este capítulo se exploró la actividad antiviral del CBD contra ZIKV y otros virus no relacionados, con el objetivo de analizar su potencial como un agente antiviral de amplio espectro. Asimismo, se estudió experimentalmente el efecto del CBD sobre la vía de señalización de AHR. Dado que AHR regula rutas inmunológicas clave como NF-κB, se evaluaron además los efectos del CBD sobre esta vía, con el fin de caracterizar su posible perfil inmunomodulador y su relación con la actividad antiviral observada.

## Resultados

### 1. Actividad antiviral del CBD frente al ZIKV en modelos celulares relevantes

El ZIKV atraviesa la placenta e infecta a las células del trofoblasto, como la línea celular Swan-71, alcanzando posteriormente el cerebro fetal, donde afecta principalmente a las NPCs<sup>104</sup>. Además, este flavivirus infecta otros blancos celulares relevantes en el desarrollo de la infección, como las células hepáticas (Huh-7) y las del EPR (hRPE), como se mencionó previamente. En función de estos antecedentes, se seleccionaron dichas líneas celulares para evaluar la actividad antiviral del CBD en un contexto biológicamente relevante para la infección por ZIKV.

Inicialmente, las células hRPE, Swan-71, NPCs y Huh-7 fueron expuestas a diferentes diluciones del fitoquímico durante 72 h y luego se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de reducción de MTT. Los resultados indicaron que 20  $\mu$ M de CBD inducen una citotoxicidad significativa en las células Huh-7 y hRPE en comparación con las células no tratadas (control), con valores de viabilidad celular del 31,52 % y 18,20 %, respectivamente. No obstante, a una concentración de 10  $\mu$ M, la viabilidad celular se mantuvo por encima del 90 %. En cuanto a las células NPCs y Swan-71, la viabilidad no se vio afectada a la concentración de 20  $\mu$ M de CBD, aunque sí se redujo considerablemente a 40  $\mu$ M (**Figura 37a**). Las concentraciones citotóxicas 50% (CC<sub>50</sub>) se encuentran en la **Tabla 10**.

Basándonos en los datos obtenidos, establecimos un rango de concentración entre 0,6 y 10  $\mu$ M para estudiar las propiedades antivirales del CBD en células Huh-7 y hRPE. En particular, la actividad antiviral del CBD también se probó en células NPCs y Swan-71 a una concentración de 20  $\mu$ M, ya que en estos casos la viabilidad fue superior al 90%. Como se muestra en la **Figura 37b**, el CBD exhibió una potente actividad antiviral contra el ZIKV en los diferentes cultivos celulares utilizados con valores de concentración efectiva 50% (CE<sub>50</sub>) que oscilaron entre 1,40 y 5,12  $\mu$ M (**Tabla 10**).

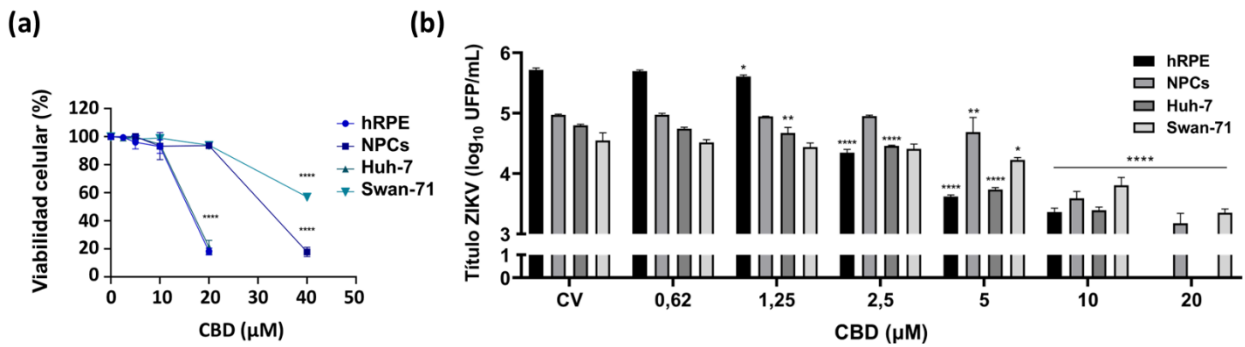


Figura 37. (a) Viabilidad celular y (b) actividad antiviral del CBD contra el ZIKV.

## 2. Actividad antiviral del CBD contra DENV y YFV

Con la finalidad de ampliar el estudio, se incluyó la evaluación de la actividad antiviral del CBD frente a otros dos flavivirus, DENV-2 y YFV, utilizando las células Huh-7. Ambos virus presentan un fuerte tropismo hepático y replican de manera activa en hepatocitos, lo que hace de las líneas celulares hepáticas, como Huh-7, un modelo particularmente pertinente para investigar los efectos de compuestos antivirales. Esta elección cobra aún más importancia al considerar que ambos virus pueden provocar manifestaciones clínicas severas a nivel hepático, incluyendo hepatitis, disfunción hepática y daño tisular. Como se observa en la **Figura 38**, el tratamiento con CBD en un rango de concentraciones de 1,25 a 10 μM redujo significativamente el rendimiento viral de DENV-2 y YFV en cultivos de células Huh-7. En particular, se observó un 95 % y 89,8 % de inhibición a 10 μM para DENV y YFV, respectivamente, y más del 60 % de inhibición para ambas infecciones a 5 μM.

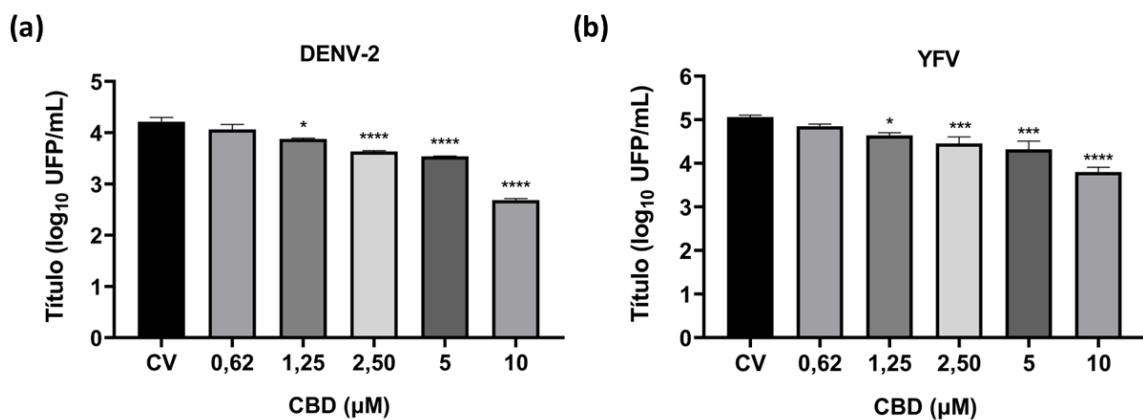


Figura 38. Actividad antiviral del CBD en células Huh-7 contra (a) DENV-2 y (b) YFV.

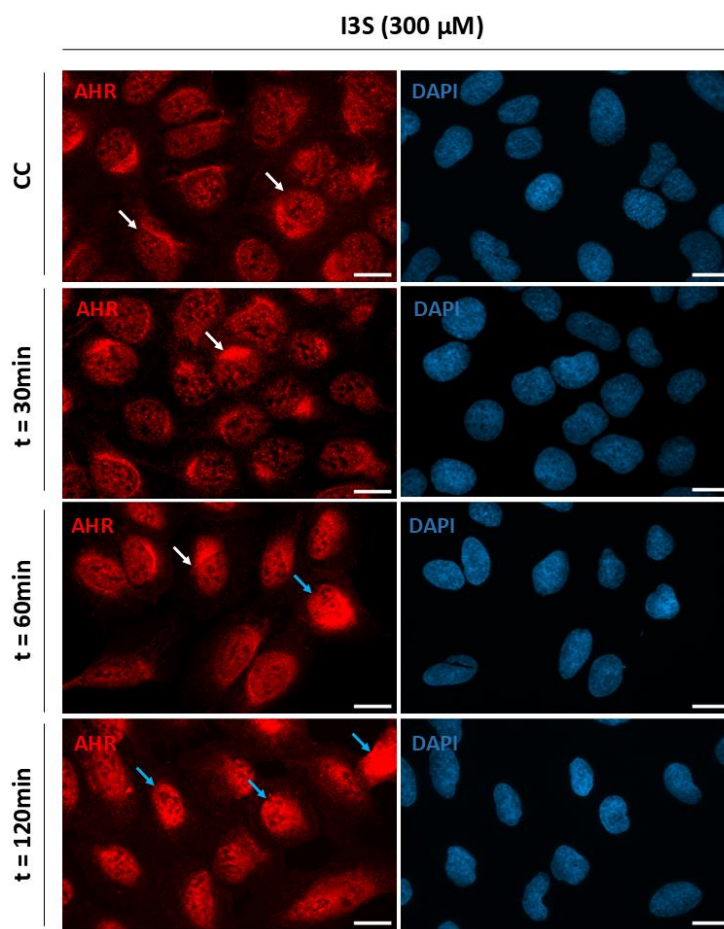
### 3. Impacto del CBD sobre la vía de señalización de AHR

La activación del AHR implica inicialmente la translocación nuclear de este factor de transcripción, seguida por la regulación de genes blanco, por lo que los resultados de la presente sección se presentan respetando este orden temporal.

Se ha reportado que la traslocación de AHR ocurre dentro de las primeras 2 h, con algunas variaciones según el agonista y las células utilizadas<sup>105-107</sup>. La degradación de AHR a través de la vía proteasomal ocurre entre las 2 y 6 horas postactivación, dependiendo del tipo de agonista, lo que conduce a una reducción progresiva de sus niveles nucleares<sup>108</sup>. De forma complementaria, a partir de las 4 h postactivación, se produce una regulación negativa por retroalimentación mediada por el represor del AHR (AHRR), el cual es inducido a través de la vía canónica del receptor y actúa reduciendo su actividad transcripcional<sup>109,110</sup>.

En base a estos datos, se evaluaron de manera exploratoria distintos tiempos de tratamiento con I3S (300  $\mu$ M), un agonista del AHR, en células U2OS (t = 30, 60 y 120 min), con el objetivo de identificar el momento en que ocurre la translocación de AHR al núcleo y así establecer el tiempo óptimo para los experimentos posteriores con CBD.

Los resultados mostraron que a los 60 min algunas células presentaban un aumento de la fluorescencia nuclear. Sin embargo, a los 120 min la intensidad nuclear era claramente mayor que en el citoplasma, en comparación con los otros tiempos, lo que indica una mayor translocación de AHR (**Figura 39**). Por lo tanto, los tratamientos subsiguientes se realizaron teniendo en cuenta estos tiempos.



**Figura 39.** Localización subcelular de AHR en células U2OS tratadas con I3S (300  $\mu$ M) durante distintos tiempos. Las células fueron inmunomarcadas con el anticuerpo anti-AHR (rojo) y teñidas con DAPI (azul) para visualizar núcleos. Las flechas blancas indican células con alta intensidad de fluorescencia en el citoplasma; las flechas celestes señalan células con alta intensidad en el núcleo. Barra de escala: 20  $\mu$ m.

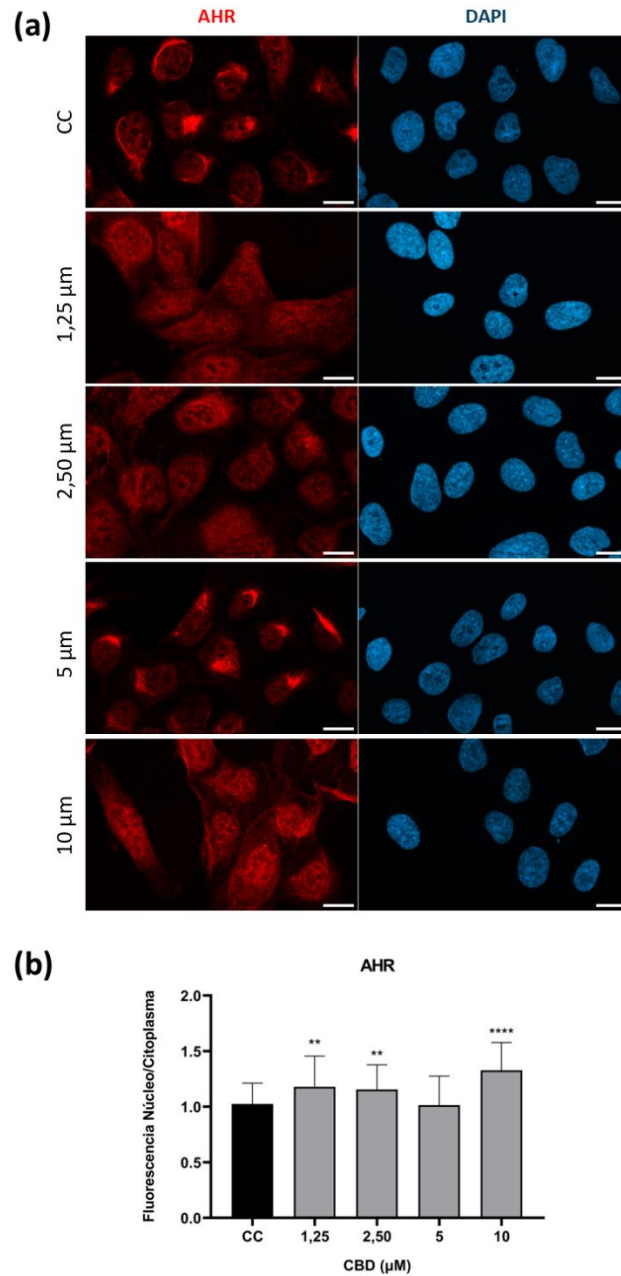
### 3.1. Modulación de AHR en respuesta al CBD

En una primera instancia, se evaluó mediante IFI si el CBD ejerce un efecto directo sobre esta vía en ausencia de otros estímulos externos. Se trataron células con diferentes concentraciones del compuesto (1,2; 2,5; 5 y 10  $\mu$ M), y se analizó la relación núcleo/citoplasma (n/c) de AHR como indicador de su activación.

El análisis de la translocación nuclear de AHR reveló una respuesta no lineal frente al tratamiento con CBD. Se observó un aumento significativo de la relación n/c a concentraciones bajas (1,25 y 2,5  $\mu$ M) y altas (10  $\mu$ M), mientras que a una concentración intermedia (5  $\mu$ M) la señal no difirió del control (**Figura 40**).

Este comportamiento sugiere que el CBD podría estar modulando la señalización de AHR a través de mecanismos múltiples y dependientes de la concentración, en línea con su naturaleza pleiotrópica. La ausencia de activación a una dosis intermedia podría

explicarse por un efecto indirecto del CBD sobre AHR, por ejemplo, a través de la modificación de otras vías de señalización que interfieren con la translocación del receptor.



**Figura 40. (a)** Efecto de distintas concentraciones de CBD en la vía de señalización de AHR. Imágenes representativas obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia. Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ . **(b)** Cuantificación de fluorescencia núcleo/citoplasma de células marcadas con el anticuerpo anti-AHR.

### 3.3. Modulación de AHR y NF- $\kappa\text{B}$ en respuesta a I3S

Se evaluó el efecto del CBD (10  $\mu\text{M}$ ) en presencia de I3S (300  $\mu\text{M}$ ), con el objetivo de emular su activación como ocurre durante la infección por ZIKV. En dicho contexto

infeccioso, metabolitos como la Kyn activan AHR y bloquean vías inmunológicas clave como la de NF- $\kappa$ B<sup>22</sup>. Dado que la infección viral desencadena múltiples respuestas celulares que pueden dificultar la interpretación de los resultados, se optó por utilizar I3S como modelo experimental para activar AHR en un entorno controlado y libre de otros estímulos.

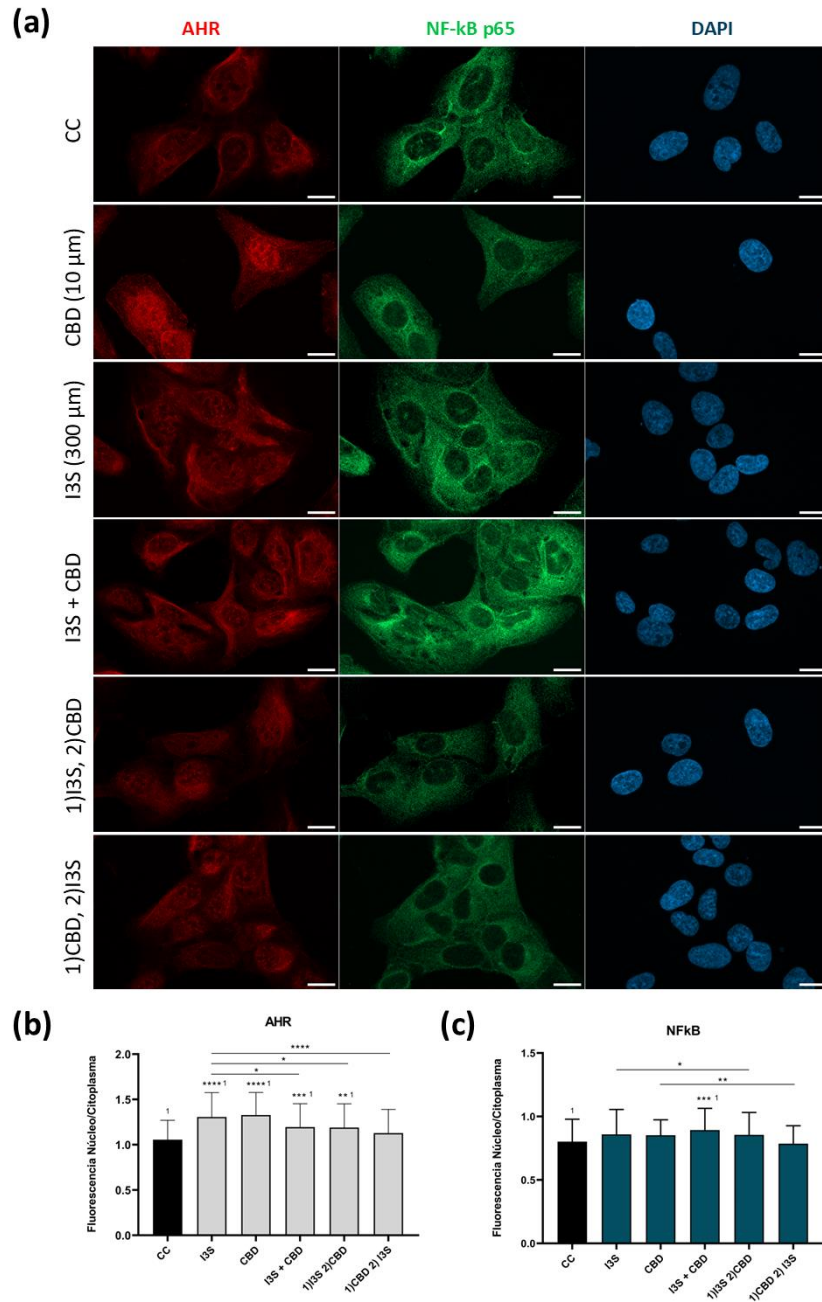
Se realizaron distintos esquemas de tratamiento para analizar cómo el CBD influye sobre la activación del AHR inducida por I3S. Cuando ambos compuestos se administraron de forma simultánea, se buscó evaluar si el CBD podía modular la activación generada por el agonista clásico. En el tratamiento secuencial donde se aplicó primero I3S y luego CBD, se analizó si el CBD era capaz de inhibir o revertir una activación ya iniciada. Por último, cuando se pretrató con CBD antes de la adición de I3S, se probó si el CBD podía prevenir completamente la activación del receptor.

Se observó que la aplicación conjunta de ambos compuestos, así como el pretratamiento con I3S, redujo significativamente la activación de AHR (**Figuras 41a y 41b**). Esta inhibición fue aún más marcada cuando se administró primero el CBD y luego I3S, alcanzando niveles nucleocitoplasmáticos comparables al control. Este resultado es particularmente llamativo, ya que ambos compuestos inducen la activación de AHR cuando se administran de forma individual. El CBD parece estar actuando como un modulador selectivo del AHR (SAHRM), capaz de inducir respuestas específicas que dependen del contexto celular y la presencia de otros ligandos o estímulos, como I3S. Este tipo de moduladores no generan una activación constante ni uniforme, sino que su efecto varía cualitativa y cuantitativamente según el entorno y las señales presentes. En este sentido, el CBD no se comporta como un antagonista funcional clásico, que reduce la activación del receptor sin provocar activación por sí solo, ni como un agonista parcial, que induce una activación submáxima constante en cualquier condición. Por el contrario, mientras el CBD puede reducir la activación en presencia de un agonista como I3S, también es capaz de activar el receptor cuando se administra solo, mostrando así un perfil complejo y dependiente del contexto.

Respecto a NF- $\kappa$ B, se analizó su distribución subcelular, midiendo su localización en núcleo y citoplasma, dado que también experimenta translocación al activarse<sup>111</sup>. En este caso, solo se observaron diferencias significativas con respecto al control cuando

ambos compuestos se administraron de manera simultánea. En esta condición, se detectó un aumento en la activación de NF- $\kappa$ B (**Figura 41a y 41c**).

En conjunto, estos resultados sugieren una interacción compleja y no completamente definida entre el CBD e I3S sobre la activación de AHR y NF- $\kappa$ B, posiblemente mediada por mecanismos de señalización cruzada entre vías o por efectos indirectos que modifican el entorno celular.



**Figura 41.** (a) Tratamientos combinados de CBD e I3S sobre la vía de señalización de AHR. Barra de escala: 20  $\mu$ m. (b) Cuantificación de fluorescencia n/c para AHR. (c) Cuantificación de fluorescencia n/c para NF $\kappa$ B p65.

### **3.4. Modulación de AHR y NF- $\kappa$ B en condiciones inflamatorias inducidas por IL-1 $\beta$**

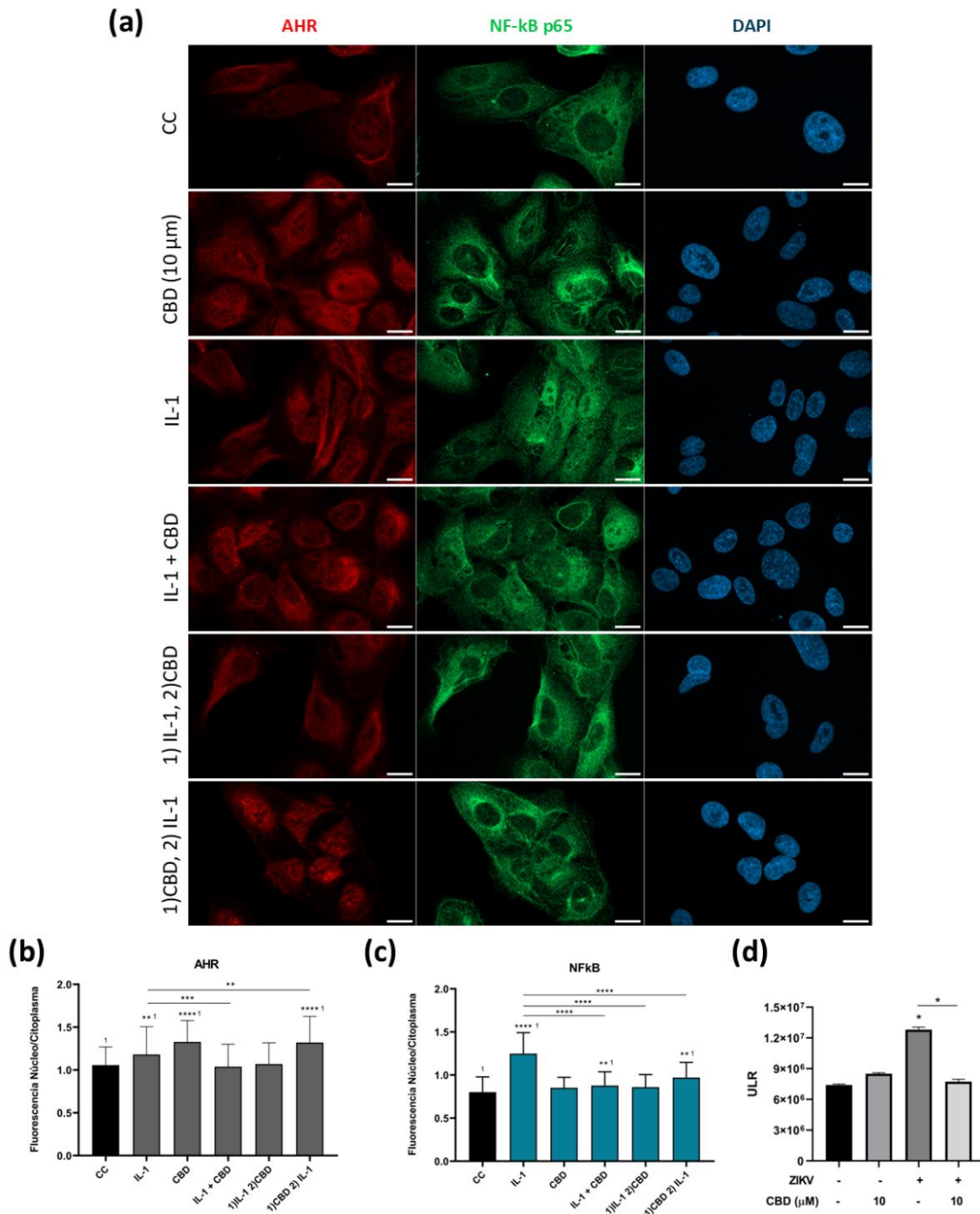
Se investigó el efecto del CBD sobre las vías de señalización de AHR y NF- $\kappa$ B en presencia de IL-1 $\beta$ , un activador conocido de NF- $\kappa$ B<sup>112</sup>. Dado que esta vía se activa fuertemente durante infecciones virales, se utilizó IL-1 $\beta$  como estímulo experimental para emular dicha activación, evitando la complejidad de la respuesta celular inducida por un virus completo<sup>113</sup>.

Respecto a la vía AHR, la administración de IL-1 $\beta$  produjo un aumento en la relación n/c de AHR, lo que indica activación de la vía (**Figura 42a y 42b**). Este resultado se correlaciona con evidencia previa que muestra que IL-1 $\beta$  puede inducir la expresión de la enzima IDO1, la cual cataliza la conversión de triptófano en Kyn, un ligando endógeno de AHR<sup>114</sup>. De esta manera, la activación observada podría explicarse por un aumento en la producción de ligandos endógenos que favorecen la translocación nuclear del receptor. Por otro lado, cuando IL-1 $\beta$  y CBD se administraron en simultáneo, o con IL-1 $\beta$  como tratamiento previo al CBD, no se observó activación de AHR. Sin embargo, cuando el CBD se administró antes que la IL-1 $\beta$ , se evidenció una activación marcada. Este comportamiento refleja lo observado en experimentos anteriores, donde también se detectó una respuesta atípica al aplicar CBD como tratamiento inicial y refuerza la idea de que el CBD es un SAHRM.

En cuanto a la vía de NF- $\kappa$ B, el CBD por sí solo no indujo activación (**Figura 42a y 42c**). Sin embargo, en condiciones combinadas con IL-1 $\beta$ , se observó una reducción en la activación inducida por dicha citoquina, lo que indica un efecto modulador del CBD sobre esta vía. Este resultado es coherente con su actividad antiinflamatoria reportada<sup>115</sup>. El mayor efecto se observó cuando IL-1 $\beta$  fue administrado antes que el CBD, condición en la cual la activación de NF- $\kappa$ B se redujo significativamente. Esto indica que el CBD actúa como un modulador negativo de la respuesta inflamatoria mediada por NF- $\kappa$ B, modulando la cascada de señalización y atenuando la activación inducida por IL-1 $\beta$ .

A partir de estos resultados, se evaluó si el efecto modulador del CBD sobre NF- $\kappa$ B también se observaba en un contexto de infección viral. Para ello, se realizó un ensayo de reportero de luciferasa bajo control de un promotor NF- $\kappa$ B en células infectadas con ZIKV y no infectadas, tratadas o no con CBD. En células no infectadas, no se observaron

diferencias significativas entre las condiciones tratadas y no tratadas. Sin embargo, en células infectadas, donde la vía de NF-κB se activa, el tratamiento con CBD redujo la señal de luciferasa, replicando el efecto de modulación negativa observado previamente (Figura 42d).



**Figura 42.** (a) Impacto de tratamientos combinados de CBD con IL-1β en la vía de AHR. Barra de escala: 20 μm. (b) Cuantificación de fluorescencia n/c para AHR. (c) Cuantificación de fluorescencia n/c para NFκB p65. (d) Medición de la activación de NF-κB mediante ensayo de luciferasa en células transfectadas con el plásmido reportero.

### 3.2. Modulación de la expresión de ARNm asociados a la vía de AHR

Posteriormente, se evaluó la expresión relativa de los mensajeros *AHR* y *TDO* mediante RT-qPCR en dos líneas celulares humanas, Huh-7 y A549, infectadas con ZIKV o DENV, y tratadas o no con CBD. Estas mediciones se realizaron luego de 48 h de tratamiento con CBD ya que los ensayos antivirales se evaluaron a este tiempo, lo cual permite integrar el efecto funcional con los cambios en la expresión de genes blanco. Además, la expresión génica mediada por AHR comienza a evidenciarse a partir de las 3 h y se sostiene en el tiempo, siendo detectable de manera sostenida y consistente incluso a las 48 h<sup>116</sup>.

Se seleccionó la línea celular Huh-7 por su capacidad de montar una robusta respuesta inmune antiviral, lo cual la convierte en un modelo adecuado para estudiar modulaciones en vías inmunorregulatorias como la de AHR. En estas células infectadas con ZIKV, el tratamiento con CBD no produjo cambios marcados en la expresión de *TDO*, aunque se observó una disminución del ARNm de *AHR* con 5  $\mu$ M, seguida de un ligero aumento con 10  $\mu$ M con respecto al control (**Figura 43a**). Dado que las Huh-7 son células de origen hepático, caracterizadas por un metabolismo altamente activo y una elevada expresión de enzimas involucradas en la biotransformación de xenobióticos, se consideró importante validar estos resultados en un modelo celular de origen no hepático. Por este motivo, se evaluó también la expresión de *AHR* en la línea A549, de origen epitelial pulmonar. En este caso, el tratamiento con CBD mostró la misma tendencia que en las células Huh-7: una disminución en la expresión de *AHR* con 5  $\mu$ M, aunque más leve, mientras que un aumento en la expresión de *AHR* con 10  $\mu$ M, aunque más marcado.

Estas diferencias, aunque sutiles, no resultan sorprendentes, considerando que AHR es una proteína altamente regulada, con múltiples funciones que dependen del tipo celular, el entorno y los estímulos presentes<sup>31</sup>. Sin embargo, tanto los resultados de expresión de mensajeros como los obtenidos por IFI mostrados previamente, revelaron una relación no lineal entre la concentración de CBD y la respuesta asociada al AHR, ya que en ambos casos se observó un comportamiento contradictorio entre las concentraciones de 5 y 10  $\mu$ M. Este comportamiento respalda la hipótesis que el CBD podría estar actuando como un SAHRM, cuyos efectos pueden variar según el rango de

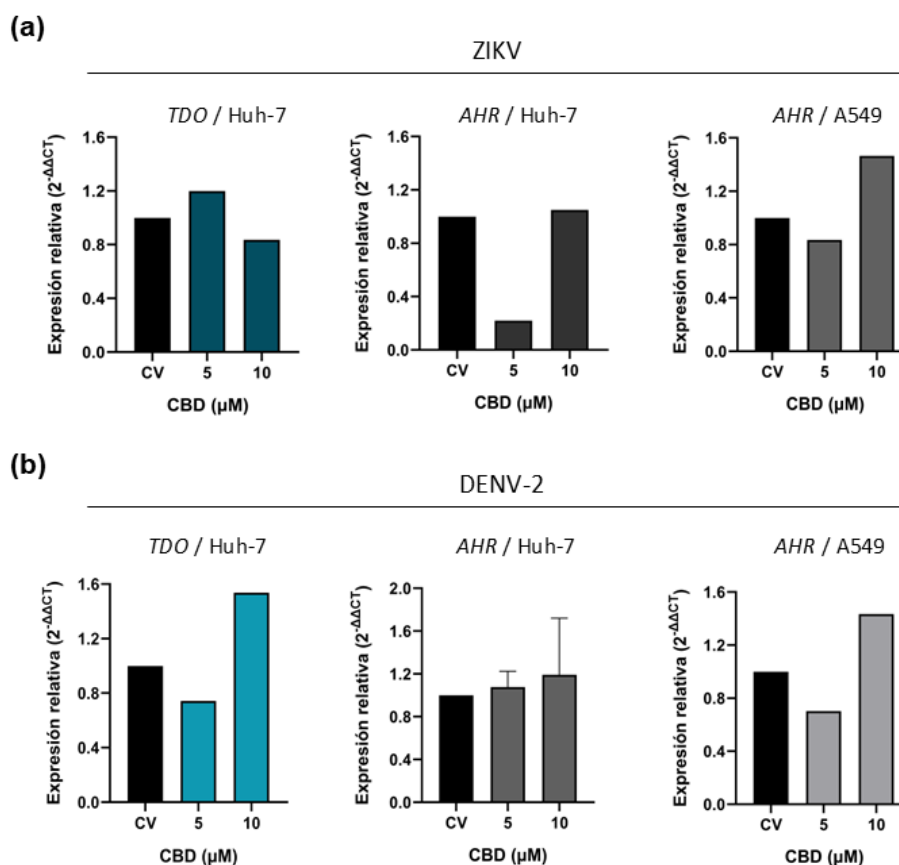
concentración utilizado<sup>117</sup>. Además, la complejidad de la red de señalización asociada al AHR, junto con la naturaleza pleiotrópica y altamente contextual del CBD, podrían contribuir a estos perfiles de activación no convencionales, en los que múltiples vías pueden modularse simultáneamente de manera sinérgica o antagónica<sup>118</sup>.

Por otro lado, la observación de una respuesta bifásica en la expresión del mensajero de *AHR* a distintas concentraciones puede estar relacionada con mecanismos de regulación transcripcional no lineales. Curvas dosis–respuesta no monotónicas suelen surgir por mecanismos como regulación dependiente de dosis, retroalimentación y competencia molecular<sup>119,120</sup>. A concentraciones bajas, la activación del receptor podría inducir mecanismos de retroalimentación negativa, como la expresión de represores (por ejemplo, *AHRR*), que suprimen su propia señalización<sup>121</sup>. Por otro lado, niveles elevados de estímulo podrían inducir cambios epigenéticos o en la disponibilidad de cofactores transcripcionales, facilitando una mayor activación génica<sup>122,123</sup>.

Por otro lado, para determinar si estos patrones celulares se mantenían frente a otro virus, se repitieron los experimentos en células infectadas con DENV-2 (**Figura 43b**). En este caso, el tratamiento con CBD provocó una disminución en la expresión de *TDO* a 5  $\mu$ M y un aumento a 10  $\mu$ M, en comparación con el control. Este comportamiento difirió de lo observado en células infectadas con ZIKV, donde no se detectaron grandes diferencias en la expresión de *TDO*. Por otro lado, en células Huh-7 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de *AHR*, aunque se observó una tendencia al aumento. Esta misma tendencia se registró en la expresión relativa de *AHR* en células A549. Cabe destacar que, en este último caso, tanto el patrón como el nivel de expresión relativa fueron muy similares frente a ambos virus. A pesar de que ZIKV y DENV pertenecen ambos a la misma familia y comparten similitudes estructurales y mecanismos generales de replicación, los resultados obtenidos mostraron algunas diferencias en la modulación de la vía de AHR en presencia de CBD. Esta divergencia podría atribuirse a múltiples factores. Por un lado, se ha demostrado que ambos virus pueden modular de forma diferencial vías inmunológicas clave, como la de NF- $\kappa$ B, que están íntimamente relacionadas con la regulación de AHR<sup>124</sup>. Otro aspecto a considerar es que las diferencias en la cinética de replicación viral y en el momento de análisis

también podrían haber contribuido a los diferentes perfiles transcriptómicos observados<sup>125</sup>.

Si bien estos resultados no permiten establecer una conclusión definitiva, sugieren que el CBD podría actuar como un SAHRM, es decir, un compuesto capaz de modular esta vía de forma dependiente del contexto celular, del virus presente y de la concentración utilizada.

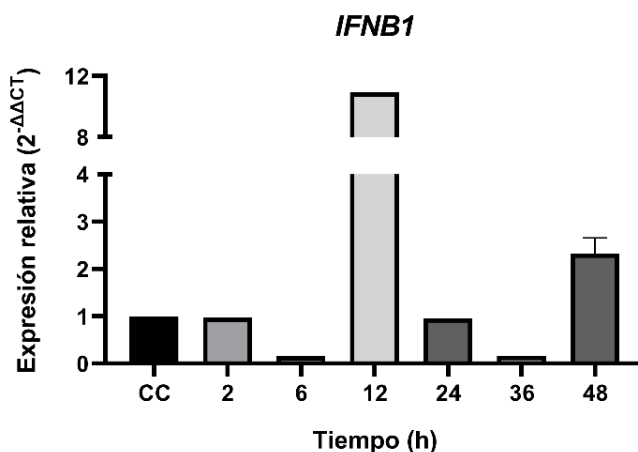


**Figura 43.** Expresión relativa de *AHR* y *TDO* en células infectadas con **(a)** ZIKV o **(b)** DENV-2 tratadas con CBD (5 y 10 μM). Se evaluaron en las líneas celulares Huh-7 y A549 según se indica, mediante qPCR.

### 3.3. Cinética de expresión de *IFNB1*

Dado que en los ensayos previos se observaron cambios en la activación de NF-κB, y considerando que este factor participa en la inducción del mensajero de IFN-β (*IFNB1*), se evaluó la expresión de este mensajero tras el tratamiento con CBD. Dado que la bibliografía reporta efectos contradictorios del CBD sobre IFN-β, que incluyen tanto inducciones como inhibiciones, se analizó su expresión en distintos tiempos postratamiento<sup>93,126</sup>.

Los resultados mostraron una respuesta dinámica y de patrón cíclico: sin cambios a las 2 h, una disminución a las 6 h, y un pico marcado a las 12 h, seguido por una normalización a las 24 h, una nueva disminución a las 36 h y un aumento moderado a las 48 h (**Figura 44**). Esta oscilación sugiere una posible respuesta bifásica inducida por el CBD, reforzando la idea de que su efecto sobre la vía del IFN-I es complejo y dependiente del tiempo.

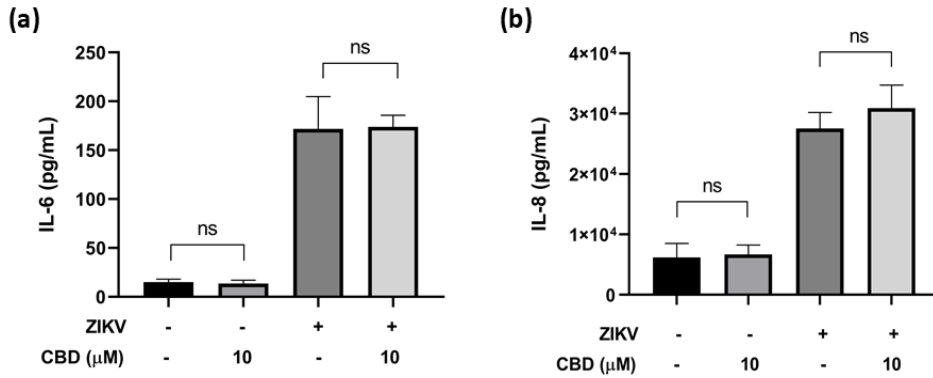


**Figura 44.** Cinética de expresión de *IFNB1*.

### 3.4. Evaluación de la producción de IL-6 e IL-8

Como complemento a los análisis de NF- $\kappa$ B e IFN-I, se evaluó la producción de las citocinas proinflamatorias IL-6 e IL-8, mediadores clave de la respuesta inmune antiviral y reguladas en gran parte por la vía de NF- $\kappa$ B. En este caso, los niveles de IL-6 e IL-8 fueron medidos por ELISA en células infectadas y no infectadas, tratadas o no con CBD.

No se observaron diferencias significativas entre las condiciones tratadas y no tratadas, lo que sugiere que el CBD no modula directamente la producción de estas citocinas bajo las condiciones evaluadas (**Figura 45**). Estos resultados, junto con lo observado previamente en la vía de NF- $\kappa$ B y la expresión de *IFNB1*, indican que el efecto inmunomodulador del CBD es parcial.

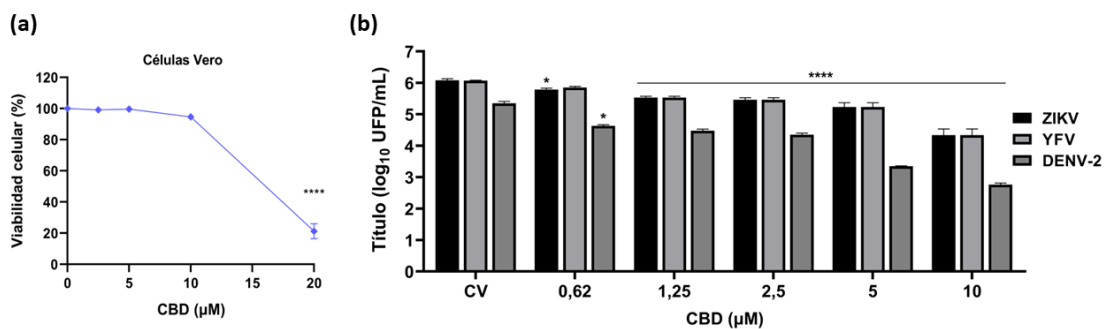


**Figura 45.** Cuantificación de interleuquinas en células infectadas y no infectadas con ZIKV, tratadas o no con CBD (10 µM). **(a)** Niveles de IL-6 y **(b)** Niveles de IL-8.

#### 4. Actividad antiviral de flavivirus en células Vero

Para evaluar si la actividad antiviral observada contra los flavivirus dependía del efecto inmunomodulador parcial previamente demostrado, se analizó la actividad antiviral del CBD en células Vero, una línea celular que, como se mencionó en el capítulo anterior, carece de la capacidad de producir IFN-I.

En primer lugar, se evaluó la viabilidad celular (**Figura 46a**), y posteriormente se evaluaron diferentes concentraciones contra ZIKV, DENV y YFV. A 10 µM, se observó una inhibición del rendimiento viral del 96,8 % para ZIKV, 98,9 % para DENV y 97,2 % para YFV. En concentraciones menores, como 5 µM, la inhibición superó el 78 % en los tres virus, y se mantuvo por encima del 50 % hasta 2,5 µM para ZIKV y YFV. (**Figura 46b**). La inhibición observada a 10 µM resultó mayor que la obtenida en líneas celulares productoras de IFN evaluadas previamente.

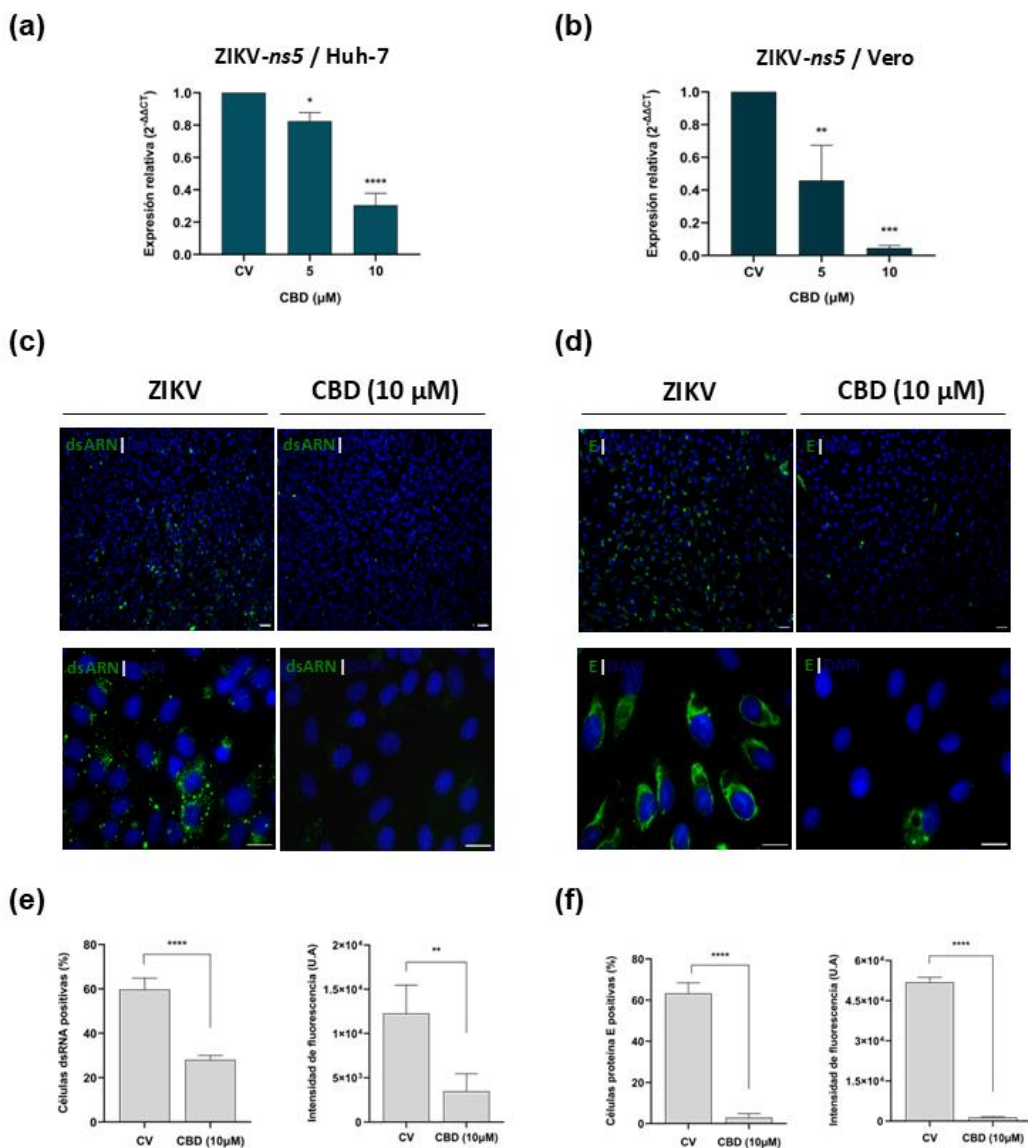


**Figura 46.** Actividad antiviral del CBD contra los virus ZIKV, YFV y DENV-2 en células Vero.

Para validar estos resultados, se midió la expresión relativa del mensajero viral ZIKV-*ns5* y se cuantificaron células infectadas mediante IFI (**Figura 47**). Se observó una reducción

en la expresión del mensajero tanto en células Huh-7 como en Vero (**Figura 47a y 47b**), así como un menor porcentaje de células infectadas determinado por IFI (**Figura 47c-f**).

Considerando todos los datos presentados, es posible inferir que la actividad antiviral del CBD no depende exclusivamente de la vía de IFN-I, sino que probablemente involucra otros mecanismos celulares, los cuales podrían contribuir de manera conjunta en la respuesta antiviral observada.

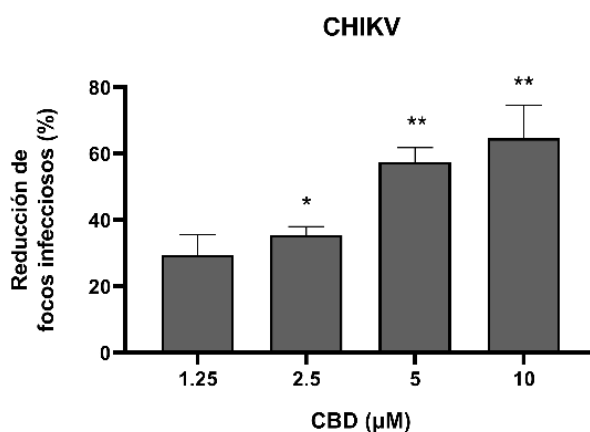


**Figura 47.** (a,b) Expresión de ZIKV-ns5 en células Huh-7 y Vero, según se indica. (c,d) Células infectadas y tratadas o no, marcadas con el anticuerpo primario anti-dsARN y (d) anti-E. (e,f) Cuantificación de células infectadas e intensidad de fluorescencia de las células marcadas con (e) anti-dsARN y (f) anti-E.

## 5. Actividad antiviral del CBD contra CHIKV

Los arbovirus como ZIKV y YFV cocirculan en las mismas áreas que el CHIKV, que pertenece a la familia *Togaviridae*. Por lo tanto, evaluamos la actividad antiviral del CBD frente a este arbovirus no relacionado en células Vero.

Los resultados obtenidos mostraron que hubo una reducción significativa de focos infecciosos a concentraciones de 2,5, 5 y 10  $\mu\text{M}$  (**Figura 48**), lo que resultó en una  $\text{CE}_{50}$  de 4,63  $\mu\text{M}$  (**Tabla 10**). Este resultado fue particularmente destacado, ya que CHIKV no solo presenta diferencias estructurales significativas respecto a los flavivirus, sino que también exhibe estrategias replicativas distintas y un efecto citopático más pronunciado.



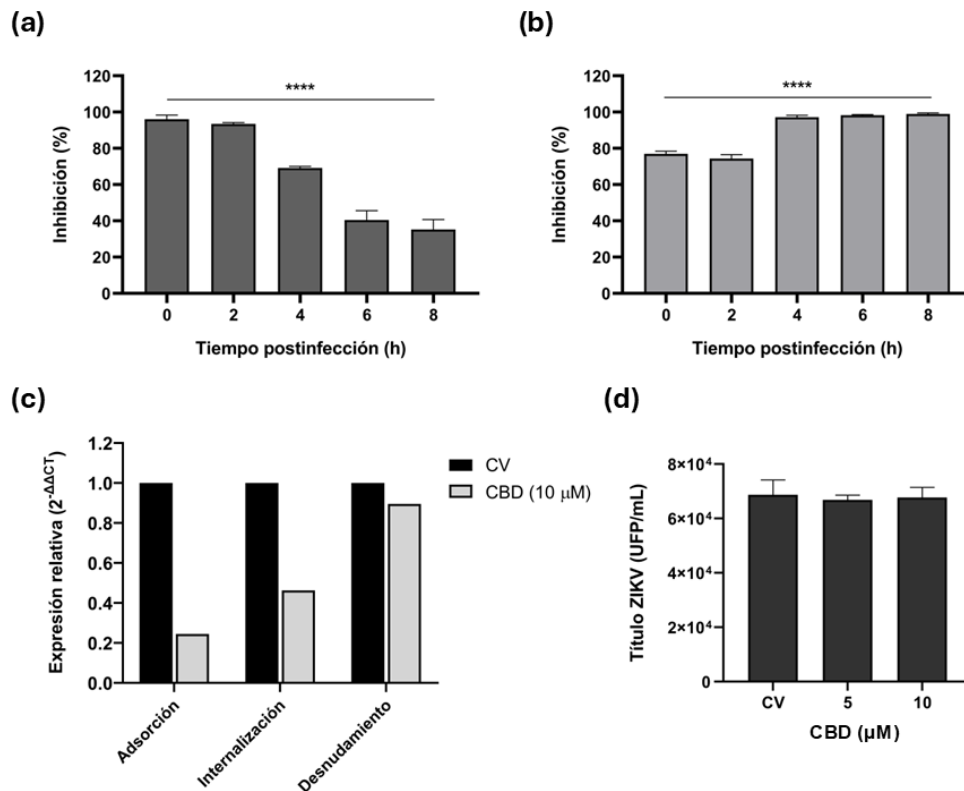
**Figura 48.** Actividad antiviral del CBD contra CHIKV en células Vero.

## 6. Actividad antiviral del CBD frente al ZIKV en distintas etapas de su ciclo de replicación

Dado que los resultados obtenidos permiten descartar que el efecto inmunomodulador y la vía de AHR sean responsables de la actividad antiviral del CBD, se procedió a realizar un abordaje exploratorio para comenzar a dilucidar su mecanismo de acción. Como primer acercamiento, se realizó un experimento de tiempos de adición, en el cual células Huh-7 y Vero fueron infectadas y posteriormente tratadas con CBD (10  $\mu\text{M}$ ) a las 0, 2, 4, 6 y 8 hpi. En ambas líneas celulares se observó una inhibición del rendimiento viral en todas las condiciones evaluadas, aunque con patrones temporales distintos según el tipo celular. En células Huh-7, el CBD fue más efectivo cuando se administró durante las primeras 2 hpi, con inhibiciones de 96,0 % y 93,5 %, mientras que a las 8 hpi el efecto disminuyó al 35,2 % (**Figura 49a**). En cambio, en células Vero se detectó una inhibición

progresiva a partir de las 4 hpi, alcanzando valores del 97,1 %, 98,2 % y 98,9 % a las 4, 6 y 8 hpi, respectivamente, lo cual sugiere un impacto del CBD también sobre fases intermedias y tardías del ciclo viral, como la replicación, ensamblaje y liberación de nuevos viriones (**Figura 49b**).

Debido a la marcada inhibición observada durante las primeras horas postinfección en células Huh-7, se realizó un ensayo para estudiar en detalle los eventos iniciales del ciclo viral. En este experimento, se evaluaron específicamente las etapas de adsorción, internalización y desnudamiento del genoma viral. Para ello, se adicionó CBD a los cultivos celulares infectados en distintos momentos tempranos de la infección y se cuantificó el mensajero viral ZIKV-*ns5* mediante qPCR. Los resultados indicaron que el tratamiento afecta principalmente la adsorción y la internalización, lo que sugiere que el CBD interfiere con la entrada del virus a la célula. (**Figura 49c**). Este efecto podría deberse a una acción directa del compuesto sobre la partícula viral, inactivándola, o a una alteración de la célula hospedadora que impide una entrada eficiente del virus. Para evaluar un posible efecto virucida sobre las partículas virales, se realizó un ensayo de inactivación viral. En este caso, el virus fue preincubado con CBD (5 y 10  $\mu\text{M}$ ) durante una hora a 37 °C, y posteriormente cuantificado mediante ensayo de placa. Los resultados indicaron que el CBD no afecta directamente la infectividad del virus, ya que no se observaron diferencias significativas en la cantidad de partículas infecciosas recuperadas (**Figura 49d**).



**Figura 49.** Ensayo de tiempos de adición para ZIKV en células **(a)** Huh-7 y **(b)** Vero. El CBD se agregó a las 0, 2, 4, 6 y 8 hpi. Las partículas infecciosas se **(c)** Ensayo de internalización, en el que se cuantificó los niveles de mRNA del ZIKV-ns5 para evaluar la entrada del virus en las células. **(d)** Ensayo de inactivación viral del ZIKV.

En resumen, estos resultados indican que el efecto antiviral del CBD no se debe a una acción directa sobre la partícula viral, sino a una interferencia con procesos o componentes celulares. Tal como se observó en el ensayo de tiempos de adición, estos parecen estar involucrados en múltiples etapas del ciclo viral.

## 7. Efecto antiviral del CBD de amplio espectro

Un trabajo publicado por Guard *et al.* (2022) reveló, mediante un abordaje multiómico, que el CBD altera de manera significativa la homeostasis del COL en líneas celulares humanas<sup>127</sup>. Dado que el COL es un componente esencial de las membranas celulares, estas observaciones adquieren especial relevancia en el contexto de infecciones virales. Las membranas celulares participan en múltiples etapas del ciclo viral, incluyendo la entrada, replicación, síntesis de proteínas, ensamblaje y liberación, especialmente en virus envueltos como los flavivirus<sup>128</sup>.

Este hallazgo resulta consistente con los ensayos de tiempos de adición, donde se observó una inhibición en distintas fases del ciclo viral, lo que sugiere que el CBD actúa sobre estructuras celulares transversales como las membranas. Dado que las membranas celulares son elementos clave en la replicación de todos los virus, se planteó que un compuesto que altere su integridad o funcionalidad podría ejercer un efecto antiviral de amplio espectro. Para evaluar esta hipótesis, se investigó la eficacia del CBD frente a una diversidad de virus, incluyendo virus envueltos (HSV-1 y JUNV) y no envueltos (PV-1 y ADV-5), con diferentes tipos de genoma. Las células Vero y Huh-7 fueron infectadas con HSV-1, JUNV y PV-1, mientras que para estudiar al virus ADV-5 se utilizaron células A549 debido a su alta permisividad y relevancia para adenovirus respiratorios. Posteriormente, se trataron con CBD en un rango de concentraciones de 0,6 a 10  $\mu\text{M}$ . Los resultados indicaron que el CBD inhibió significativamente la replicación de todos los virus a 10  $\mu\text{M}$ . Además, en el caso de HSV-1, PV-1 y ADV-5, se observó una inhibición significativa incluso a concentraciones tan bajas como 1,25  $\mu\text{M}$  (**Figura 50**).

Los valores de  $\text{CE}_{50}$  y  $\text{CC}_{50}$  correspondientes a todos los virus y líneas celulares analizados en este capítulo se resumen en la **Tabla 10**.

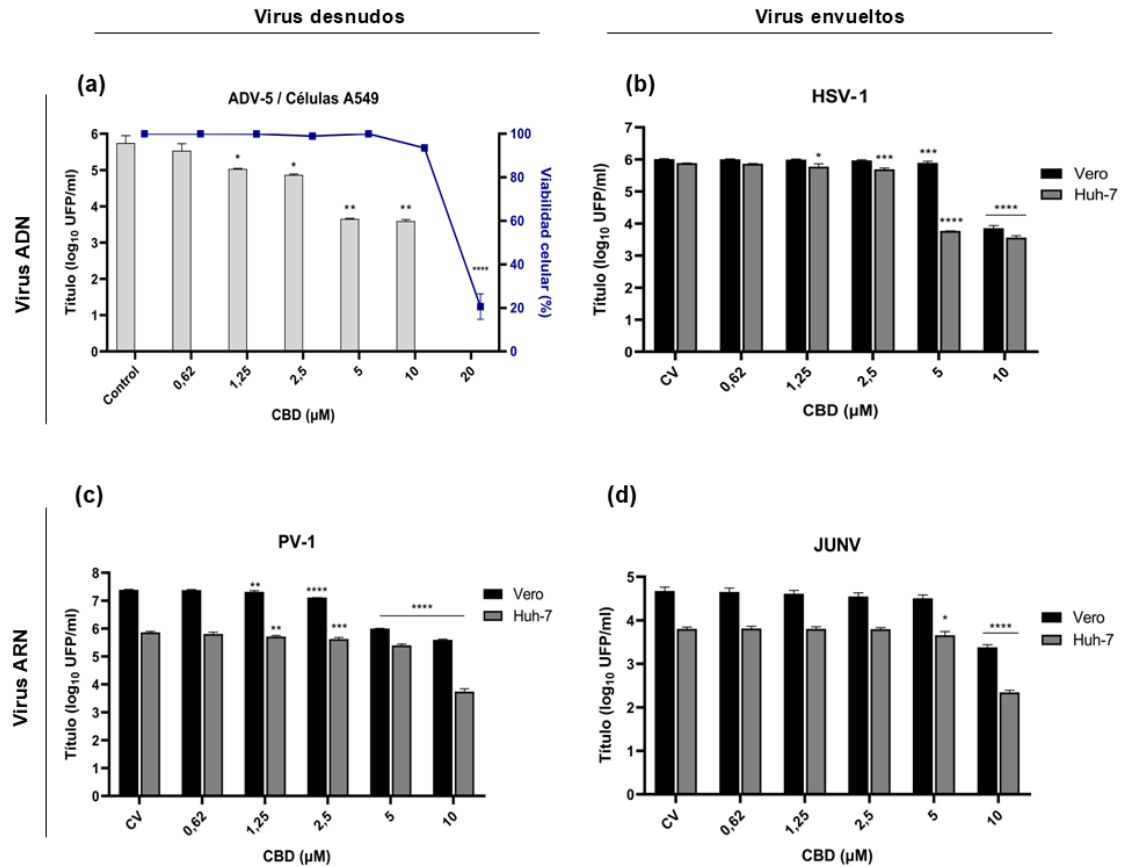


Figura 50. Actividad antiviral del CBD contra los virus ADV-5, PV-1, HSV-1 y JUNV.

Tabla 10. Citotoxicidad y actividad antiviral del CBD en las células Vero, Huh-7, ARPE-19, Swan-71 A549 y NPCs.

Línea celular	CC <sub>50</sub> (µM)	CE <sub>50</sub> (µM)							
		ZIKV	DENV-2	YFV	CHIKV	HSV-1	JUNV	PV-1	ADV-5
Vero	16,10 ± 0,28	0,87 ± 0,28	2,02 ± 0,31	2,13 ± 0,32	4,63 ± 0,47	8,27 ± 0,51	8,55 ± 0,22	4,88 ± 0,076	ND
Huh-7	17,11 ± 0,42	1,40 ± 0,04	1,47 ± 0,04	1,68 ± 0,42	ND	4,46 ± 0,201	8,50 ± 0,52	4,24 ± 0,26	ND
hRPE	15,73 ± 0,46	2,01 ± 0,05	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NPCs	30,90 ± 1,18	3,23 ± 0,17	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Swan-71	> 40	5,12 ± 1,20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A549	15,99 ± 0,49	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,12 ± 0,22

ND: no determinado

## Conclusiones parciales

En este capítulo se demostró que el CBD posee una actividad antiviral de amplio espectro, siendo capaz de inhibir la replicación de virus envueltos y no envueltos, de genoma ARN o ADN, lo que sugiere que su mecanismo de acción se basa en estructuras celulares o procesos biológicos comunes a múltiples tipos de virus.

Los estudios *in silico* iniciales indicaron que el CBD presentaba una afinidad significativa por el receptor AHR, lo cual motivó la decisión de evaluar en detalle el impacto *in vitro* del CBD sobre dicha vía. Los resultados mostraron que, en condiciones basales, el CBD induce la activación de AHR a través de su translocación nuclear. Sin embargo, cuando AHR es activado por agonistas, como ocurriría durante una infección viral, el CBD disminuye esta activación, lo que sugiere que el CBD podría actuar como un SAHRM, es decir, un compuesto capaz de modificar la actividad de esta vía de manera dependiente del contexto celular, la presencia de otros estímulos y la concentración utilizada.

Dado que, en ciertos contextos celulares como las infecciones virales, la activación de AHR impacta en la vía de NF- $\kappa$ B, también se evaluó el efecto del CBD sobre esta vía. Los resultados indicaron que, cuando NF- $\kappa$ B es activado previamente por un estímulo inflamatorio externo, el CBD atenúa dicha activación, lo que se alinea con su perfil antiinflamatorio previamente reportado<sup>115</sup>. Se observó además que el CBD tiene un impacto sobre la expresión de IFN- $\beta$ , pero no sobre los niveles de IL-6 o IL-8, lo que refuerza la hipótesis de que el CBD posee una actividad inmunomoduladora parcial, más específicamente, modulando ciertas respuestas inflamatorias sin alterar otras. Sin embargo, el hecho de que se haya observado inhibición viral en células Vero, que no producen IFN-I, indica que la modulación inmune no sería el principal mecanismo antiviral del CBD, lo que abre la puerta a otros posibles mecanismos de acción que merecen ser explorados.

El hecho de que el CBD haya demostrado actividad antiviral de amplio espectro, y que haya inhibido la replicación del ZIKV en todas las etapas de su ciclo, sugiere que podría estar actuando sobre componentes celulares comunes a múltiples etapas del ciclo viral y compartidos entre distintos virus. A partir de estos resultados, se planteó una nueva hipótesis: el fitocannabinoide ejercería su acción antiviral mediante la interacción con

las membranas celulares, afectando así etapas clave del ciclo viral en una amplia gama de virus.

Estas conclusiones parciales se sintetizan en un esquema hipotético, que se presenta en la **Figura 51**, el cual ilustra de manera visual las posibles interacciones y mecanismos de acción del CBD en relación con la inhibición viral y la modulación de vías celulares clave.

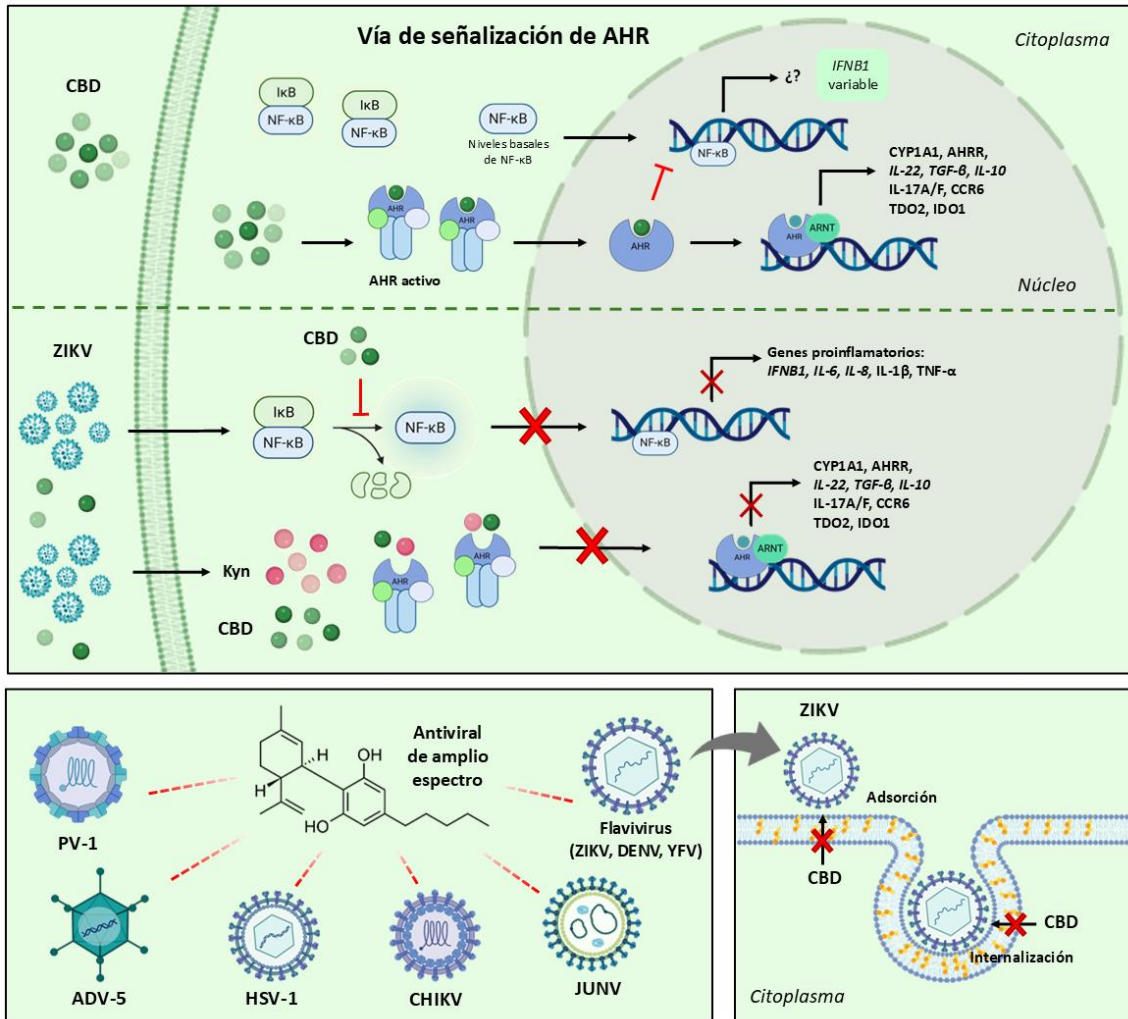


Figura 51. Modelo esquemático del capítulo 2.

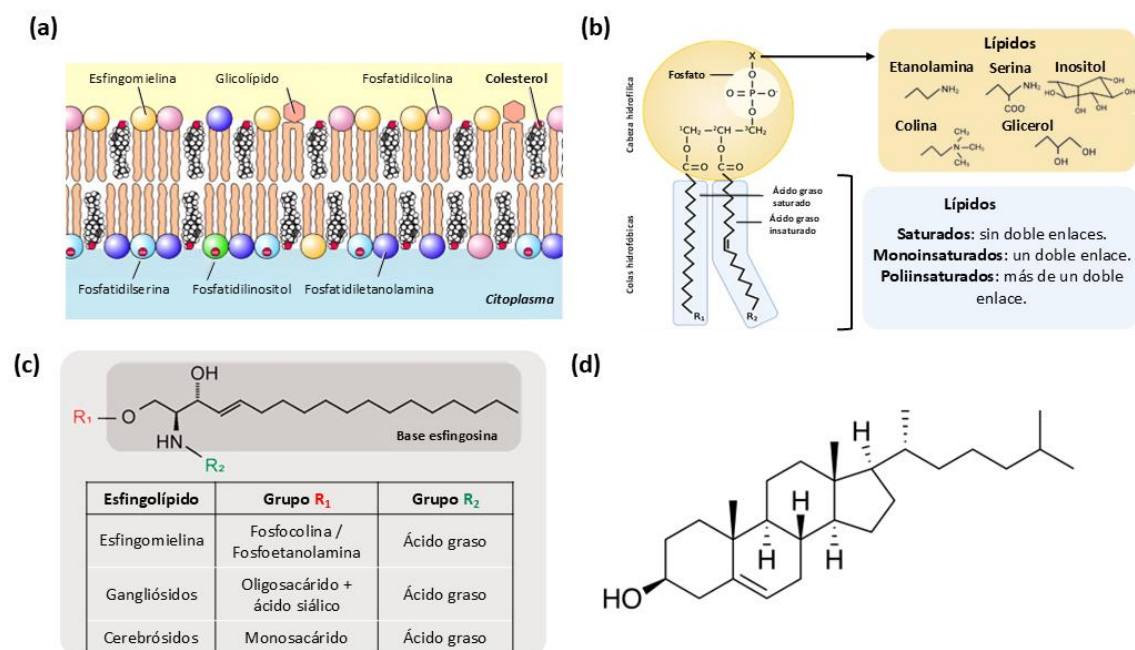
# **CAPÍTULO 3**

*Efecto del CBD sobre las  
membranas celulares*

## Introducción

### 1. Composición lipídica de las membranas celulares

Las membranas celulares son estructuras altamente dinámicas que delimitan y organizan los compartimentos de la célula. Están compuestas principalmente por una bicapa lipídica en la que se insertan proteínas integrales y periféricas, cumpliendo funciones estructurales, de transporte, señalización y reconocimiento. La composición de las membranas varía según el tipo de organela, el estado fisiológico y el tipo celular, reflejando la especialización funcional de cada compartimento. Los principales lípidos de membrana incluyen fosfolípidos, esfingolípidos y esteroides (**Figura 52**). Los fosfolípidos (PLs), como la fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) y cardiolipina (CL), poseen una cabeza polar y dos colas hidrofóbicas, y son los componentes más abundantes de la mayoría de las bicapas lipídicas. Los esfingolípidos, como la esfingomielina (SM), tienen una estructura basada en una base esfingoide y suelen concentrarse en dominios lipídicos específicos. Por otro lado, el COL es un lípido esteroide que modula la fluidez, orden y permeabilidad de las membranas al insertarse entre los fosfolípidos<sup>129–131</sup>.



**Figura 52.** Composición lipídica de las membranas celulares. (a) Representación esquemática de la bicapa lipídica de la MP. (b) Estructura general de los fosfolípidos, compuestos por una columna de glicerol unida a dos ácidos grasos (cadenas hidrofóbicas) y un grupo fosfato con una cabeza polar variable (colina, serina, inositol o etanolamina). (c) Estructura general de los esfingolípidos, compuestos por una base de

esfingosina, un ácido graso unido por enlace amida (grupo  $R_2$ ) y un grupo polar variable (grupo  $R_1$ ). Se detallan las variaciones estructurales de los principales esfingolípidos que conforman las membranas. **(d)** Estructura química del COL.

Las membranas celulares presentan una notable diversidad en su composición lipídica, lo que contribuye a sus propiedades fisicoquímicas y funcionales específicas (**Figura 53**). Si bien el COL es un componente fundamental en muchas de ellas, su distribución no es uniforme en todos los compartimentos celulares<sup>130,132,133</sup>:

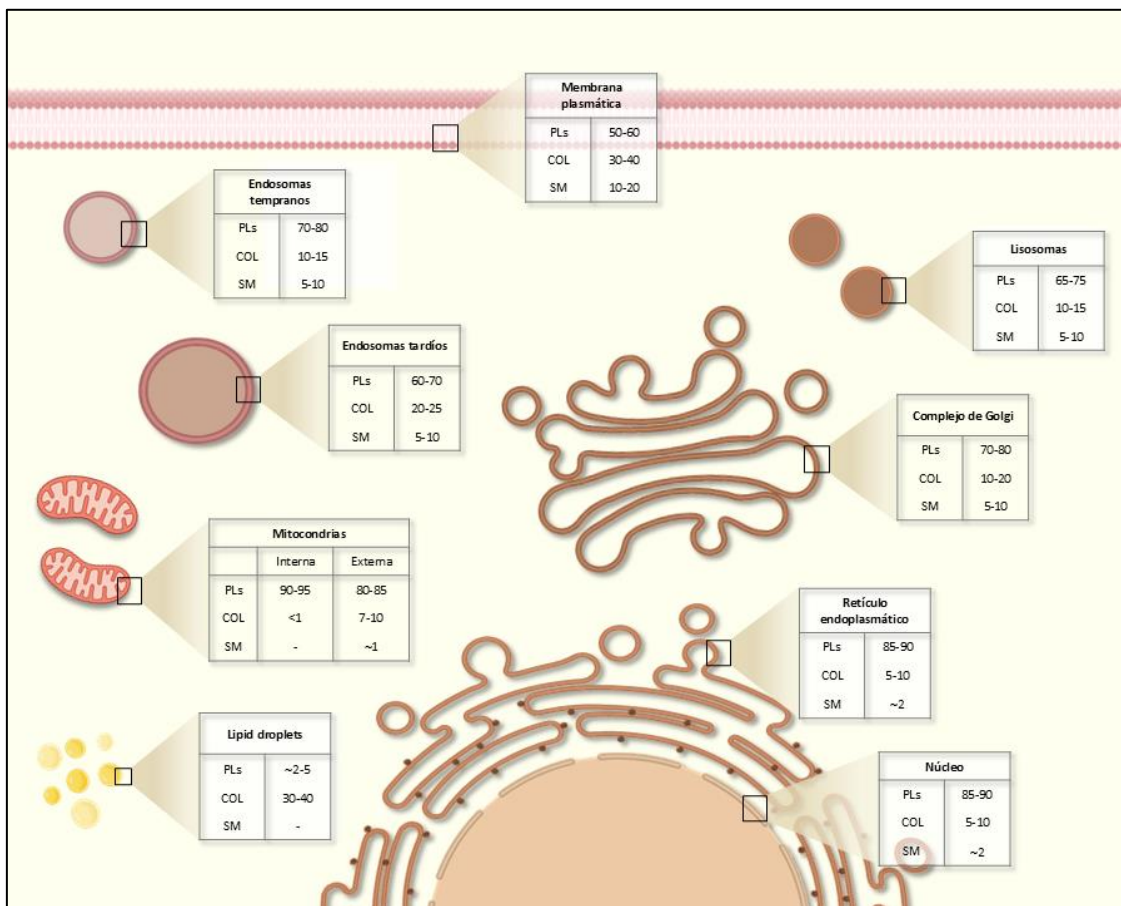
- La MP contiene los niveles más elevados de COL, lo que le confiere una estructura ordenada, rígida y menos permeable, favoreciendo la formación de microdominios lipídicos que actúan como plataformas para procesos de señalización, adhesión y endocitosis.
- El RE, las mitocondrias y el núcleo presentan una proporción significativamente menor de COL, asociada a una mayor fluidez y dinamismo, compatible con funciones como la síntesis de lípidos, el transporte vesicular y la regulación transcripcional, respectivamente.
- El complejo de Golgi y los endosomas presentan niveles intermedios de COL, adecuados para sostener procesos de maduración, clasificación y tráfico de proteínas y lípidos hacia distintos destinos intracelulares.

Por su parte, los PLs son los componentes más abundantes en casi todas las membranas, con predominancia en estructuras como el RE, el núcleo y las mitocondrias. Los esfingolípidos, aunque más restringidos, se concentran principalmente en la MP, el Golgi y los endosomas, donde contribuyen a la formación de dominios especializados y a la estabilidad estructural<sup>131</sup>.

Por otro lado, los *lipid droplets* (LDs), si bien no poseen una bicapa lipídica como las organelas previamente mencionadas, son funcionales clave en el metabolismo celular. Están delimitados por una monocapa rica en COL libre y fosfolípidos, pero su núcleo hidrofóbico contiene lípidos neutros, principalmente triglicéridos y ésteres de COL. Estas estructuras actúan como reservorios energéticos y como fuentes de lípidos para otras membranas, y participan activamente en procesos como la replicación viral, la señalización metabólica y la respuesta al estrés lipídico<sup>134,135</sup>.

Esta heterogeneidad en la distribución de lípidos no solo refleja la especialización estructural de cada compartimento, sino que también determina dinámicas clave como la organización de dominios funcionales, la modulación de proteínas de membrana, la eficiencia del tráfico intracelular y la capacidad de respuesta ante cambios en el entorno celular<sup>131,132</sup>.

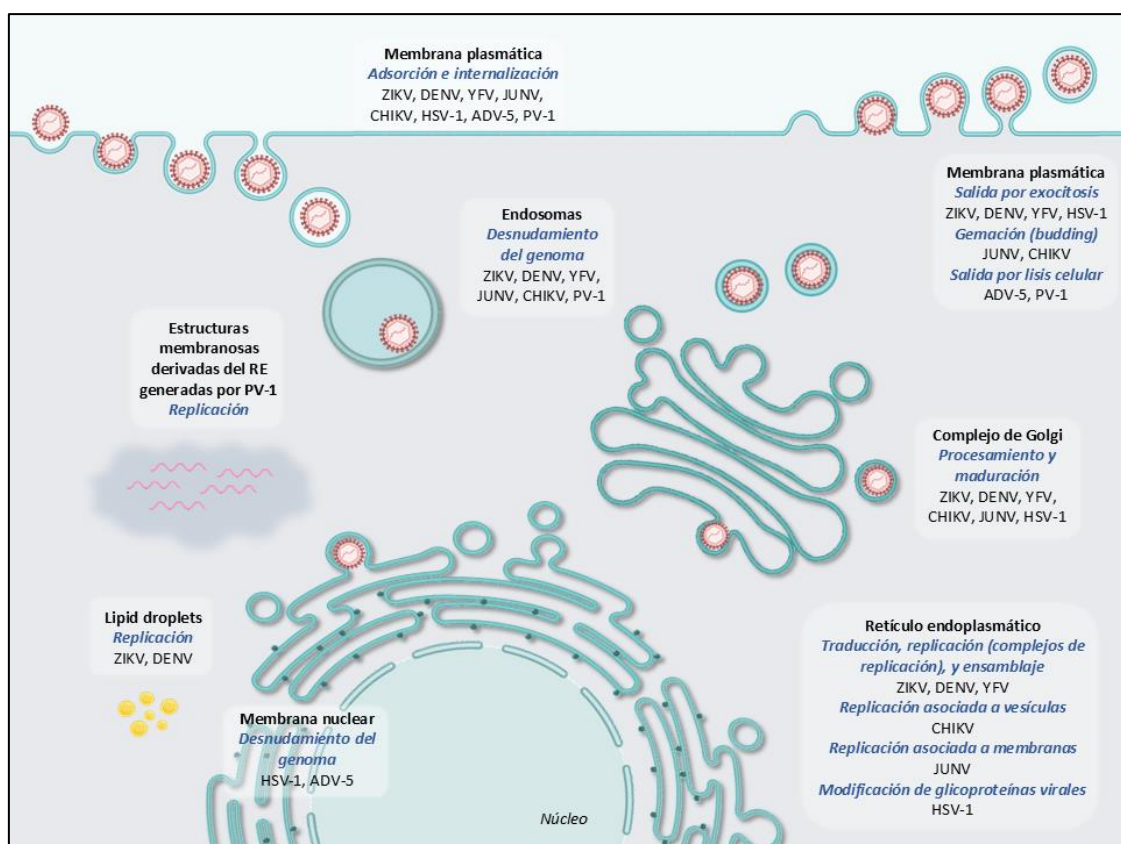
En las membranas celulares, especialmente en la MP, los lípidos pueden organizarse en dominios con distinto grado de orden: la fase Lo, rica en COL y esfingolípidos, presenta una mayor compactación lipídica, mientras que la fase Ld es más fluida y menos organizada. Esta heterogeneidad lateral forma la base de microdominios funcionales, como las balsas lipídicas. La distribución de estas fases puede verse modulada por la composición lipídica, la temperatura y la presencia de compuestos bioactivos<sup>136</sup>.



**Figura 53.** Composición lipídica de las membranas de las principales organelas con envoltura lipídica en células eucariotas. Los valores expresan rangos porcentuales de los tres principales grupos lipídicos: PLs, SM y COL. Se incluyen organelas delimitadas por bicapas lipídicas y los *lipid droplets*, los cuales poseen una monocapa de fosfolípidos. Los porcentajes son estimaciones generales y pueden variar según el tipo celular, estado fisiológico y método de medición. PLs, fosfolípidos; SM, esfingomielinea; COL, colesterol.

## 2. Las membranas celulares como blancos clave en la infección viral

Como se demostró en el capítulo anterior, el CBD presenta actividad antiviral frente a virus con distinto tipo de genoma, envoltura y mecanismos de replicación: ZIKV, DENV, YFV, JUNV, CHIKV, HSV-1, ADV-5 y PV-1. A pesar de sus diferencias, todos ellos dependen de manera crítica de las membranas celulares en distintos momentos de su ciclo replicativo. Los virus envueltos requieren la interacción con membranas celulares para la fusión durante la entrada y para adquirir su envoltura lipídica en el ensamblaje y la liberación<sup>137,138</sup>. Los virus no envueltos, si bien no poseen membrana propia, sus procesos de adsorción, endocitosis, tráfico intracelular y liberación también dependen de la arquitectura y dinámica de las membranas celulares<sup>139,140</sup>. Por otro lado, la replicación del genoma viral también se encuentra estrechamente vinculada a compartimentos membranosos. Los virus con genoma de ARN replican en estructuras derivadas del RE, mientras que los virus con genoma de ADN lo hacen en el núcleo, por lo que requieren interacción con la membrana nuclear para liberar o importar su material genético<sup>141,142</sup> (**Figura 54**).



**Figura 54.** Interacción de virus con compartimentos celulares membranosos durante su ciclo replicativo. Se ilustran los principales eventos del ciclo viral en relación con estructuras celulares que contienen

membranas, incluyendo adsorción, internalización, desnudamiento del genoma, replicación, ensamblaje y salida. Los mecanismos varían según el virus e involucran compartimentos como endosomas, RE, complejo de Golgi, MP y estructuras derivadas de estas. Los virus representados (ZIKV, DENV, YFV, JUNV, HSV-1, ADV-5 y PV-1) corresponden a aquellos en los que se ha demostrado un efecto antiviral del CBD.

### 3. Sistemas modelo de membrana en estudios biofísicos: GUVs y MLVs

Dado que las membranas celulares son estructuras altamente dinámicas y complejas, su estudio directo en células puede verse dificultado por la presencia de múltiples componentes y respuestas celulares activas. Por este motivo, se emplean sistemas modelo artificiales como las MLVs y las GUVs, que permiten analizar propiedades biofísicas específicas en condiciones controladas<sup>143,144</sup> (Figura 55).

Las MLVs, con un tamaño mayor a 400 nm, están formadas por múltiples bicapas concéntricas separadas por espacios acuosos. Aunque no replican exactamente la arquitectura de las membranas celulares, resultan especialmente útiles para estudios espectroscópicos de orden lipídico, ya que su estructura proporciona una mayor señal y reproducibilidad<sup>145</sup>. Por otro lado, las GUVs, con diámetros mayores a 1000 nm, están compuestas por una única bicapa y permiten observar directamente la formación de dominios lipídicos mediante microscopía de fluorescencia<sup>146</sup>.

En una primera etapa del trabajo, se emplearon ambos sistemas como modelos de membrana para estudiar el efecto del CBD sobre la organización lipídica. Posteriormente, se continuó con el estudio utilizando membranas celulares, a fin de analizar si los efectos observados en los modelos se replicaban en un sistema biológico real.

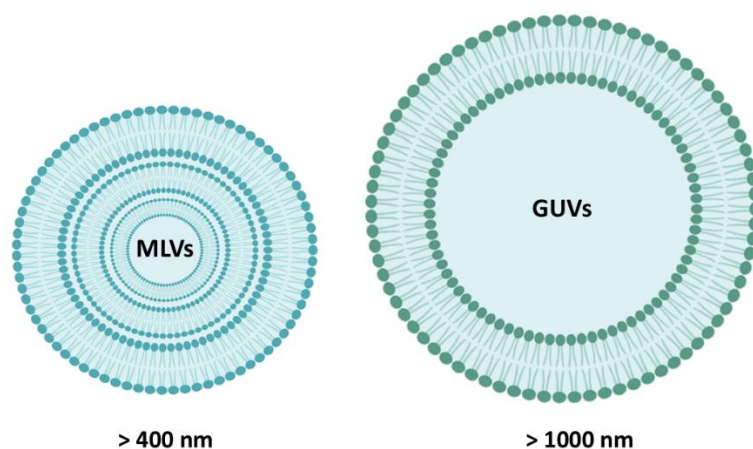


Figura 55. Representación esquemática de las MLVs y las GUVs.

## Resultados

### 1. Efecto del CBD sobre membranas artificiales

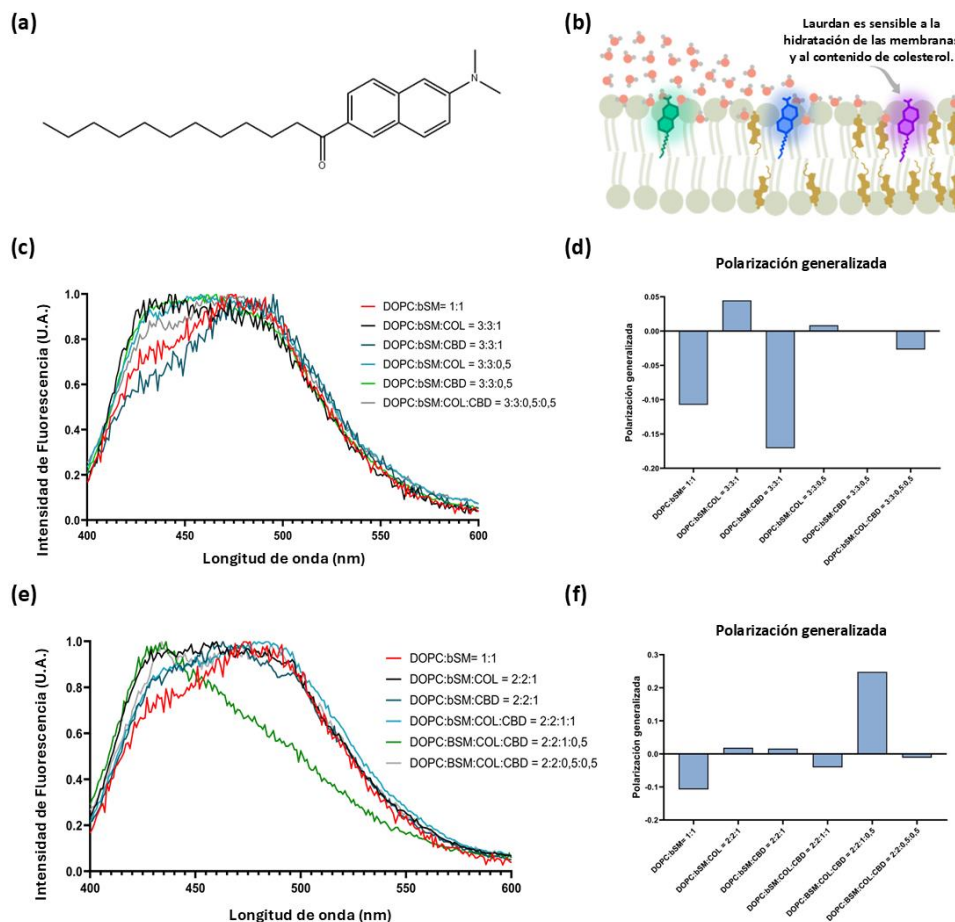
#### 1.1. Impacto en el empaquetamiento lipídico de las MLVs

Como aproximación inicial para estudiar el impacto del CBD sobre las membranas, se utilizaron MLVs como modelo simplificado de bicapa lipídica. Para determinar el efecto del CBD sobre el ordenamiento lipídico, se utilizó la sonda de polarización Laurdan, la cual se inserta en la región de interfase de la bicapa y es sensible al grado de hidratación y al empaquetamiento de los lípidos (**Figura 56a y 56b**)<sup>147</sup>. En entornos más ordenados y compactos, la sonda emite con un máximo cercano a los 440 nm, mientras que en membranas desordenadas (mayor hidratación), el máximo se desplaza hacia los 490 nm. A partir de estos espectros de emisión se calcula un parámetro denominado GP, que refleja cuantitativamente el grado de orden lipídico: valores altos de GP indican membranas más ordenadas, mientras que valores bajos reflejan mayor desorden. Este método permite detectar incluso cambios sutiles en la organización de la bicapa.

Para la generación de las vesículas se utilizaron dos grupos de composiciones lipídicas diferenciadas por su contenido relativo de COL, con el objetivo de representar de manera aproximada distintos tipos de membranas celulares, como la MP y las MPn. Si bien no reproducen fielmente las proporciones presentes en células, estas mezclas funcionan como modelos simplificados. Además, las composiciones se seleccionaron en base al diagrama ternario de fases, eligiendo proporciones que favorecen la coexistencia de fases lipídicas.

Los resultados mostraron que la incorporación de CBD produjo un efecto variable dependiendo de la composición lipídica de las vesículas. En la mayoría de los sistemas analizados, el CBD indujo una disminución de los valores de GP, lo que indica un aumento en el desorden de la membrana. No obstante, este efecto no fue homogéneo en todas las composiciones: en ciertas mezclas, como las que contienen altos niveles de COL, el cambio fue menor o incluso no significativo (**Figura 56c–f**). Estas observaciones sugieren que el impacto del CBD sobre el ordenamiento lipídico depende del entorno membranoso en el que se incorpora, y podría estar influenciado por factores como el

contenido de lípidos saturados, la proporción de COL y la capacidad de formar dominios ordenados.



**Figura 56.** Evaluación del orden de membrana en MLVs con distintas composiciones lipídicas mediante espectroscopía de fluorescencia con la sonda Laurdan. **(a)** Estructura química de Laurdan. **(b)** Esquema representativo de la inserción de Laurdan en la bicapa lipídica<sup>147</sup>. **(c)** Espectros de emisión de Laurdan para MLVs con composiciones DOPC:SM (1:1), DOPC:SM:COL (3:3:1 y 3:3:0,5), DOPC:SM:CBD (3:3:1 y 3:3:0,5), y DOPC:SM:COL:CBD (3:3:0,5:0,5). **(d)** Valores de GP calculados a partir de los espectros del panel (c), como indicador del orden lipídico de la membrana. **(e)** Espectros de emisión de Laurdan para composiciones DOPC:SM (1:1), DOPC:SM:COL (2:2:1), DOPC:SM:CBD (2:2:1), y DOPC:SM:COL:CBD (2:2:1:1, 2:2:1:0,5 y 2:2:0,5:0,5). **(f)** Valores de GP correspondientes a las condiciones del panel (e).

### 1.2. Impacto del CBD en la organización de dominios lipídicos en GUVs

Con el fin de complementar los resultados obtenidos en MLVs y obtener una visualización directa de los efectos del CBD sobre la organización de membranas individuales, se obtuvieron GUVs como sistema modelo.

Las imágenes obtenidas mostraron que el CBD modifica la organización de las membranas lipídicas de las GUVs. En las vesículas generadas con composiciones con

menor COL relativo respecto a bSM y DOPC (**Figura 57a–c**), no se observaron diferencias marcadas entre aquellas formadas únicamente con CBD y las que contenían solo COL. Sin embargo, cuando las GUVs se obtuvieron a partir de una mezcla de ambos compuestos, se evidenció un notable aumento de la fase Lo. En cuanto al número de dominios presentes por vesícula, no se registraron variaciones significativas (**Figura 57c**).

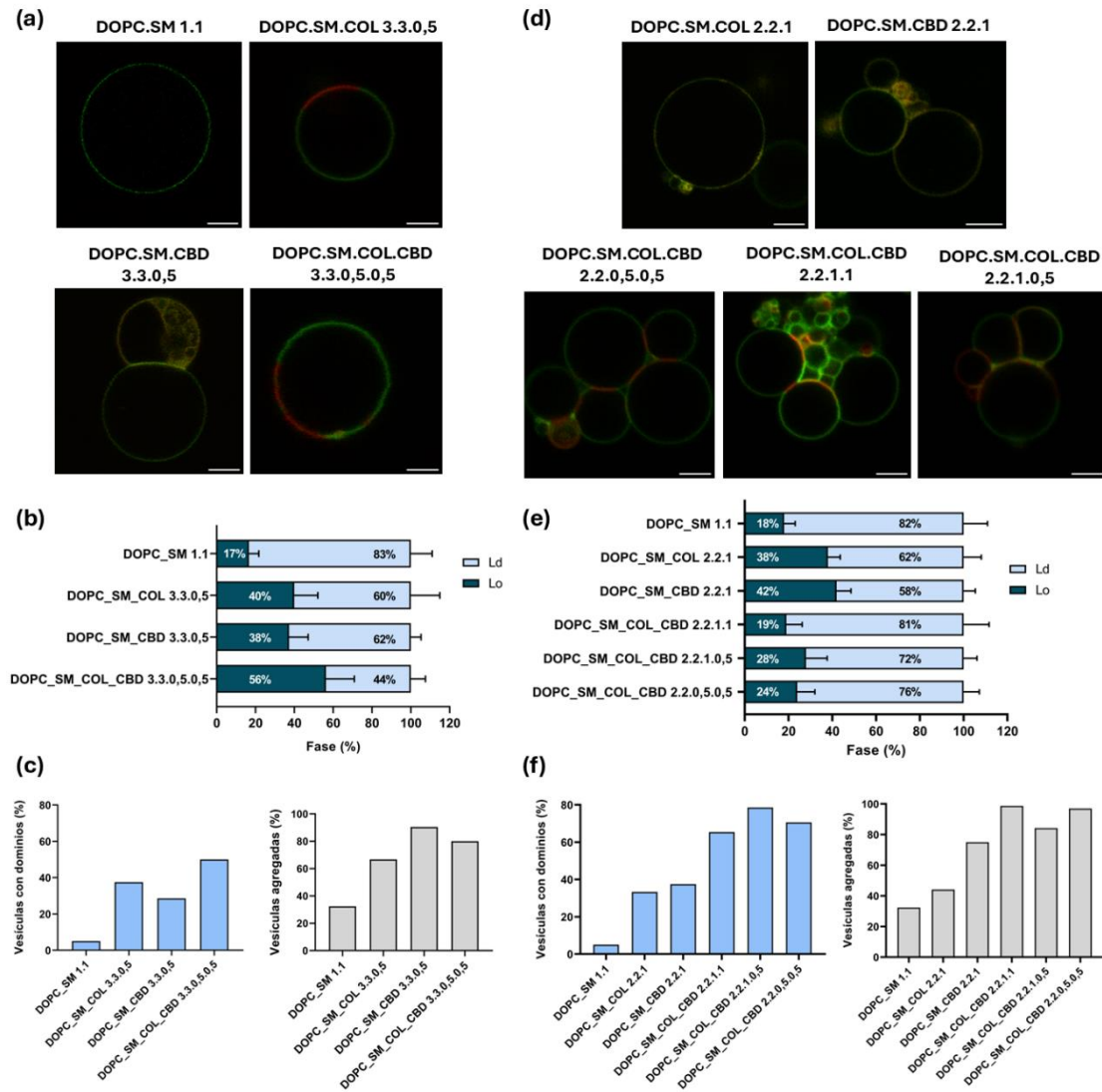
Por otro lado, se analizaron vesículas obtenidas con otras proporciones lipídicas, en las que la proporción de COL en relación a DOPC y SM fue mayor (**Figura 57d–f**), composiciones más similares a la de una MP. Contrariamente a lo observado previamente, se detectó un aumento en la proporción de fase Ld en las vesículas que contenían CBD, en comparación con aquellas sin CBD, pero con COL. Este patrón sugiere que el CBD podría desestabilizar la organización lipídica ordenada, promoviendo un mayor desorden en la bicapa. Además, se observó un incremento en el número de vesículas con dominios cuando el CBD se combinó con COL, lo que indica que este compuesto podría favorecer la formación de microdominios lipídicos, posiblemente mediante interacciones específicas con componentes particulares de la membrana.

Un hallazgo especialmente llamativo, observado en todas las condiciones analizadas, fue la tendencia a la agregación de vesículas que contenían CBD (**Figura 57a–f**). Asimismo, se detectó que las zonas de contacto entre vesículas mostraban fluorescencia correspondiente a regiones Lo, lo que sugiere una posible reorganización lipídica en esos sitios. La agregación observada podría explicarse por mecanismos múltiples y no excluyentes. Por un lado, podría haber alteraciones en la organización lipídica, es decir, el CBD podría inducir una redistribución de los lípidos que favorezca la formación de dominios ordenados en las regiones de contacto, estabilizando así la interacción entre vesículas. Por otro lado, podría haber cambios en la carga superficial, la incorporación del CBD podría modificar la densidad de carga o la distribución de grupos polares en la superficie de la bicapa, disminuyendo las repulsiones electrostáticas entre vesículas y facilitando su agregación. Adicionalmente, podría estar ocurriendo una disminución de la fluidez local de la membrana, esto podría favorecer la formación de interfaces más estables entre vesículas, especialmente si se concentran dominios Lo en esas áreas.

Estos fenómenos observados sugieren fuertemente que el CBD se incorpora dentro de la bicapa lipídica de las GUVs, alterando su organización interna. Esta interpretación se

ve respaldada tanto por la naturaleza hidrofóbica del CBD, que favorece su inserción en ambientes lipídicos, como por estudios previos con otras moléculas hidrofóbicas pequeñas que, al incorporarse en membranas, generan efectos sobre la separación de fases, la rigidez de membrana y la tensión de línea entre dominios. En particular, se ha demostrado que compuestos como propofol, vitamina E y pireno inducen cambios en la organización lateral y en las propiedades mecánicas de membranas modelo, incluso sin poseer carga neta, lo cual refuerza la plausibilidad del mecanismo propuesto para el CBD<sup>148–150</sup>.

Estos resultados, junto con los obtenidos en MLVs, indican que el CBD es capaz de alterar la organización de las bicapas lipídicas en sistemas artificiales. Además, los datos sugieren que el CBD no solo modifica el grado de ordenamiento, sino que también impacta sobre propiedades fisicoquímicas globales de las membranas, como la adhesividad y la estabilidad de las vesículas.



**Figura 57.** Evaluación del efecto del CBD en las GUVs con distintas composiciones lipídicas. **(a)** Imágenes representativas de GUVs compuestas por DOPC:SM (1:1), DOPC:SM:COL (3:3:0,5), DOPC:SM:CBD (3:3:0,5) y DOPC:SM:COL:CBD (3:3:0,5:0,5), teñidas con sondas fluorescentes específicas para fases Lo y Ld. **(b)** Cuantificación del porcentaje relativo de las fases Lo y Ld observadas en las GUVs correspondientes a las condiciones del panel (a). **(c)** Porcentaje de vesículas con dominios (izquierda) y porcentaje de vesículas agregadas (derecha) en las mismas condiciones. **(d-f)** Mismo análisis para GUVs con otras composiciones lipídicas: DOPC:SM:COL (2:2:1), DOPC:SM:CBD (2:2:1), DOPC:SM:COL:CBD (2:2:0,5:0,5), DOPC:SM:COL:CBD (2:2:1:1) y (2:2:1:0,5). Se muestran imágenes representativas **(d)**, distribución porcentual de fases Lo y Ld **(e)** y cuantificación de vesículas con dominios o agregadas **(f)**. Barras de escala: 5  $\mu$ m.

## 2. Efecto del CBD sobre las membranas celulares

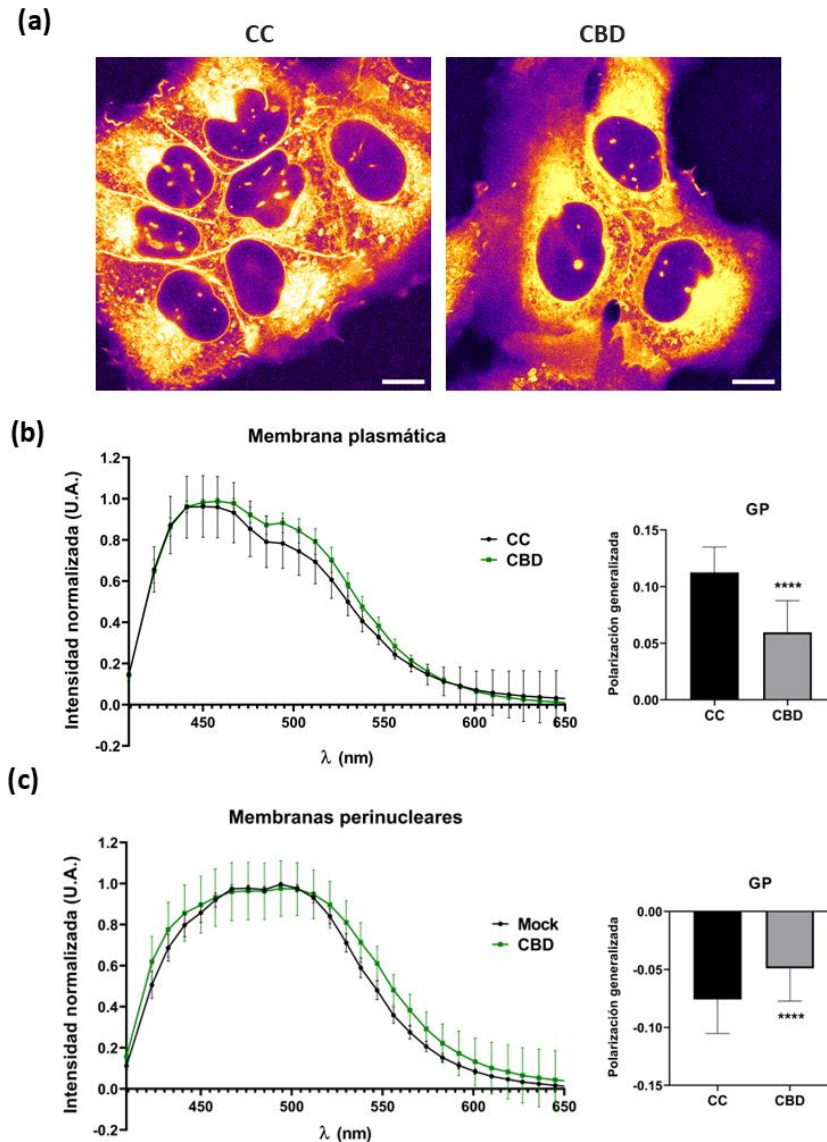
### 2.1. Evaluación del orden lipídico

Basándonos en los resultados obtenidos en sistemas artificiales, donde se observó que el CBD altera la organización lipídica de las membranas, se avanzó hacia un modelo biológico para evaluar si este compuesto también ejerce efectos sobre las membranas

celulares en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, en una primera instancia se evaluó el orden en células utilizando la sonda Laurdan.

El análisis espectral de Laurdan mostró diferencias significativas en la organización lipídica de las membranas en respuesta al tratamiento con CBD. En las MP, los espectros de emisión reflejaron un corrimiento hacia longitudes de onda mayores, indicando un ambiente más desordenado. Este resultado se corroboró con los valores de GP, que fueron significativamente menores en comparación con el control, lo que indica una disminución en el orden de la membrana (**Figura 58a y b**). En contraste, en las MPn se observó un efecto opuesto, con un corrimiento espectral hacia longitudes de onda menores y valores de GP más elevados, lo que indica un aumento en el orden de la membrana (**Figura 58a y c**).

Este comportamiento diferencial sugiere que el CBD actúa de manera compartimentalizada, alterando la organización lipídica según la región celular. La estabilización del orden en las MPn podría deberse a una redistribución local de lípidos o a un efecto indirecto sobre el metabolismo lipídico, considerando que el RE es un sitio clave en la síntesis de COL y otros lípidos. No obstante, dado el corto tiempo de tratamiento, es poco probable que este efecto pudiese estar mediado por mecanismos transcripcionales sostenidos, por lo que podrían estar involucradas rutas postraduccionales o fenómenos de redistribución rápida. En este sentido, trabajos previos como el de Guard et al. (2022) han demostrado que el CBD puede insertarse en las membranas imitando el comportamiento del COL, lo que podría explicar las alteraciones observadas en el ordenamiento lipídico sin necesidad de cambios en la biosíntesis de lípidos<sup>127</sup>.



**Figura 58.** (a) Células marcadas con Laurdan. La imagen se presenta en pseudocolor utilizando la escala LUT Fire del software ImageJ. (b) Espectros de emisión y valores de GP correspondientes a la MP en células tratadas con CBD y no tratadas (control). (c) Espectros y valores de GP correspondientes a las MPn en células tratadas con CBD y no tratadas.

Los resultados obtenidos se corresponden con los observados en los modelos de GUVs: las vesículas con menor proporción de COL, que presentan una organización más similar a la de la MPn, mostraron un mayor porcentaje de fase Lo en presencia de CBD. En cambio, aquellas con mayor contenido de COL, que se aproximan al perfil lipídico de la MP, exhibieron un predominio de fase Ld. Si bien estas composiciones no reproducen de forma exacta la organización lipídica de las membranas celulares, representan modelos útiles para explorar el comportamiento diferencial del CBD en contextos con distintas proporciones de COL.

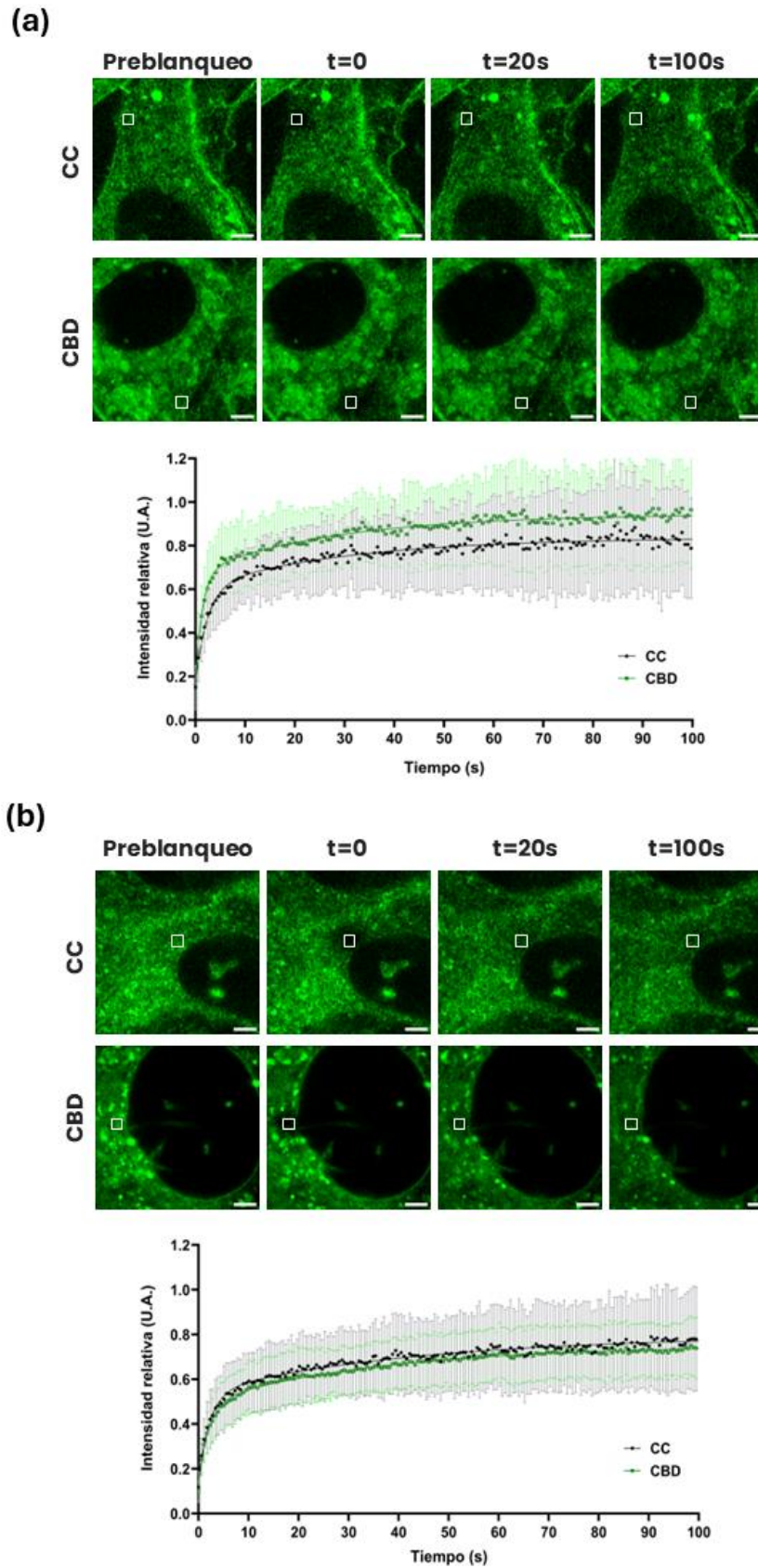
En conjunto, estos hallazgos sugieren que el efecto del CBD sobre la organización de las membranas celulares es dependiente del entorno lipídico: tiende a desordenar membranas ricas en COL como la MP, y a ordenar aquellas pobres en COL como la MPn.

## **2.2. Análisis de la dinámica de difusión del COL**

Se evaluó la difusión del COL en células tratadas con CBD mediante ensayos de FRAP utilizando la sonda BODIPY-COL. El análisis se realizó en dos regiones celulares: la MP y las MPn.

En la MP, el tratamiento con CBD no generó diferencias estadísticamente significativas respecto al control, pero se observó una tendencia hacia una mayor movilidad del COL (**Figura 59a**). Específicamente, se registró una disminución en el  $t_{1/2}$  y un aumento en  $D$ , acompañado de una leve disminución en la FIM (**Tabla 11**). Estos resultados indican que en las células tratadas con CBD, el COL presenta una mayor movilidad en la MP, posiblemente como consecuencia de una reorganización lipídica que genera un ambiente más dinámico.

Por otro lado, en las MPn tampoco se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre condiciones. No obstante, se observó una leve reducción en el  $t_{1/2}$  en células tratadas con CBD (**Figura 59b** y **Tabla 11**). Esta disminución podría estar indicando que el COL se redistribuye más rápidamente en estas membranas internas, quizás por una reorganización local de lípidos o cambios sutiles en el microentorno que afectan la cinética del proceso, aunque sin alterar significativamente su movilidad general.



**Figura 59.** Análisis de la difusión de COL mediante FRAP. Imágenes representativas y curvas de recuperación para células control (CC) y tratadas con CBD, en regiones de (a) MP y (b) MPn. Las regiones blanqueadas y analizadas están indicadas con recuadros blancos. Barra de escala: 5  $\mu\text{m}$ .

**Tabla 11.** Parámetros obtenidos a partir de las curvas de recuperación de FRAP

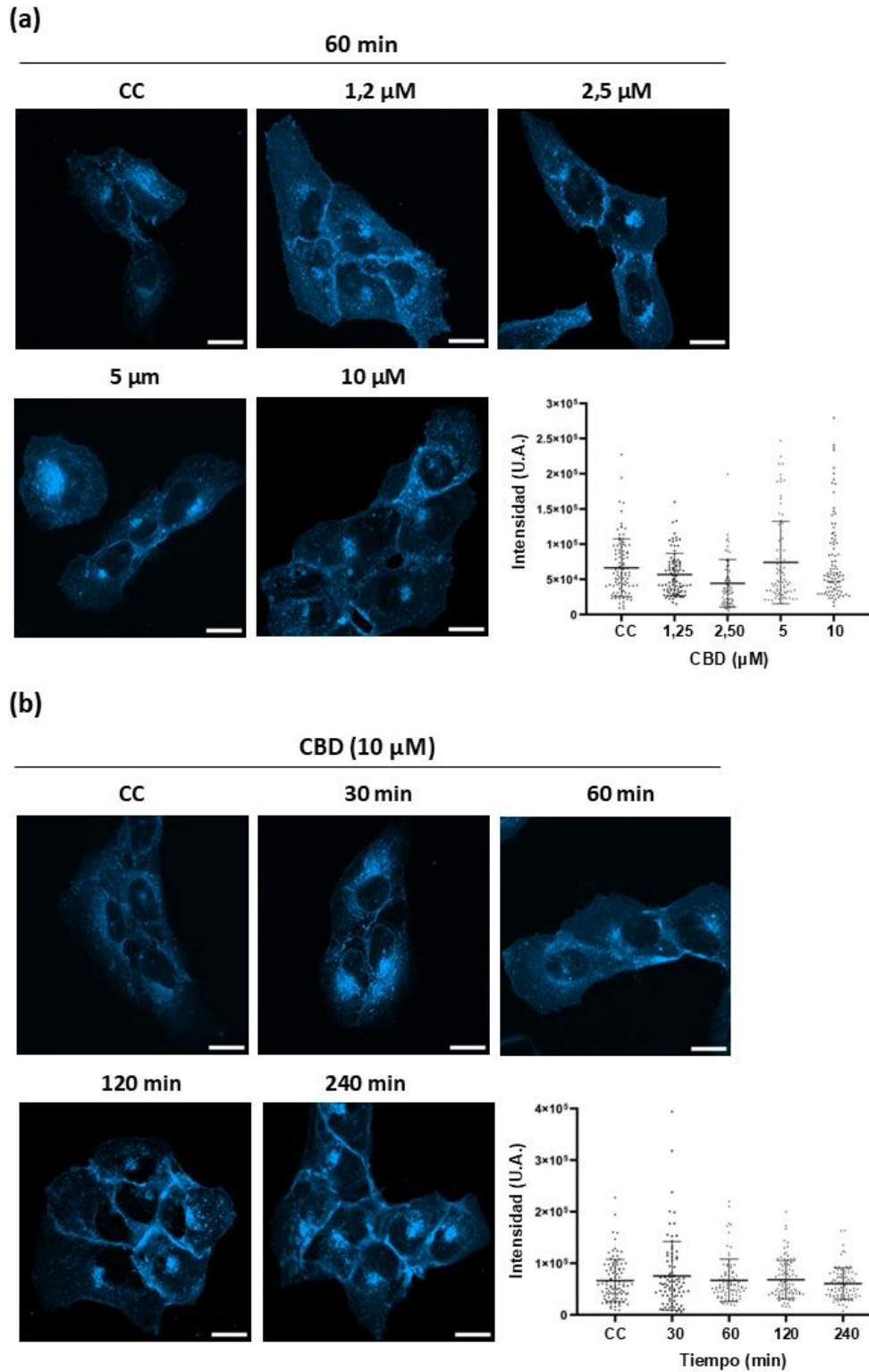
Parámetro	MP		MPn	
	CC	CBD	CC	CBD
$t_{1/2}$ (s)	1,67	1,53	1,57	1,418
fM	0,64	0,655	0,601	0,584
fIM	0,351	0,344	0,398	0,415
D ( $\mu\text{m}^2/\text{s}$ )	0,0617	0,071	0,062	0,069

Al comparar los resultados obtenidos con Laurdan y BODIPY-COL, se observa que el efecto del CBD sobre la MP y las MPn no es uniforme y depende del parámetro evaluado. En la MP, Laurdan mostró una disminución en el orden lipídico tras el tratamiento, lo que concuerda con el aumento en la movilidad del COL observado mediante FRAP. En contraste, en las MPn, Laurdan indicó un aumento en el orden, mientras que los ensayos con BODIPY-COL no reflejaron una disminución de la movilidad, sino más bien una recuperación más rápida de la fluorescencia (reducción de  $t_{1/2}$ ), aunque este cambio fue casi imperceptible. Aunque ambas técnicas evalúan propiedades distintas (orden lipídico en el caso de Laurdan, y difusión de COL para FRAP), los resultados sugieren que el CBD induce una reorganización diferencial de las membranas según la región celular, con un efecto más marcado en la MP y modificaciones más sutiles en las MPn.

### **2.3. Distribución y contenido de COL celular**

La filipina es una sonda fluorescente que se une específicamente al COL no esterificado, permitiendo evaluar su cantidad y distribución en las membranas celulares<sup>151</sup>. En este estudio, se cuantificó la fluorescencia total de filipina en células tratadas con CBD, variando tanto el tiempo de exposición como la concentración del compuesto. Los resultados no mostraron diferencias significativas en la intensidad total de fluorescencia, lo que sugiere que los niveles globales de COL no se ven alterados por el tratamiento (**Figura 60**). Sin embargo, esta metodología presentó limitaciones sustanciales: la sonda resultó ser inestable y susceptible al blanqueo fotónico, lo que dificultó la obtención de mediciones confiables de intensidad. Esta alta susceptibilidad al fotoblanqueo constituye una limitación importante para su aplicación cuantitativa, ya que podría

haber afectado la sensibilidad de la técnica para detectar cambios sutiles en el contenido de COL.



**Figura 60.** Efecto del CBD en la distribución de COL en células utilizando la sonda filipina. **(a)** Células tratadas con CBD (10  $\mu\text{M}$ ) a distintos tiempos y cuantificación de la intensidad de fluorescencia. **(b)** Células tratadas con diferentes concentraciones de CBD durante 60 min y cuantificación de la intensidad de fluorescencia. Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ .

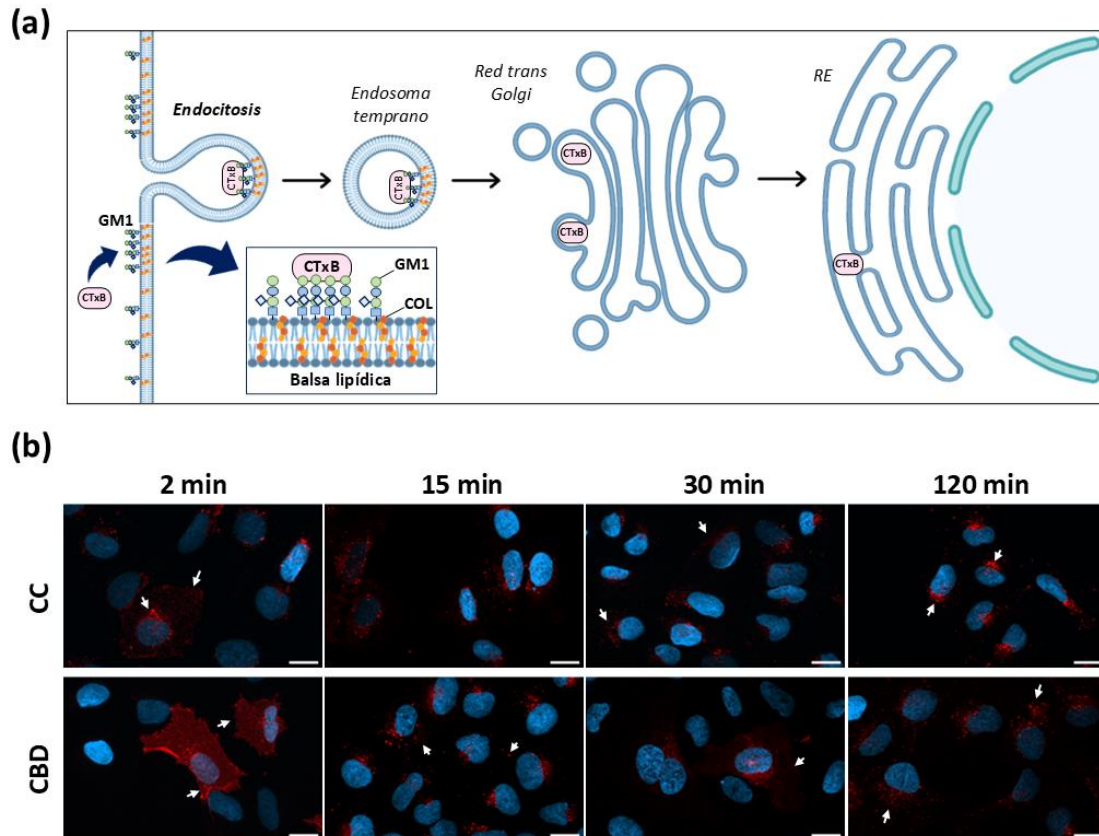
#### **2.4. Estudio exploratorio del tráfico intracelular de la CTxB**

La CTxB se utiliza ampliamente como herramienta para estudiar el transporte intracelular asociado a dominios de membrana, ya que se une específicamente al gangliósido GM1, el cual se encuentra enriquecido en regiones ordenadas conocidas como balsas lipídicas (*lipid rafts*). Tras su unión a la MP, la CTxB es internalizada por endocitosis y sigue una ruta retrógrada bien caracterizada que incluye primero su paso por endosomas tempranos, luego el aparato de Golgi trans y finalmente, el RE (**Figura 61a**). Esta propiedad la convierte en una sonda útil para monitorear el tráfico vesicular dependiente de estructuras membranosas.

Este experimento se diseñó a partir de los resultados descritos en el capítulo anterior, que indicaron que el CBD afecta las etapas tempranas de la infección viral, incluyendo procesos como la adsorción y la internalización. Con el objetivo de explorar si estos efectos pueden estar vinculados a alteraciones en la organización de las *lipid rafts* y, en consecuencia, en el tráfico intracelular, se decidió analizar la dinámica de transporte de CTxB como aproximación funcional. Dado que esta vía involucra múltiples estructuras membranosas, su estudio también permite obtener información general sobre posibles efectos del CBD en el comportamiento de los compartimentos celulares.

Para ello, células tratadas o no con CBD fueron incubadas con CTxB conjugada a Alexa Fluor™ 555 durante distintos tiempos de internalización (2, 15, 30 y 120 min), y analizadas mediante microscopía de fluorescencia. En las células control, la toxina se localizó inicialmente en la MP, seguida de una redistribución hacia vesículas internas y, finalmente, una acumulación en regiones perinucleares, como se espera para esta vía de transporte. En contraste, en las células tratadas con CBD se observó desde los primeros minutos una distribución más dispersa en el citoplasma a lo largo del tiempo, con vesículas ubicadas en regiones más amplias y menos concentradas en el área perinuclear. Estas diferencias en la organización espacial se indican con flechas blancas en las imágenes para facilitar su interpretación (**Figura 61b**). La dispersión del marcado puede interpretarse de dos maneras no excluyentes. Por un lado, podría deberse a una alteración de las balsas lipídicas, ya que CTxB se une específicamente a GM1, un componente clásico de estos microdominios. Si el CBD afecta la formación, estabilidad o distribución de las balsas, GM1 podría no concentrarse en regiones específicas,

generando un patrón de fluorescencia más difuso. Por otro lado, el transporte intracelular de CTxB podría encontrarse modificado, ya que este proceso depende del tránsito a través de compartimentos membranosos organizados. Alteraciones inducidas por el CBD en la arquitectura de las membranas o en su dinámica podrían comprometer este tráfico, contribuyendo también a una distribución intracelular más dispersa de la toxina.



**Figura 61.** (a) Esquema del transporte retrógrado del complejo GM1-CTxB desde la MP hacia el RE, vía endosomal y red trans-Golgi. (b) Imágenes de fluorescencia representativas de células control (CC) y tratadas con CBD durante 1 h, incubadas con CTxB durante distintos tiempos (2, 15, 30 y 120 min) para analizar su internalización y tráfico intracelular. Barra de escala: 20  $\mu$ m.

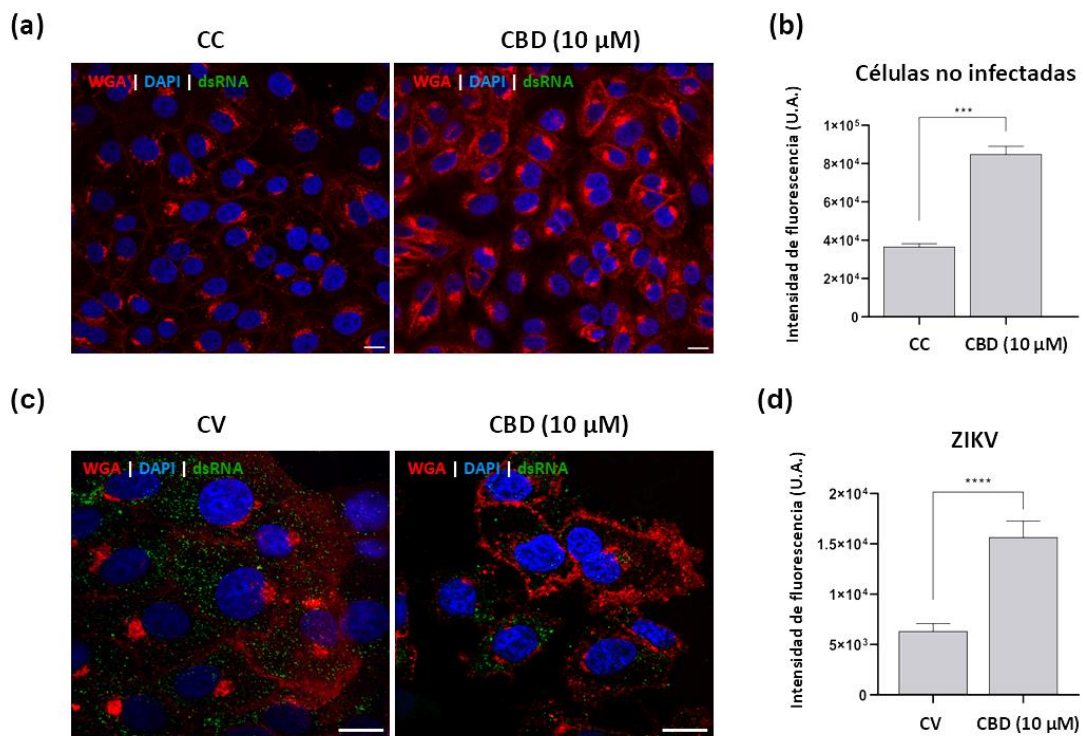
### 3. Efecto del CBD sobre las membranas en el contexto de la infección viral

#### 3.1. Estudio de la organización de membranas en células infectadas con ZIKV

Tras evidenciar que el CBD altera el orden de las membranas celulares en ausencia de infección, se avanzó hacia un modelo experimental que incorporara el contexto viral. Como primer acercamiento exploratorio, se utilizaron células infectadas con ZIKV y tratadas con CBD durante 48 h, empleando la sonda fluorescente WGA como marcador de membranas. WGA es una lectina que se une de manera no enzimática a residuos de

N-acetil-D-glucosamina y ácido siálico presentes en glicoproteínas y glicolípidos, localizados tanto en la MP como en compartimentos perinucleares.

Los resultados mostraron un aumento en la intensidad de fluorescencia en células tratadas con CBD, tanto en ausencia como en presencia de infección con ZIKV, en comparación con sus respectivos controles (**Figura 62**). Esta observación sugiere que el CBD induce modificaciones en la organización general de las membranas celulares, lo que podría alterar la distribución o accesibilidad de glicoconjugados presentes en la superficie celular y en compartimentos internos. Estos resultados se correlacionan con lo observado en los experimentos realizados con Laurdan y la CTxB. En el primer caso, se evidenció que el tratamiento con CBD afecta el orden lipídico en distintas regiones celulares, mientras que el uso de la CTxB, marcador clásico de dominios enriquecidos en GM1, mostró una distribución intracelular más difusa en células tratadas. En conjunto, estos hallazgos apuntan a una reorganización de los microdominios lipídicos, como las balsas, cuya alteración podría modificar no solo el orden de las bicapas, sino también la organización y accesibilidad de glicoconjugados, afectando potencialmente procesos clave durante la infección viral.



**Figura 62.** Células tratadas con 10 μM de CBD o no tratadas (control), **(a)** no infectadas y **(b)** infectadas con ZIKV, ambas fijadas con PFA al 4% y marcadas con WGA. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en **(c)** células no infectadas y **(d)** células infectadas. Barra de escala: 20 μm.

### 3.2. Cuantificación de COL total

Para cuantificar los niveles globales de COL celular en un contexto de infección viral, se empleó un ensayo enzimático fluorométrico. Esta metodología permite detectar COL total en lisados celulares completos, y resultó más adecuada que la tinción con filipina, la cual presentó alta variabilidad y limitaciones técnicas para la cuantificación. Dado que los ciclos de replicación de ZIKV y DENV superan las 12-18 h, el tratamiento con CBD se mantuvo durante 48 h antes de realizar la medición, tal como se estableció en los ensayos de actividad antiviral. Además de las condiciones infectadas, se incluyó un grupo de células no infectadas tratadas con CBD para evaluar si los cambios observados eran atribuibles al compuesto y no a la infección en sí. Los resultados mostraron una disminución significativa en la cantidad de COL total en todos los grupos tratados con CBD, tanto en células no infectadas como en aquellas infectadas con ZIKV o DENV-2 (Figura 63). Adicionalmente, se observó que el efecto fue dependiente de su concentración, obteniéndose una reducción mayormente significativa para la concentración de 10  $\mu\text{M}$ . Estos datos confirman que el CBD reduce los niveles de COL total celular, y sugieren que este efecto se mantiene incluso en un contexto de infección viral activa.



**Figura 63.** Cuantificación del COL total en células tratadas durante 48 h con 5  $\mu\text{M}$  o 10  $\mu\text{M}$  de CBD. (a) Células no infectadas. (b) Células infectadas con ZIKV. (c) Células infectadas con DENV-2.

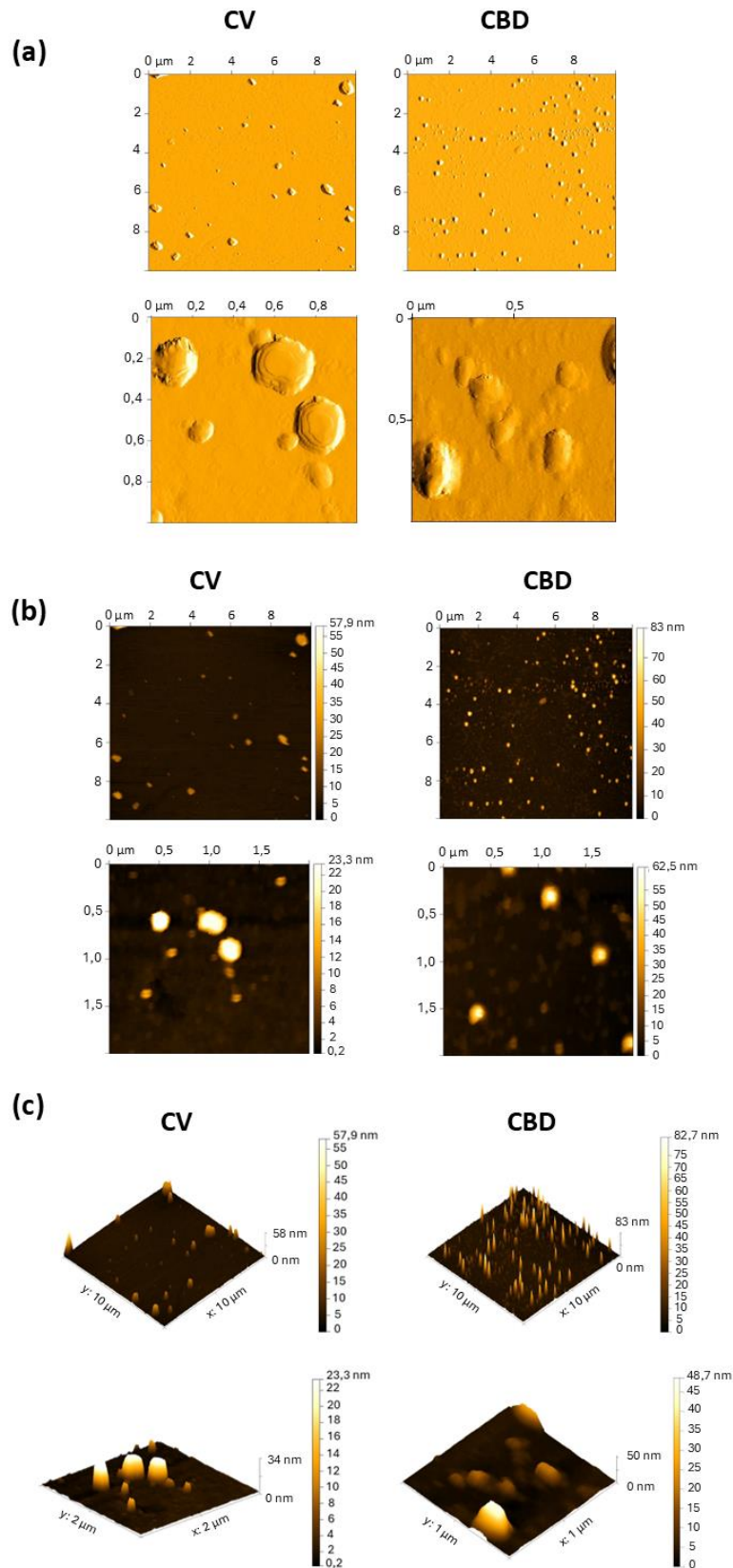
### 3.3. Análisis morfológico de partículas virales mediante AFM

Dado que se observaron alteraciones en la organización de las membranas celulares inducidas por el CBD, se planteó la hipótesis de que estas modificaciones podrían impactar también en las membranas virales, ya que estas son adquiridas directamente a partir de las membranas celulares. Para explorar esta posibilidad, se realizó un análisis

morfológico de partículas virales purificadas mediante AFM, comparando partículas obtenidas de células infectadas en presencia o ausencia del tratamiento.

Las imágenes obtenidas revelaron diferencias marcadas en múltiples parámetros estructurales. En la **Figura 64a**, que muestra imágenes topográficas convencionales en dos escalas distintas, las partículas virales de la condición control presentan formas esféricas, regulares y bordes definidos, mientras que las partículas generadas en presencia de CBD exhiben formas más irregulares, tamaños reducidos y mayor densidad. En la **Figura 64b**, se muestran imágenes obtenidas en modo altura con codificación de color, lo cual permite visualizar diferencias en la altura relativa y en la distribución espacial de las partículas. En esta condición, las muestras tratadas con CBD presentan una mayor densidad y heterogeneidad morfológica, con estructuras que podrían corresponder a partículas incompletas. Finalmente, la **Figura 64c** presenta reconstrucciones 3D generadas a partir de los datos de altura, que evidencian un mayor grado de irregularidad superficial y variabilidad estructural en las partículas obtenidas tras el tratamiento.

Estos resultados indicarían que el tratamiento con CBD no solo modifica la arquitectura de las membranas celulares, sino que también interfiere con la formación de partículas virales, alterando su morfología, tamaño y organización estructural.



**Figura 64.** Morfología de partículas virales purificadas analizadas por AFM. **(a)** Imágenes topográficas representativas de partículas virales en condiciones control (CV) y tratadas con CBD, obtenidas a dos niveles de aumento. **(b)** Imágenes 2D con barra de escala de color que indica la altura. **(c)** Reconstrucciones 3D.

## Conclusiones parciales

Los resultados presentados en este capítulo demuestran que el CBD modifica ciertas propiedades de las membranas celulares, particularmente el orden lipídico, sin afectar de manera significativa la difusión del COL en las MP y MPn. Esto, junto con los cambios observados en la distribución de marcadores de glicoconjugados y dominios lipídicos, respalda la hipótesis de que el tratamiento induce una reorganización de la bicapa, afectando su arquitectura sin comprometer severamente su funcionalidad general.

En el contexto de infección viral, se observó una disminución del COL total en células infectadas tratadas, acompañada de cambios morfológicos notables en las partículas virales, lo que indica que el CBD impacta tanto el entorno lipídico celular como sobre la formación de la partícula viral.

En conjunto, estos resultados indican que el CBD induce modificaciones moderadas en las membranas celulares, las cuales no comprometen drásticamente su funcionalidad pero que, en un contexto de infección, son capaces de impactar en la biogénesis viral. Esto refuerza la idea de que la actividad antiviral del CBD está mediada, al menos en parte, por su capacidad de alterar las propiedades fisicoquímicas y organización de las membranas celulares.

Estas conclusiones parciales se sintetizan en un esquema hipotético, que se presenta en la **Figura 65**, el cual ilustra de manera visual los efectos del CBD sobre las membranas celulares en una célula infectada con ZIKV.

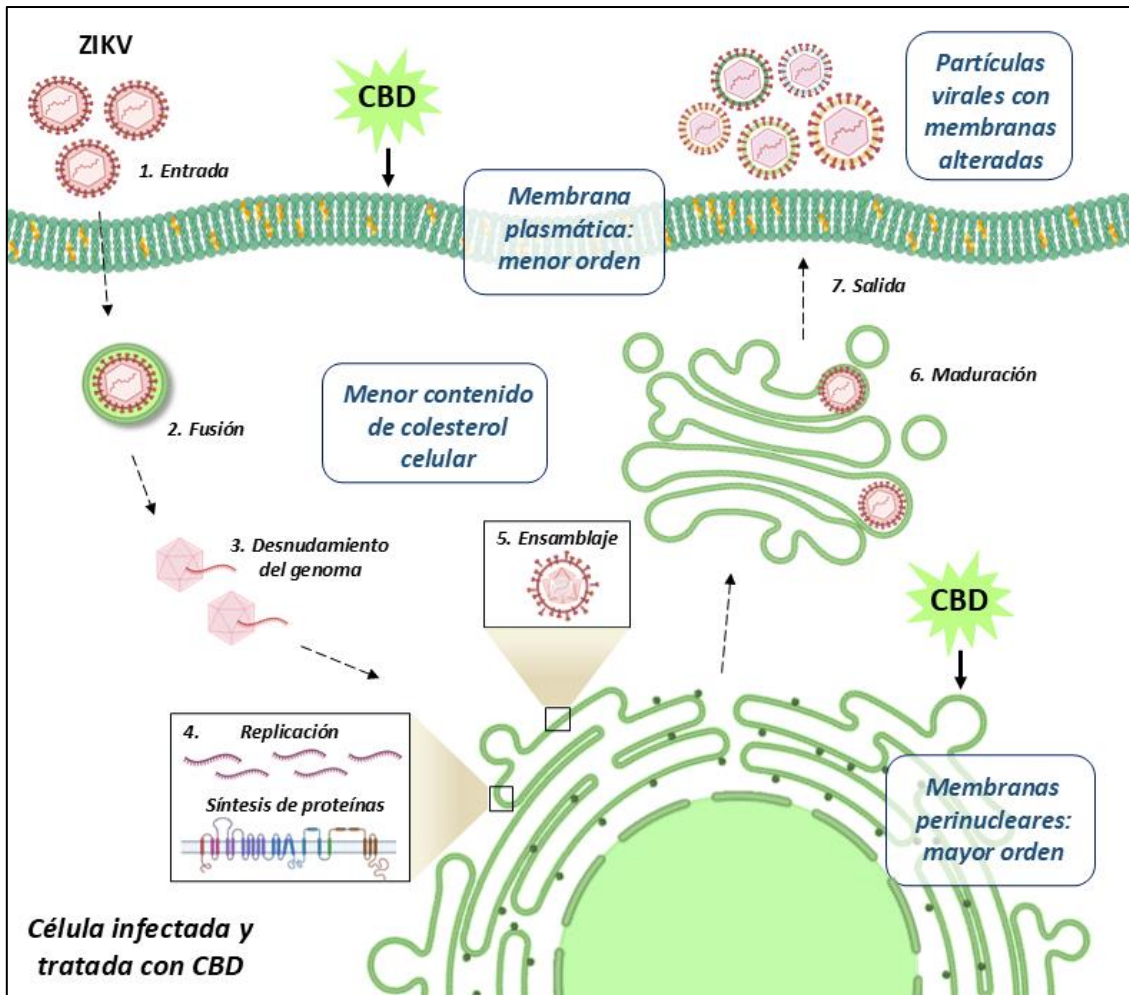


Figura 65. Efecto del CBD sobre las membranas celulares en una célula infectada con ZIKV.

# **CAPÍTULO 4**

*Desarrollo de nanopartículas con CBD:  
formulación, caracterización y  
evaluación preliminar*

## Introducción

Las formulaciones basadas en nanotecnología han cobrado gran relevancia en el desarrollo de nuevos antivirales, especialmente en casos donde las propiedades fisicoquímicas del compuesto limitan su aplicación. En el capítulo 2, se demostró que el CBD presenta actividad antiviral frente al ZIKV, además de efectos inmunomoduladores relevantes. Sin embargo, estos efectos se observaron utilizando CBD en su forma libre, cuya aplicación terapéutica presenta importantes limitaciones. Por un lado, el CBD libre mostró ser sumamente citotóxico, lo que se reflejó en índices de selectividad ( $IS=CC_{50}/CE_{50}$ ) significativamente bajos. Por otro lado, el CBD es una molécula altamente lipofílica, con una solubilidad acuosa extremadamente baja (aproximadamente 0,02–0,06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), lo que dificulta su formulación y administración oral<sup>152</sup>. Además, presenta inestabilidad química, siendo susceptible a la degradación por factores ambientales como la luz, el calor y el oxígeno<sup>153</sup>. Sumado a esto, el CBD experimenta un extenso metabolismo de primer paso hepático, lo que reduce significativamente su biodisponibilidad oral, estimada en alrededor del 6 %<sup>154</sup>.

Con el objetivo de superar estas limitaciones y mejorar la actividad biológica del CBD, en este capítulo se abordó el desarrollo de formulaciones basadas en NP, una estrategia ampliamente utilizada en los últimos años para la entrega dirigida y controlada de fármacos. Las NP ofrecen múltiples ventajas, entre ellas: protección del principio activo frente a la degradación, mejora de la solubilidad y estabilidad, mayor tiempo de residencia en el organismo, posibilidad de liberación sostenida, y acumulación preferencial en tejidos blanco debido al efecto de permeabilidad y retención mejorada. En este contexto, se seleccionaron dos tipos de sistemas nanoestructurados: NP-PLGA y NIO.

### 1. Nanopartículas poliméricas (NP-PLGA)

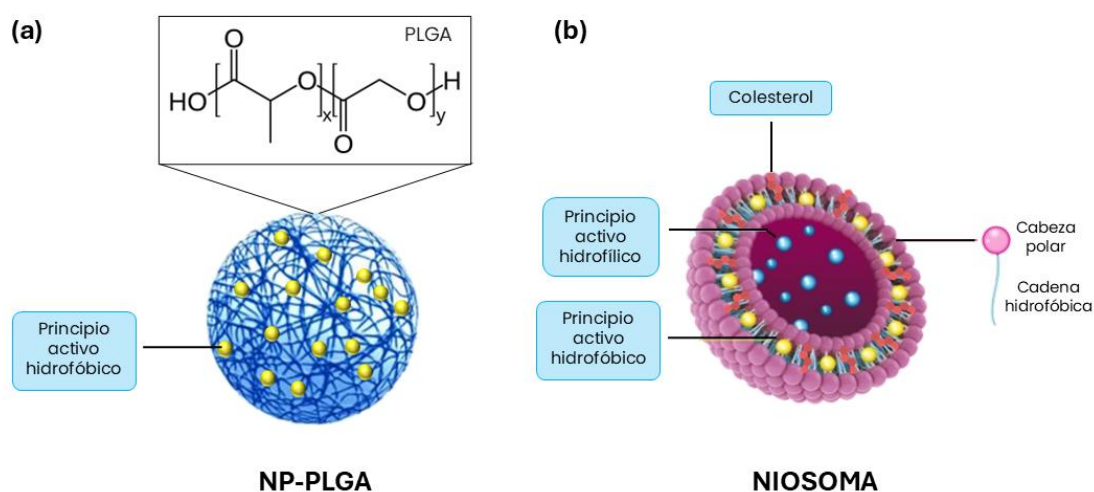
Estas NP son nanosistemas sintéticos que han sido ampliamente utilizados en el campo biomédico, ya que están compuestos por un polímero biodegradable, biocompatible y aprobado por la FDA para su uso en humanos<sup>155,156</sup> (**Figura 66a**). Su degradación controlada mediante hidrólisis de los enlaces éster, libera ácido láctico y ácido glicólico, que son metabolizados naturalmente en el cuerpo y permite una liberación sostenida y

prolongada del principio activo, lo que mejora la eficacia terapéutica y reduce la frecuencia de administración. Además, este tipo de NP protege a moléculas sensibles de la degradación en el entorno extracelular y puede ser funcionalizado en su superficie para mejorar su estabilidad, prolongar la circulación sistémica o dirigir su entrega a tejidos específicos.

Las NP-PLGA pueden encapsular compuestos hidrofóbicos, y han sido empleadas en terapias contra el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, infecciones virales<sup>157–160</sup> En este trabajo, se formularon NP-PLGA cargadas con CBD, y se evaluaron sus propiedades fisicoquímicas, así como su efecto sobre la actividad biológica del compuesto.

## 2. Vesículas lipídicas (NIO)

Los NIO son vesículas lipídicas no iónicas que actúan como NP capaces de alojar compuestos hidrofílicos en su núcleo acuoso y sustancias hidrofóbicas en su bicapa lipídica (**Figura 66b**). Los NIO presentan ventajas similares a las de los liposomas, tales como biocompatibilidad, biodegradabilidad y capacidad de liberación controlada, pero se destacan por su mayor estabilidad física y química, menor costo de producción, y facilidad de almacenamiento y escalado, lo que los convierte en una alternativa prometedora para aplicaciones farmacéuticas y cosméticas. Los NIO han sido ampliamente explorados para la administración transdérmica, oral e intranasal, y muestran buena capacidad de permeación y retención en tejidos<sup>161–163</sup>.



**Figura 66.** Esquema representativo de los dos nanosistemas utilizados. **(a)** NP-PLGA: NP poliméricas sintéticas de PLGA, donde compuestos hidrofóbicos pueden ser encapsulados en la matriz polimérica. Se

muestra la estructura química del polímero PLGA. **(b)** NIO: vesículas formadas por una bicapa de tensioactivos no iónicos y COL, capaces de encapsular tanto compuestos hidrofóbicos (en la bicapa) como hidrofílicos (en el núcleo acuoso).

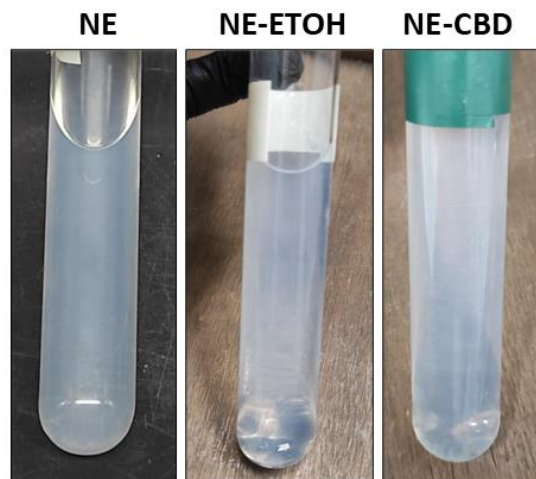
En este trabajo, se diseñaron, desarrollaron y caracterizaron fisicoquímicamente NP-PLGA y NIO cargados con CBD. El objetivo principal de la encapsulación del CBD fue optimizar su estabilidad, aumentar su biodisponibilidad y potenciar su efecto biológico.

## Resultados

### 1. NP-PLGA

#### 1.1. Caracterización fisicoquímica por DLS

Inicialmente, se prepararon NE como paso intermedio en la formulación de las NP-PLGA. Se obtuvieron tres tipos de formulaciones: una NE control sin aditivos (NE), una NE con etanol (NE-ETOH) y otra con CBD disuelto en etanol (NE-CBD), con el principio de evaluar el efecto del solvente y del compuesto activo sobre las propiedades fisicoquímicas del sistema. La **Figura 67** muestra el aspecto macroscópico de las NE, evidenciando suspensiones coloidales homogéneas, sin signos de inestabilidad física como agregación, floculación o separación de fases, lo que sugiere una adecuada estabilidad inicial del sistema.



**Figura 67.** Aspecto macroscópico de las NE utilizadas como plantilla para la formulación de NP-PLGA. Imágenes representativas de las suspensiones coloidales correspondientes a NE sin aditivos (NE), NE con etanol (NE-ETOH) y NE con CBD disuelto en etanol (NE-CBD).

Para la caracterización fisicoquímica de las NP, se empleó la técnica de DLS para determinar el tamaño hidrodinámico y el índice de polidispersión (PDI) de las partículas en suspensión<sup>164</sup>. El tamaño hidrodinámico refleja el tamaño efectivo de las partículas en un medio acuoso, considerando no solo el núcleo sólido sino también las capas de solvatación o recubrimiento superficial. El PDI es un valor numérico que varía entre 0 y 1 e indica el grado de uniformidad en el tamaño de las partículas: valores cercanos a 0 corresponden a una distribución altamente homogénea (monodispersa), mientras que valores elevados reflejan mayor heterogeneidad<sup>165</sup>. Por otro lado, se midió el potencial

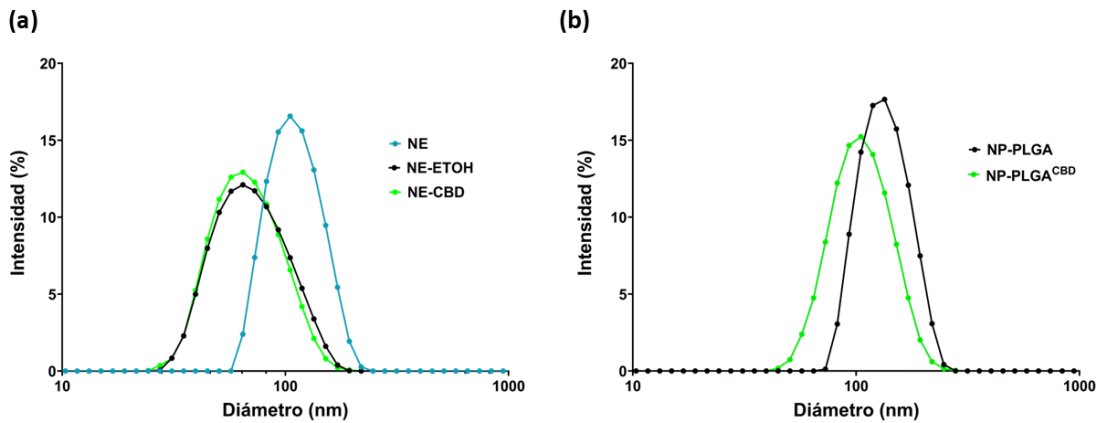
zeta ( $\zeta$ ) que permite estimar la carga superficial efectiva. Valores de  $\zeta$  superiores a  $\pm 25$  mV se consideran indicativos de una buena estabilidad coloidal. En cambio, cuando dicho parámetro se aproxima a 0 mV, la repulsión electrostática entre partículas disminuye, lo que favorece la inestabilidad de la suspensión y la agregación de las partículas<sup>166</sup>.

Como se observa en la **Figura 68a** y en la **Tabla 12**, la incorporación de etanol redujo significativamente el tamaño de partícula (Z-ave: 47,10 nm para NE-ETOH vs. 92,45 nm para NE), aunque generó un aumento en el Pdl (0,76 vs. 0,26). Por otro lado, la formulación NE-CBD mostró un tamaño intermedio (53,90 nm) con una marcada disminución del Pdl respecto a NE-ETOH (0,23), lo que indica una mejora en la homogeneidad de la muestra.

Además, se observó un efecto sobre  $\zeta P$ : mientras que la NE-ETOH presentó un valor cercano a neutro (+0,01 mV), la formulación NE-CBD presentó una carga superficial negativa (-10,97 mV), sugiriendo mayor estabilidad coloidal, aunque lejos aún de un ideal para sistemas biomédicos.

Posteriormente, las NE fueron utilizadas como plantillas para obtener NP-PLGA, las cuales fueron almacenadas a  $-80$  °C, con y sin el uso de sacarosa como criopreservante. Tal como se detalla en la **Tabla 12**, las NP-PLGA almacenadas sin sacarosa mostraron un tamaño fuera del rango nanométrico, indicando colapso estructural y/o aglomeración. En contraste, la adición de 5 % de sacarosa permitió conservar el tamaño de partícula dentro del rango esperado y un Pdl bajo (0,13 para NP-PLGA y 0,27 para NP-CBD), reflejando una mezcla monodispersa (**Figura 68b**). En cuanto al  $\zeta P$ , las NP-PLGA<sup>CBD</sup>, exhibieron un valor nulo, indicando partículas prácticamente neutras.

Por otro lado, se determinó un porcentaje de EE del 74 % y una LC de 0,21 % (**Tabla 12**). Esto indica que, si bien una alta proporción del CBD añadido inicialmente fue efectivamente incorporado, la cantidad de compuesto encapsulado en relación con la masa total de NP fue baja. Este resultado puede estar relacionado con el reducido tamaño y la estructura sólida de las NP-PLGA, que limitan el volumen disponible para la incorporación del CBD.



**Figura 68.** Distribución de tamaño de las NE y NP-PLGA por DLS. **(a)** Curvas de intensidad (%) en función del diámetro para las NE. **(b)** Distribución de tamaño de las NP-PLGA obtenidas a partir de las respectivas NE.

**Tabla 12.** Caracterización fisicoquímica de las NE y NP-PLGA por DLS.

Condición de almacenamiento	Composición	Z-ave (nm)	Pdl	ζP (mV)	EE (%)	LC (%)
NE	NE	92,45 ± 1,30	0,266 ± 0,061	-6,72 ± 7,87		
	NE-ETOH	47,10 ± 2,83	0,7618 ± 0,06	0		
	NE-CDB	53,90 ± 3,34	0,481 ± 0,16	-10,97 ± 7,06		
NP-PLGA a -80°C	NP-PLGA	Fuera de escala nanométrica				
	NP-CBD	139,53 ± 9,65	0,25 ± 0,14	0		
NP-PLGA con 5% de sacarosa a -80°C	NP-PLGA	121,92 ± 3,28	0,13 ± 0,07	-33,62 ± 17,14		
	NP-CDB	99,55 ± 5,87	0,27 ± 0,07	0	74	0,21

## 1.2. Actividad Biológica

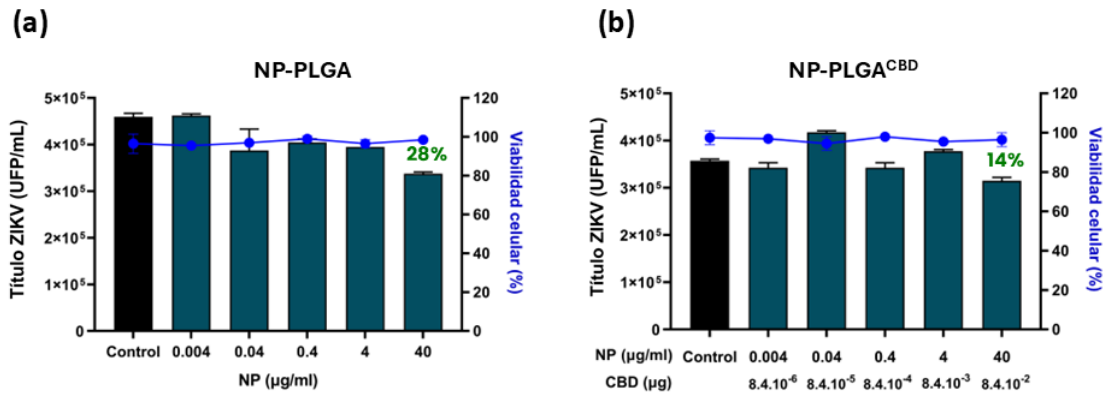
### 1.2.1. Viabilidad celular y actividad antiviral en células Vero

A partir de la caracterización fisicoquímica realizada, se seleccionaron las NP-PLGA criopreservadas con 5% sacarosa para evaluar la actividad biológica *in vitro*. Para esto, se utilizó la línea celular Vero y se probaron concentraciones de NP de a 0,004 a 40 µg/mL. Se decidió trabajar en base a concentraciones de NP y no de CBD puesto que la determinación precisa de la concentración de CBD en una suspensión de NP presenta múltiples desafíos técnicos. Por un lado, el volumen efectivo de suspensión tras la purificación y resuspensión no siempre es constante ni fácil de cuantificar ya que pueden producirse pérdidas o concentraciones variables de partículas. Además, la

espectrofotometría requiere curvas de calibración específicas según el medio, y la presencia de tensioactivos o polímeros puede interferir en la señal. Estas limitaciones metodológicas justifican que, en este trabajo, se hayan utilizado concentraciones de NP y se recurriera a un cálculo estimativo de la masa de CBD, como se muestra en la **Figura 69**.

En una primera instancia, se determinó la viabilidad celular con las NP formuladas, utilizando el mismo procedimiento empleado previamente para el CBD libre, con el objetivo de establecer un rango de concentraciones para los ensayos de actividad antiviral.

Los resultados demostraron que las NP no fueron citotóxicas en ninguna de las concentraciones de NP-PLGA probadas. Dado que la mayor concentración evaluada (40 µg/mL, equivalente a 0,084 µg de CBD) no afectó la viabilidad celular, la  $CC_{50}$  se estimó como mayor a ese valor. En el caso del CBD sin encapsular, la  $CC_{50}$  obtenida previamente fue de 5,06 µg/mL. Los hallazgos revelaron que la encapsulación del CBD en el nanosistema permitió una reducción significativa de su toxicidad respecto del compuesto sin encapsular. Posteriormente, se evaluó la actividad antiviral *in vitro* en el mismo rango de concentraciones de NPs en la que se evaluó la citotoxicidad. Para esto, se infectaron las células con el ZIKV (MOI=0,1) durante 1 h, luego se retiraron los inóculos y se adicionaron las NP resuspendidas en medio de cultivo. Los sobrenadantes se recolectaron a las 48 h y se cuantificaron las partículas infecciosas. Los datos obtenidos demostraron que la inhibición generada por las NP-PLGA no alcanzó significancia estadística. Incluso, las NP-PLGA cargadas con CBD presentaron un porcentaje de inhibición menor que las NP sin CBD (control), con valores de 14 % y 28 %, respectivamente (**Figura 69 y Tabla 13**).



**Figura 69.** Viabilidad celular y actividad antiviral contra ZIKV de las NP-PLGA en células Vero. Los porcentajes más altos de inhibición se encuentran indicados en verde.

### 1.2.2. Viabilidad celular y actividad antiviral en células Huh-7

Dado que las NP-PLGA no mostraron una inhibición significativa en células Vero, se evaluó su efecto en células Huh-7, una línea de origen hepático que podría presentar una mayor capacidad de captación o procesamiento intracelular de NP. Esta hipótesis se fundamenta en estudios previos que han demostrado que la internalización y el metabolismo de sistemas nanoformulados varían considerablemente según el tipo celular. En particular, el hígado es un órgano clave en la depuración y biotransformación de NP, y se ha reportado que distintos tipos de células hepáticas, como hepatocitos, células endoteliales sinusoidales y macrófagos de Kupffer, presentan tasas de captación diferenciales para NP de PLGA<sup>167</sup>. Además, estudios comparativos entre líneas epiteliales no hepáticas han mostrado que la eficiencia de internalización depende en gran medida de las características de la célula hospedadora, lo que refuerza la idea de que las células Huh-7 podrían interactuar con las NP de forma distinta a las células Vero<sup>168</sup>.

Se observó que las NP-PLGA, tanto vacías como cargadas con CBD, no presentaron citotoxicidad en células Huh-7. En cuanto a la actividad antiviral, las NP-PLGA cargadas con CBD mostraron una inhibición del 25 % del ZIKV, valor ligeramente superior al observado en células Vero (**Figura 70**). Sin embargo, estos niveles continúan siendo bajos y poco relevantes desde el punto de vista terapéutico.

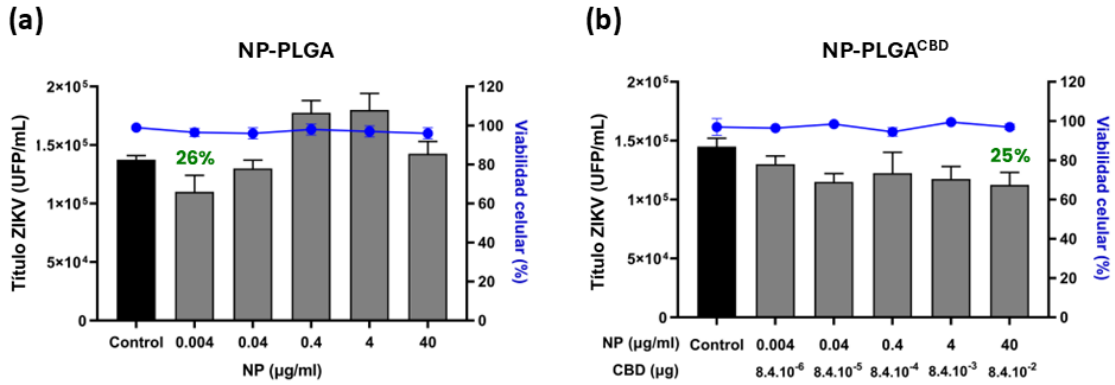


Figura 70. Viabilidad celular y actividad antiviral contra ZIKV de las NP-PLGA en células Huh-7. Los porcentajes más altos de inhibición se encuentran indicados en verde.

Tabla 13. Actividad biológica de las NP-PLGA y del CBD

	Células	NP-PLGA	NP-PLGA <sup>CBD</sup>	CBD
CC <sub>50</sub> (µg/mL)	Vero	> 40	> 40	5,06
	Huh-7	> 40	>40	5,38
CE <sub>50</sub> (µg/mL)	Vero	> 40	> 40	0,27
	Huh-7	> 40	> 40	0,44

## 2. Niosomas

### 2.1. Caracterización fisicoquímica por DLS

Dado que las NP-PLGA no lograron la inhibición antiviral esperada, se exploró un sistema alternativo de encapsulación basado en NIO, cuya estructura permite incorporar compuestos lipofílicos como el CBD, y que se caracteriza por su versatilidad, facilidad de formulación y estabilidad coloidal.

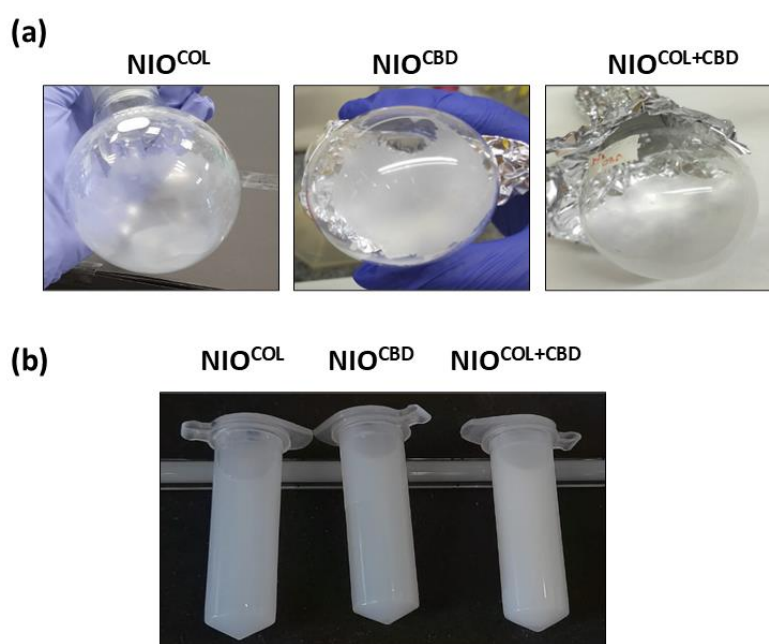
En una primera etapa, se formularon NIO con distintas proporciones molares de Span<sup>®</sup>20, DCP, COL y CBD (disuelto en etanol absoluto). El objetivo fue evaluar el efecto del CBD sobre la formación y estabilidad del sistema, así como la influencia de las condiciones de almacenamiento. Para ello, se analizaron diferentes formas de conservación: congelación a -80 °C y uso de sacarosa en distintas concentraciones como crioprotector. Los resultados indicaron que todas las formulaciones presentaron un ζP negativo, con valores entre -19 y -70 mV, y una alta EE, que osciló entre el 79 % y el 97 %,

lo cual representa una mejora significativa en comparación con las NP-PLGA. Esta alta EE sugiere una fuerte afinidad del CBD por la bicapa lipídica de los NIO, lo que refleja la elevada eficiencia del sistema para incorporar y retener este compuesto. El análisis por DLS mostró que la adición de sacarosa mejoró la homogeneidad de las formulaciones, reflejada en menores valores de Pdl. Las muestras congeladas sin crioprotector presentaron Pdl elevados (0,60–0,93), indicativos de una distribución heterogénea de tamaños. Con 2,5 % de sacarosa se observaron valores intermedios (0,45–0,76), mientras que con 5 % de sacarosa se obtuvieron los Pdl más bajos, con valores por debajo de 0,30, lo que sugiere una distribución más uniforme en la población de vesículas. Además, se observó que un aumento en la proporción de CBD en relación con el COL tendió a incrementar el tamaño de partícula y reducir el valor absoluto del  $\zeta$ P. Este primer enfoque fue exploratorio y permitió establecer las condiciones óptimas de preparación y conservación utilizadas en los ensayos posteriores. Si bien las inhibiciones virales obtenidas con estas formulaciones no alcanzaron los niveles deseados, los porcentajes de inhibición oscilaron entre el 40 % y el 80 %, superando ampliamente a los obtenidos con las NP-PLGA. Por este motivo, se continuó con la optimización de este nanosistema.

En una segunda etapa, se formuló una nueva serie de NIO empleando acetato de etilo como solvente de la solución del CBD, con el objetivo de mejorar su incorporación a la bicapa lipídica y potenciar su actividad antiviral. Se ha reportado que el tipo de solvente puede afectar significativamente propiedades como el tamaño de partícula, la EE y la bioactividad del sistema<sup>169</sup>. En esta ocasión, se obtuvieron tres tipos de formulaciones, NIO<sup>COL</sup> (vesículas con COL, sin CBD), NIO<sup>CBD</sup> (vesículas con CBD, sin COL) y NIO<sup>COL+CBD</sup> (vesículas con COL y CBD). Los NIO<sup>CBD</sup> también permitieron evaluar si el CBD, en ausencia de COL, es capaz de formar vesículas estables, explorando así su potencial mimético respecto al rol estructural del COL en la organización de bicapas lipídicas. Este enfoque complementa los resultados previamente obtenidos sobre la interacción del CBD con las membranas, aportando una importante evidencia adicional.

En la **Figura 71** se muestran las características macroscópicas observadas durante distintas etapas del proceso de obtención de los NIO, incluyendo la formación de la película delgada y la posterior reconstitución coloidal en PBS. En cuanto a las películas

delgadas (**Figura 71a**), se observaron algunas diferencias visuales entre las distintas composiciones. La película correspondiente a NIO<sup>COL</sup> presentó una apariencia más homogénea y translúcida, mientras que la de NIO<sup>CBD</sup> fue visiblemente más opaca y heterogénea. Por su parte, la película de NIO<sup>COL+CBD</sup> mostró una textura blanquecina, intermedia entre las otras dos formulaciones. Estas diferencias podrían reflejar variaciones en la distribución del principio activo o en la interacción entre los componentes durante el secado. Una vez reconstituidas en PBS, todas las formulaciones generaron suspensiones coloidales estables, visualmente homogéneas y sin signos de agregación o precipitación, lo que sugiere una óptima estabilidad física (**Figura 71b**).

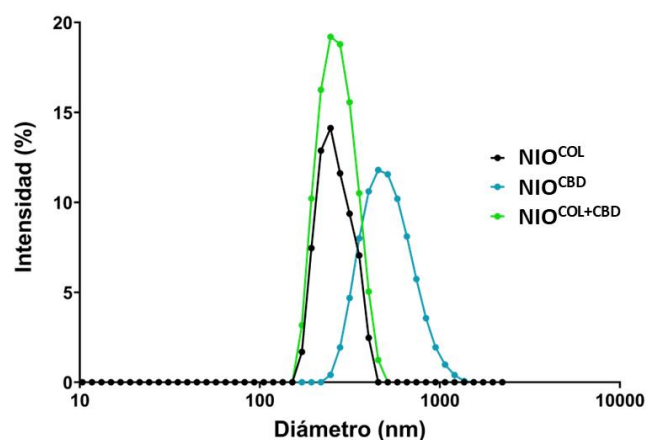


**Figura 71.** Características macroscópicas de **(a)** la película delgada y **(b)** la suspensión coloidal de NIO luego de su resuspensión con PBS. NIO<sup>COL</sup> se refiere a vesículas con COL, pero sin CBD, NIO<sup>CBD</sup> corresponde a NIO sin COL pero que contienen CBD, NIO<sup>COL+CBD</sup> hace referencia a vesículas con una mezcla de COL y CBD.

Por otro lado, con el objetivo de evaluar la homogeneidad, estabilidad y comportamiento de las vesículas, se llevó a cabo un análisis por DLS (**Figura 72** y **Tabla 14**). En primer lugar, se observó que los NIO sin principio activo presentaron un tamaño promedio menor (252 nm), mientras que los NIO<sup>CBD</sup> y NIO<sup>COL+CBD</sup> mostraron diámetros mayores (519 nm y 421 nm, respectivamente). Este aumento en el tamaño sugiere una incorporación efectiva del CBD, con posibles interacciones entre el compuesto y la matriz niosomal que afectan su organización estructural. Es decir, el CBD, en ausencia

de COL, podría estar afectando el empaquetamiento lipídico y la organización de la bicapa, lo cual repercute en la formación de vesículas de mayor tamaño. En cuanto al Pdl, los NIO mostraron una distribución homogénea (Pdl = 0,199), mientras que los NIO<sup>CBD</sup> exhibieron una población más heterogénea (Pdl = 0,598). La incorporación simultánea de COL y CBD mejoró este parámetro de manera considerable (Pdl = 0,370), lo que indica que el COL contribuye a estabilizar los NIO. Respecto al  $\zeta$ P, las formulaciones presentaron valores en un rango de -39,97 a -51,50 mV, compatibles con una buena estabilidad coloidal. Sin embargo, se observó una tendencia a la disminución del valor absoluto del  $\zeta$ P en presencia de CBD. Esto podría estar relacionado con alteraciones en la superficie de las vesículas, producto de su incorporación.

Finalmente, las formulaciones de NIO mostraron una EE superior al 99 %, lo que indica una incorporación completa del CBD durante el proceso de formación de las vesículas. Además, la LC fue considerablemente alta, con valores promedio de 26 %, lo que refleja una elevada proporción de CBD respecto a la masa total de vesículas. Este excelente desempeño puede atribuirse a la estructura vesicular de los NIO, cuya bicapa lipídica crea un entorno favorable y altamente eficiente para la incorporación de compuestos lipofílicos, como el CBD. La organización estructural de los NIO facilita la interacción de las moléculas lipofílicas con los componentes de la bicapa, permitiendo una encapsulación más efectiva y una liberación controlada del bioactivo. Además, la estabilidad y biocompatibilidad de esta estructura vesicular contribuyen a una mayor biodisponibilidad del CBD, lo cual podría optimizar su eficacia terapéutica.



**Figura 72.** Distribución de tamaño de NIO por DLS.

**Tabla 14.** Caracterización fisicoquímica de los NIO por DLS.

NIO	Z-ave (nm)	Pdl	ζP (mV)	EE (%)	LC (%)
NIO	252,22 ± 3,30	0,199 ± 0,060	-51,50 ± 1,85	-	-
NIO <sup>CBD</sup>	519,18 ± 86,65	0,598 ± 0,065	-39,97 ± 2,60	99,73	26,20
NIO <sup>COL+CBD</sup>	420,73 ± 12,73	0,370 ± 0,061	-48,33 ± 1,67	99,62	26,6

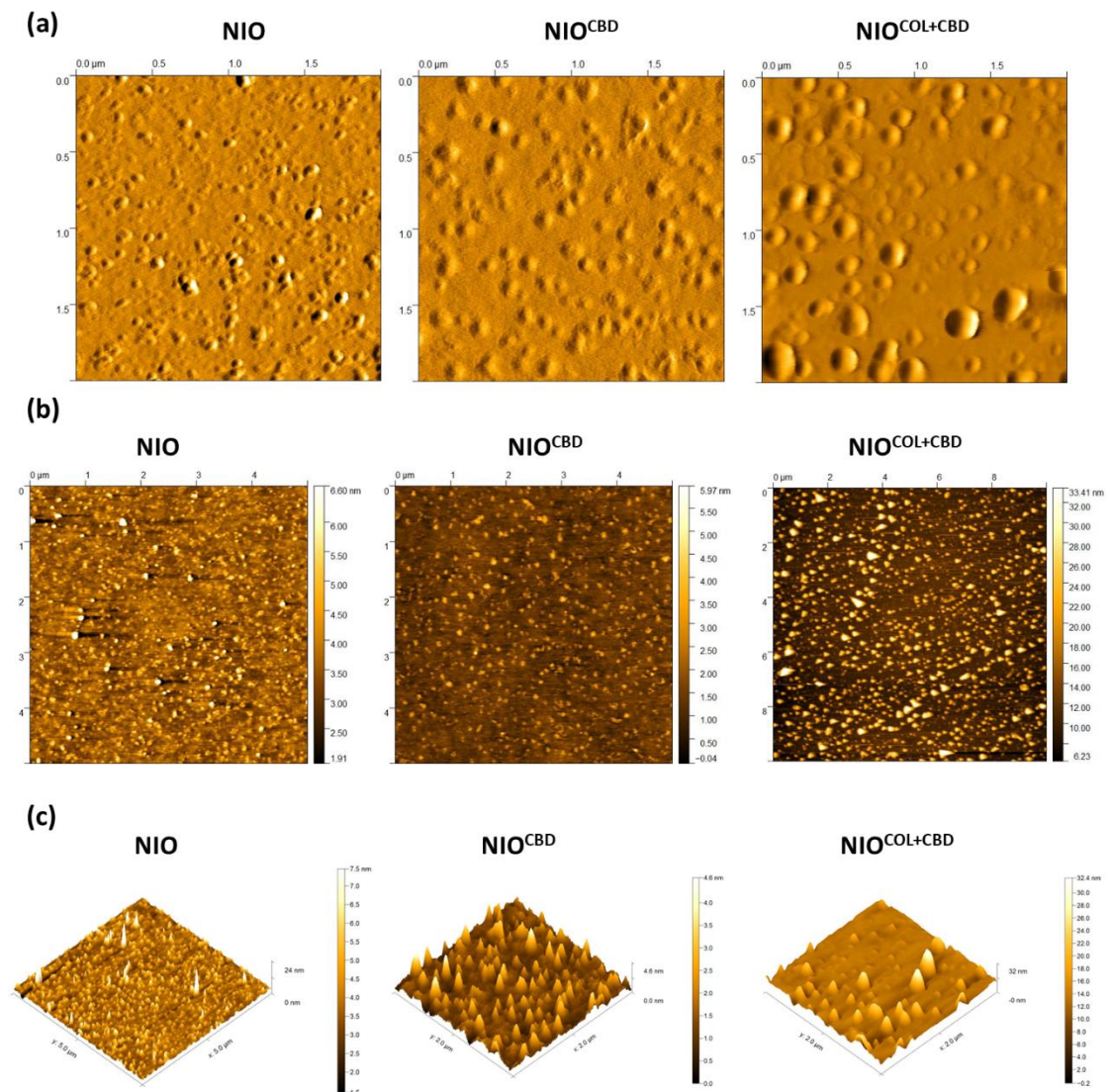
## 2.2. Análisis topográfico mediante AFM

Dado que las formulaciones NIO mostraron un mejor perfil fisicoquímico en comparación con las NP-PLGA, con tamaños apropiados, menor polidispersión, mayor estabilidad coloidal además de alta EE y LC, se analizó la ultraestructura de estas mediante AFM. Adicionalmente, se consideró especialmente relevante estudiar la organización superficial de las vesículas lipídicas que contenían CBD, dado que previamente se había observado que este compuesto alteraba la estructura de las membranas en partículas virales purificadas. De esta manera, se exploró si existía una relación entre el comportamiento del CBD en distintos tipos de membranas, lo cual podría fortalecer la hipótesis de un efecto estructural común sobre sistemas lipídicos.

Los resultados mostraron diferencias entre las distintas formulaciones. En general, los NIO sin principio activo (control) presentaron una superficie homogénea. Por el contrario, la incorporación de CBD, tanto en ausencia como en presencia de COL, alteró significativamente la organización superficial (**Figura 73a**). Los NIO<sup>CBD</sup> mostraron mayor densidad de partículas y una superficie con una tendencia más irregular, mientras que los NIO<sup>COL+CBD</sup> exhibieron estructuras más grandes, elevadas y definidas (**Figura 73b**). Estos resultados fueron corroborados por las reconstrucciones 3D, que revelaron un aumento en la altura y el relieve de las estructuras en las formulaciones con CBD, particularmente en presencia de COL, lo que resalta cómo la incorporación de este bioactivo influye en la topografía superficial de los NIO (**Figura 73c**).

Al comparar estos resultados con los obtenidos mediante DLS, se observa una aparente contradicción: en esta técnica, los NIO<sup>CBD</sup> mostraron tamaño promedio mayor y una mayor polidispersión en comparación con los NIO<sup>COL+CBD</sup>. Esta discrepancia puede atribuirse a las diferencias inherentes entre ambas metodologías. El DLS mide el tamaño hidrodinámico en solución, influido por la movilidad, la hidratación y la dispersión del

sistema, mientras que el AFM analiza la morfología individual sobre una superficie sólida, una vez secada la muestra<sup>170</sup>. Por lo tanto, es posible que los NIO<sup>CBD</sup>, aunque más grandes en suspensión, presenten una menor integridad o estabilidad estructural al ser depositados sobre la superficie, resultando en vesículas más colapsadas y heterogéneas. En cambio, la presencia de COL en la formulación podría contribuir a una mayor organización y estabilidad de las partículas tanto en solución como en superficie sólida. Estos resultados presentan un paralelismo con lo observado previamente en partículas virales purificadas. Mediante AFM, se evidenció que el tratamiento con CBD alteraba la morfología del ZIKV, generando partículas más irregulares y heterogéneas en comparación con las del control. La presencia de irregularidades estructurales tanto en las vesículas sintéticas (NIO) como en las partículas virales sugiere que el CBD podría estar actuando de manera similar sobre distintos sistemas lipídicos, alterando la organización de membranas biológicas y artificiales. Estos hallazgos refuerzan los datos obtenidos hasta el momento, los cuales evidencian que el CBD influye en la estructura de las membranas lipídicas, contribuyendo significativamente a su actividad antiviral.



**Figura 73.** Imágenes representativas obtenidas por AFM de las formulaciones de NIO. **(a)** Topografía 2D a escala micrométrica, **(b)** imágenes de altura codificadas por color, y **(c)** reconstrucciones 3D.

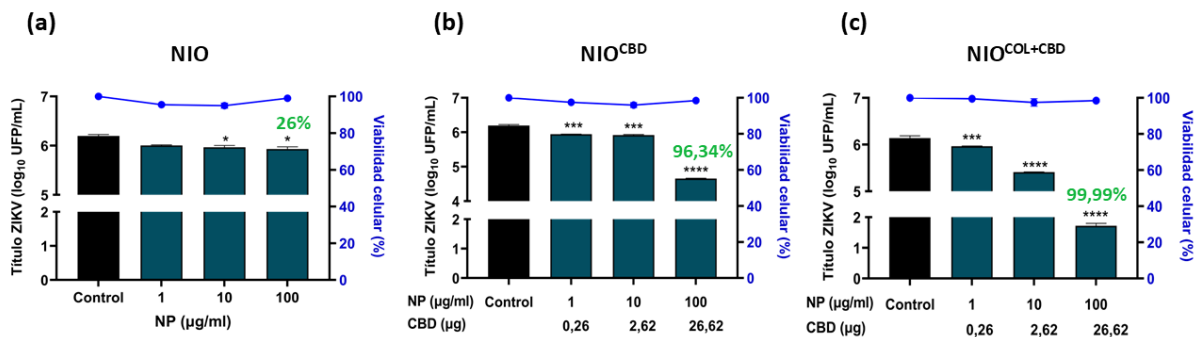
### 2.3. Actividad biológica

#### 2.3.1. Viabilidad celular y actividad antiviral de los NIO en células Vero

Las formulaciones de NIO fueron evaluadas contra el ZIKV en células Vero. Los resultados revelaron que los NIO sin CBD no presentaron un efecto antiviral biológicamente significativo. En cambio, los NIO con CBD mostraron una actividad antiviral notable, con una inhibición del 96,34 % para NIO<sup>CBD</sup> y 99,99 % para NIO<sup>COL+CBD</sup> a las concentraciones más altas ensayadas (**Figura 74**). En todos los casos, las formulaciones resultaron no citotóxicas en el rango de concentración analizado. Esta ausencia de citotoxicidad, combinada con un potente efecto antiviral, representa una mejora significativa respecto

al CBD libre, el cual mostró una  $CE_{50}$  de 0,27  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y una  $CC_{50}$  de 5,06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , reflejando un IS bajo (**Tabla 15**).

Si bien, como se mencionó previamente, no se pudieron determinar las concentraciones exactas de CBD encapsulado para cada concentración de NIO, se estimaron las cantidades absolutas, lo que permitió realizar una comparación orientativa con la actividad del CBD libre. A pesar de esta limitación, se observó que las formulaciones de NIO cargadas con CBD presentaron niveles de inhibición del ZIKV considerablemente superiores a los del CBD libre (96,8 % para 3,14  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , que fue la concentración más alta no citotóxica). Además, este efecto antiviral se logró sin inducir citotoxicidad, lo que representa una mejora significativa en el perfil terapéutico del CBD. La ausencia de efectos tóxicos en las células tratadas sugeriría que la presencia intracelular del bioactivo tras su liberación no solo es efectiva en la inhibición viral, sino también segura para las células hospedadora, lo que es crucial para su aplicación en terapias a largo plazo. Esta característica le proporciona a la nanoformulación un gran potencial como tratamiento antiviral más eficiente puesto que minimizaría los riesgos de efectos secundarios indeseables, mejorando la eficacia general del CBD en condiciones clínicas.



**Figura 74.** Viabilidad celular y actividad antiviral contra ZIKV de las NIO en células Vero. Los porcentajes más altos de inhibición se encuentran indicados en verde.

**Tabla 15.** Actividad biológica de los NIO y del CBD

	NIO	NIO <sup>CBD</sup>	NIO <sup>CHO+CBD</sup>	CBD libre
$CC_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	> 100	> 100	> 100	5,06
$CE_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	> 100	35,18*	5,06**	0,27

\* Esta concentración de NIO corresponde a 9,21  $\mu\text{g}$  de CBD.

\*\* Esta concentración de NIO corresponde a 1,23  $\mu\text{g}$  de CBD.

## Conclusiones parciales

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos con dos tipos de NP formuladas para la administración de CBD: NP-PLGA y NIO. Las NP-PLGA demostraron una buena estabilidad fisicoquímica, con un tamaño promedio de aproximadamente 100 nm, lo que sugiere una adecuada dispersión en medio acuoso. La EE alcanzó el 74%, mientras que la LC fue baja, con un valor de 0,21%. Aunque las NP-PLGA mostraron un comportamiento estable, no se observó una actividad antiviral significativa, lo que podría atribuirse a una liberación ineficiente del CBD desde el interior de las NPs, posiblemente debido a su naturaleza de liberación controlada que podría no haber sido óptima en este contexto específico.

En contraste, los NIO presentaron propiedades fisicoquímicas superiores en comparación con las NP-PLGA. Estos NIO mostraron una EE superior al 99%, evidenciando una excelente capacidad de encapsulación del CBD. Además, su LC fue considerablemente mayor, alcanzando un 26%. La destacada actividad antiviral de los NIO, con inhibiciones de hasta el 99,99 %, subraya su prometedor potencial terapéutico. Esta alta actividad antiviral se logró sin evidencias de citotoxicidad, lo cual es crucial para su aplicación en tratamientos a largo plazo.

Estos resultados demuestran que los NIO, con sus características fisicoquímicas mejoradas y su capacidad para inducir una respuesta antiviral significativa, emergen como un sistema de liberación altamente prometedor para potenciar el efecto antiviral del CBD. Además, ofrecen una mejora considerable en su perfil terapéutico, lo que podría traducirse en una mayor efectividad clínica en el tratamiento de diversas enfermedades virales a futuro (**Figura 75**).

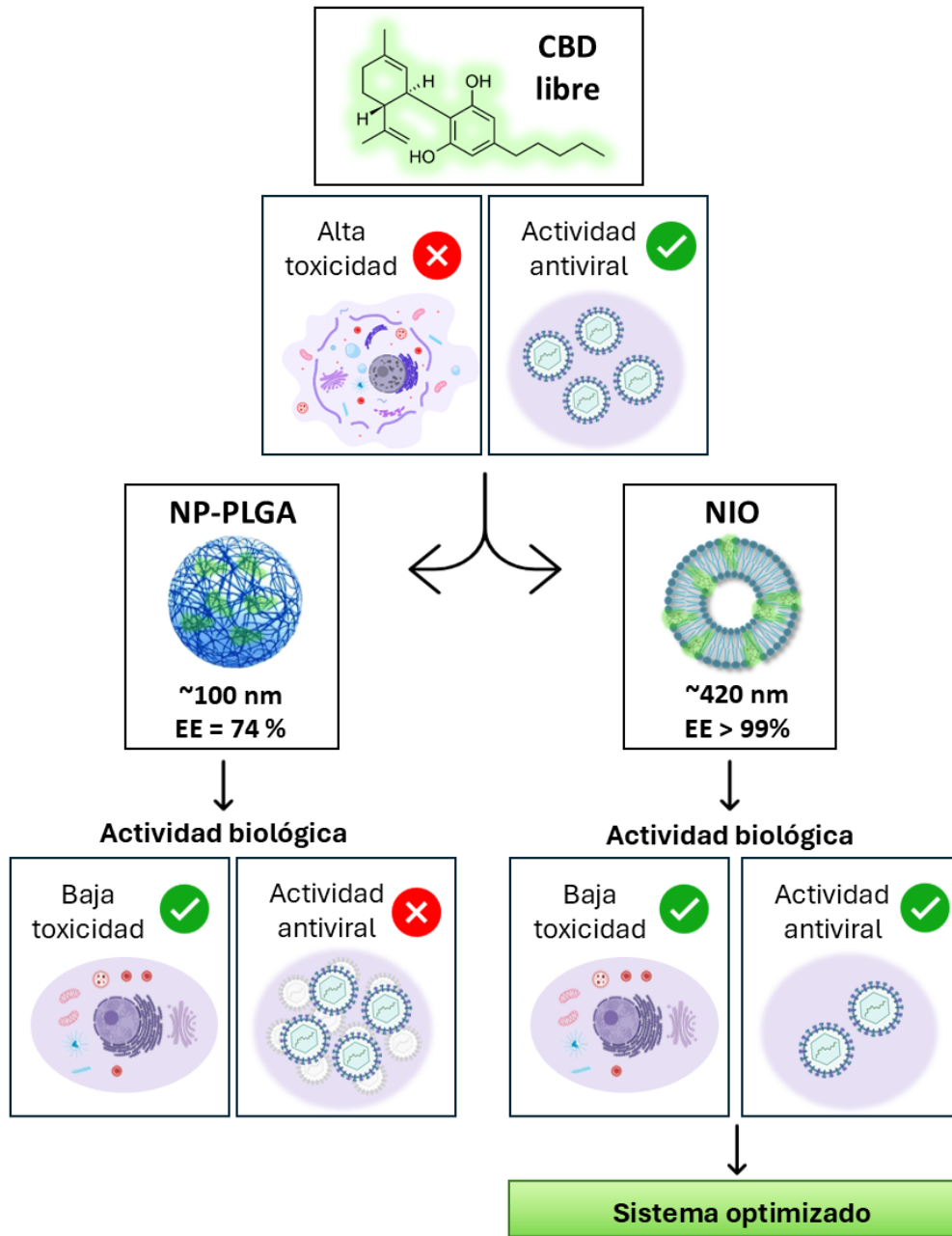


Figura 75. Modelo esquemático de las nanoformulaciones de CBD obtenidas.

# DISCUSIÓN

Diversos estudios han demostrado que durante ciertas infecciones virales se activan vías celulares que, lejos de contribuir a la defensa de la célula hospedadora, pueden favorecer la replicación del virus. Entre ellas, la vía mediada por el AHR ha cobrado relevancia en los últimos años debido a su papel inmunomodulador.

El AHR es un factor de transcripción que, al activarse por distintos ligandos endógenos o exógenos, puede inducir la expresión de genes que suprimen respuestas antivirales clave, como aquellas reguladas por la vía de NF- $\kappa$ B. En particular, se ha demostrado que la inhibición de la vía de AHR podría mejorar la eficacia de las respuestas antivirales, algo que se está explorando actualmente en diversos estudios<sup>171</sup>. En el caso del ZIKV, se ha reportado que la activación de AHR puede promover la infección al modular negativamente mecanismos inmunes activados en las células hospedadoras. Por este motivo, se planteó la búsqueda de antagonistas de AHR como una estrategia para contrarrestar este efecto proviral y restituir una respuesta inmune efectiva frente a la infección. En este contexto, los compuestos naturales surgen como una alternativa atractiva debido a su origen natural, menor toxicidad y capacidad conocida para modular diversas vías celulares, incluyendo la actividad de receptores nucleares como AHR. El desarrollo de antagonistas específicos de AHR ha emergido como una estrategia de investigación que, en combinación con terapias convencionales, podría ofrecer un enfoque novedoso en el tratamiento de infecciones virales.

Por este motivo, en una primera instancia, se realizó una aproximación *in silico* para identificar compuestos naturales con afinidad por el dominio PAS-B de AHR. Los estudios de *docking* y dinámica molecular sugirieron que las vitaminas A y E, así como el CBD, podrían unirse al sitio de unión del AHR con energías comparables al antagonista CH-223191. Esta información preliminar sugiere que dichos compuestos podrían modular la vía de AHR de manera selectiva, lo que abriría nuevas posibilidades terapéuticas para su uso en infecciones virales.

Los resultados *in vitro* obtenidos con la vitamina A mostraron un efecto antiviral moderado frente al ZIKV en hRPE. Si bien se observó que la vitamina A modula la expresión de genes relacionados con la vía de AHR, como *TDO* y *CYP1A1*, aún se requieren estudios adicionales para confirmar si esta modulación responde a una activación directa del receptor. Una primera aproximación podría consistir en evaluar la

translocación nuclear del AHR mediante microscopía de fluorescencia, lo cual permitiría determinar si la vía de señalización está siendo activada.

Por otro lado, el CBD, un compuesto natural derivado de la planta *Cannabis*, fue seleccionado como candidato antiviral debido a su rol inmunomodulador, ampliamente estudiado en otros contextos patológicos. El interés por el CBD ha aumentado enormemente, particularmente debido a sus efectos moduladores sobre el sistema inmune y sus posibles aplicaciones en una variedad de trastornos. Al inicio de este trabajo doctoral (2020), los reportes sobre la actividad antiviral del CBD eran escasos, limitándose principalmente a estudios preliminares sobre el HCV. Sin embargo, en el contexto de la pandemia por SARS-CoV-2, comenzaron a surgir trabajos que demostraban su eficacia antiviral contra este virus. Este fenómeno resalta el valor del CBD como una terapia potencialmente eficaz en la lucha contra infecciones virales emergentes. En estos estudios, también se propusieron mecanismos de acción muy diversos, que iban desde efectos directos sobre las partículas virales, hasta acciones sobre la célula hospedadora, como la modulación de la respuesta inmune, el bloqueo de etapas tempranas del ciclo replicativo y la inducción de estrés en el RE. Estos hallazgos subrayan la acción pleiotrópica del CBD, que podría intervenir en distintos puntos del ciclo viral, desde la entrada hasta la liberación de nuevas partículas virales.

Una vez que los ensayos confirmaron la actividad antiviral contra ZIKV, se procedió a estudiar la hipótesis inicial de este trabajo, que proponía que dicho efecto se debía a su capacidad para antagonizar a AHR. Con este fin, en una primera instancia, se realizaron experimentos en células no infectadas y se observó que el CBD promovía la translocación nuclear del receptor, lo que indicaría una activación de la vía. Sin embargo, en condiciones donde la vía de AHR era activada por estímulos externos, el tratamiento con CBD redujo dicha activación. Estos resultados apuntan a que el CBD tiene una influencia compleja sobre esta vía y que actúa como un SAHRM de AHR, con efectos contexto y concentraciones dependiente. Este tipo de comportamiento, aunque aparentemente contradictorio, ya ha sido observado con otros bioactivos como el resveratrol y la quercetina<sup>45,46,172</sup>. En estos casos, se ha descrito que pueden activar el receptor de manera diferencial, mostrando respuestas que dependen del contexto celular, los estímulos presentes y las concentraciones utilizadas. Por ende, estos comportamientos

parciales subrayan la necesidad de una evaluación más precisa de los efectos dosis-dependientes y contexto-dependientes de compuestos como el CBD.

Considerando el comportamiento del CBD como SAHRM y su capacidad para regular vías inmunológicas como NF- $\kappa$ B e IFN, resulta interesante explorar estrategias terapéuticas combinadas. En otros contextos patológicos, como el cáncer, se ha propuesto combinar moduladores selectivos o agonistas de AHR con antagonistas clásicos para potenciar efectos beneficiosos y bloquear respuestas no deseadas<sup>173,174</sup>. La combinación de CBD con un antagonista como CH-223191 podría permitir una modulación más precisa de AHR, optimizando su perfil antiviral e inmunomodulador. Esta estrategia de combinación de moduladores selectivos podría tener un mayor impacto en la prevención y tratamiento de infecciones virales, particularmente en infecciones que requieren una modulación fina de la respuesta inmune. De este modo, estos hallazgos sientan las bases para que futuras investigaciones profundicen en el desarrollo de estrategias combinadas dirigidas a AHR en el contexto de infecciones virales. Si bien también demostramos que el CBD modula la expresión de genes como *IFNB1*, se evidenció que este no es su principal mecanismo de acción antiviral, ya que su efecto se mantuvo en células Vero, las cuales no producen IFN-I.

Tomando en cuenta estos hallazgos, se desarrolló una nueva línea experimental para investigar en mayor profundidad su mecanismo de acción. En una primera aproximación, se realizó un ensayo exploratorio que permitió observar que el CBD afectaba todas las etapas del ciclo replicativo del ZIKV. Un estudio previo reportó que el CBD impacta en el metabolismo y el rol del COL, una molécula esencial en la estructura y dinámica de las membranas celulares<sup>127</sup>. Considerando que las membranas participan activamente en todos los pasos del ciclo de replicación del ZIKV, desde la entrada hasta la liberación, este hallazgo resultó particularmente relevante. De forma consecutiva, se evaluó el efecto del CBD sobre otros virus con diferentes características genómicas y estructurales. Los resultados demostraron que el CBD ejerce una actividad antiviral de amplio espectro, lo que refuerza la idea de que su blanco principal se relaciona con componentes celulares comunes a múltiples virus, como las membranas.

Con el fin de validar la nueva hipótesis planteada, se realizó un análisis exhaustivo sobre el impacto del CBD sobre las membranas celulares. En una primera etapa, se evaluó el

efecto del compuesto en sistemas modelo de membranas artificiales, como MLVs y GUVs, ampliamente utilizados por su capacidad de aproximarse al comportamiento de las bicapas lipídicas celulares<sup>144,175</sup>. En estos modelos, el CBD indujo cambios en la organización de las membranas, evidenciándose una tendencia al aumento del desorden lipídico y una modificación en la distribución y comportamiento de los dominios de fase. Dado el carácter preliminar de estos resultados, se continuó con estudios en células vivas, ya que propiedades como el orden lipídico o la difusión dependen del contexto dinámico y complejo de las membranas celulares. Mediante microscopía de fluorescencia, se observó que el orden de las membranas se encontraba afectando de manera región-específica: mientras que en la MP se evidenció un incremento en el desorden, en las MPn se observó un aumento del orden. Estos resultados son consistentes con lo observado en las GUVs. En particular, en aquellas composiciones donde el contenido relativo de COL era mayor, el agregado de CBD promovió una mayor proporción de fase Ld, lo que refleja un mayor desorden lipídico. Este comportamiento se corresponde con el observado en la MP, mientras que, en composiciones con menor proporción de COL, el tratamiento con CBD mantuvo un perfil más ordenado, semejante al de la MPn. El hecho de que el efecto del CBD sea región-específico podría estar reflejando una redistribución diferencial del COL, posiblemente asociada a la reorganización de microdominios lipídicos, como las balsas lipídicas, que varían según la identidad funcional y la composición de cada compartimento celular. En este sentido, los resultados obtenidos con la CTxB aportan evidencia adicional, ya que su distribución más difusa en células tratadas sugiere alteraciones en la organización membranosa, compatibles con cambios en la disposición de estos dominios funcionales. Si bien la presencia de dominios lipídicos en compartimentos como el RE es menos caracterizada que en la MP, existen reportes que respaldan su existencia<sup>176</sup>. Esta reorganización podría explicarse por la capacidad del CBD de incorporarse a las membranas mimetizando el rol estructural del COL, como se ha propuesto previamente en la literatura. Por otro lado, se analizaron otras propiedades esenciales de las membranas como la difusión de moléculas. En la MP se evidenció una leve tendencia al aumento en la difusión del COL, en concordancia con el mayor desorden lipídico observado en esta región. Sin embargo, estas alteraciones no fueron estadísticamente significativas, indicando que la difusión de moléculas no se encuentra completamente comprometida. Esta observación resulta de

particular interés, ya que indica que el CBD afecta solo algunas propiedades específicas de la membrana, manteniendo otras funciones esenciales, lo cual es deseable al considerar blancos celulares para antivirales. Aun así, el bajo IS determinado podría explicarse por el blanco de acción del compuesto. A bajas concentraciones, el CBD ejerce su efecto antiviral sin comprometer la viabilidad celular; sin embargo, a concentraciones ligeramente más elevadas, su impacto sobre una estructura tan esencial y ubicua como las membranas celulares podría ser responsable de la alta citotoxicidad observada. Adicionalmente, se observó que tras tratamientos prolongados con CBD, los niveles de COL intracelular se encontraban disminuidos. Este hallazgo resulta coherente con estudios previos que vinculan al CBD con alteraciones en el metabolismo del COL, y refuerza la idea de que parte de su efecto antiviral podría estar relacionado con esta modulación lipídica. Finalmente, se evaluó si las membranas virales podían verse afectadas por el tratamiento. Mediante AFM, se analizó la morfología superficial de partículas virales de ZIKV purificadas a partir de células infectadas tratadas o no con CBD. Dado que las partículas virales de ZIKV adquieren su envoltura lipídica de la célula hospedadora, este análisis permitió evaluar si los efectos observados sobre las membranas celulares se trasladaban a las partículas virales. Las imágenes de AFM mostraron diferencias en la topografía de las partículas virales tratadas, lo que indica efectivamente una alteración en su membrana. En conjunto, estos resultados permiten concluir que el CBD impacta de manera directa sobre la organización lipídica de las membranas celulares y virales. Afecta propiedades clave como el orden de fases, pero mantiene otras como la movilidad lipídica, lo que refleja un efecto modulador más que disruptivo. Esta capacidad de alterar selectivamente funciones membranosas podría estar en la base de su mecanismo de acción antiviral, al interferir en etapas del ciclo viral altamente dependientes de la integridad y dinámica de las membranas.

Considerando estos efectos, resulta relevante destacar que el AHR actúa como un sensor intracelular de compuestos lipofílicos y está estrechamente vinculado al metabolismo de lípidos<sup>177-179</sup>. Diversos estudios han demostrado que puede ser activado por metabolitos derivados de ácidos grasos poliinsaturados, y que su activación depende del entorno lipídico celular<sup>180</sup>. En este sentido, los cambios inducidos por el CBD en la composición y organización lipídica podrían modificar la disponibilidad o naturaleza de los ligandos

endógenos del AHR, modulando así su actividad funcional. Además, se ha reportado que el AHR participa en la regulación de la vía biosintética del COL de forma independiente a elementos de respuesta clásicos, lo que sugiere un vínculo directo entre esta vía de señalización y el control de niveles intracelulares de COL<sup>181</sup>. Por lo tanto, las alteraciones observadas en este estudio podrían estar reflejando una interacción más amplia entre el impacto del CBD sobre las membranas, la homeostasis del COL y la modulación de rutas sensibles al estado lipídico como la del AHR. Esta posible conexión plantea un nuevo eje de estudio que podrá ser explorado en estudios futuros para comprender más profundamente los mecanismos involucrados.

Dado que el efecto del CBD sobre las membranas celulares implicaba un delicado equilibrio entre eficacia antiviral y la citotoxicidad, se diseñaron y desarrollaron nanosistemas con el propósito de mejorar su administración. La nanomedicina es un campo que ofrece soluciones innovadoras para mejorar la biodisponibilidad, estabilidad y perfil de seguridad de compuestos bioactivos. Las NP permiten encapsular moléculas hidrofóbicas como el CBD, protegerlas de entornos biológicos, controlar su liberación y, en algunos casos, dirigir su acumulación en tejidos específicos, lo que potencialmente reduce los efectos adversos y mejora su eficacia terapéutica. Para la vehiculización del CBD se seleccionaron dos plataformas con características complementarias: NP-PLGA, un polímero biodegradable y aprobado por entidades regulatorias, y NIO, vesículas lipídicas estables y de bajo costo. Ambos sistemas presentan ventajas en términos de estabilidad, encapsulación de compuestos lipofílicos y potencial para mejorar la biodisponibilidad del CBD.

Las NP-PLGA obtenidas mostraron buenas propiedades fisicoquímicas en términos de tamaño y dispersión, pero presentaron una estabilidad coloidal limitada, especialmente en ausencia de crioprotección, y un porcentaje de EE y LC reducido. De manera contraria, los NIO cargados con CBD presentaron un alto porcentaje de EE y LC, buena estabilidad coloidal y una actividad antiviral significativamente superior al CBD libre, sin generar citotoxicidad. El análisis de la morfología de los NIO mediante el empleo microscopía de ultrarresolución, confirmaron que la incorporación de CBD genera alteraciones tras su incorporación, lo cual refuerza los resultados previos sobre el impacto del compuesto sobre las membranas lipídicas. Los resultados presentados en esta tesis resultan

prometedores; no obstante, en investigaciones futuras será crucial realizar un análisis más detallado con el fin de comprender mejor los mecanismos de absorción y distribución de estas en las células diana. Adicionalmente, será fundamental evaluar el perfil de liberación de los compuestos mediante modelos matemáticos farmacológicos, que permitan describir su comportamiento en el tiempo y el espacio, predecir su desempeño en entornos biológicos dinámicos y optimizar la formulación para lograr una liberación controlada y eficaz. Asimismo, se debe investigar en profundidad los efectos inmunomoduladores del CBD vehiculizado, dado que este compuesto podría influir significativamente en la modulación de la respuesta inmune, lo cual podría ser relevante tanto para mejorar la eficacia terapéutica como para prevenir respuestas adversas. Además, extender este enfoque a otros modelos virales será esencial para evaluar la aplicabilidad de esta estrategia en diversos contextos infecciosos. Este último aspecto potenciaría el perfil terapéutico del CBD, consolidando su uso como una estrategia antiviral versátil y eficaz frente a múltiples patógenos. En conjunto, estas investigaciones contribuirán a una comprensión más profunda de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los tratamientos basados en NP y CBD, abriendo el camino para su desarrollo y aplicación en la práctica clínica como una terapia antiviral innovadora y de amplio espectro.

# CONCLUSIÓN

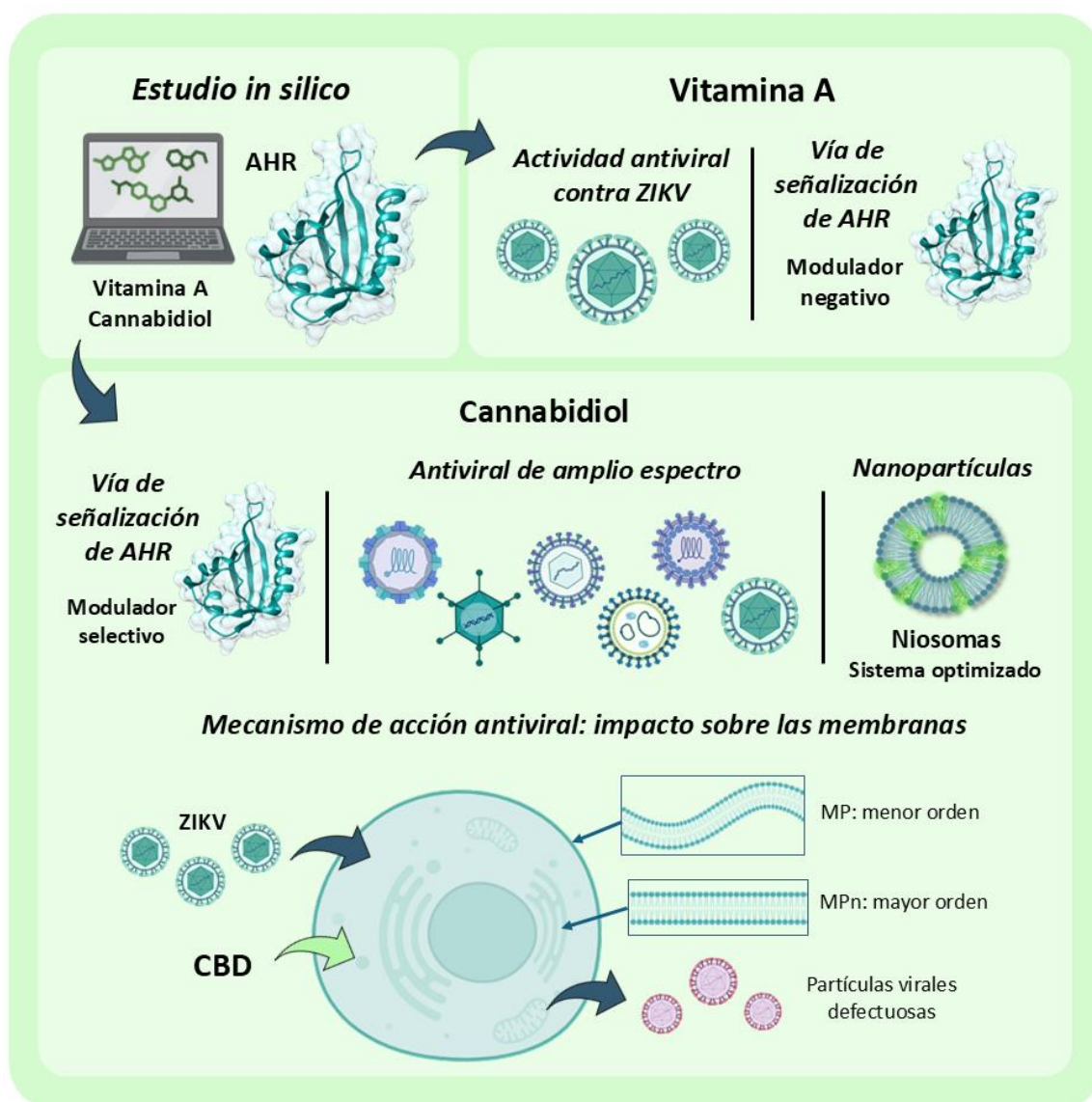
Esta tesis destaca un enfoque multidisciplinario que combina herramientas computacionales, bioquímicas, biofísicas y de biología molecular para avanzar en el desarrollo racional de antivirales y la comprensión de sus mecanismos de acción, reafirmando el valor de los compuestos naturales como agentes terapéuticos frente a virus emergentes y desatendidos. Se resalta el valor de los estudios *in silico* como punto de partida para identificar antivirales y formular hipótesis mecanísticas. En este sentido, los estudios *in vitro* confirmaron que la vitamina A posee actividad antiviral contra el ZIKV y ejerce un efecto modulador negativo sobre la vía de AHR. Por su parte, si bien los estudios experimentales con CBD también evidenciaron un efecto antiviral contra el ZIKV, su acción sobre la vía de AHR resulta más compleja. Estos resultados subrayan la necesidad de complementar las simulaciones moleculares con ensayos experimentales que permitan validar, matizar o refinar las predicciones obtenidas por métodos computacionales.

Adicionalmente, se demostró que el CBD afecta la organización de las membranas celulares, interfiriendo así en distintas etapas del ciclo replicativo del ZIKV. Al dirigirse a estructuras celulares fundamentales como las membranas, su acción no solo resulta eficaz frente a infecciones virales, sino que también podría tener implicancias terapéuticas en otras áreas como la oncología y la neurociencia, donde las alteraciones en la dinámica de membranas desempeñan un papel central.

Desde una perspectiva integradora, los hallazgos de este trabajo pueden enmarcarse dentro del enfoque “Una Salud”, que reconoce la interdependencia entre la salud humana, animal y ambiental. El CBD, compuesto de origen natural evaluado en esta tesis, demostró actividad antiviral de amplio espectro frente a varios virus relevantes desde el punto de vista sanitario. Esta característica lo posiciona como un candidato promisorio no solo para el desarrollo de nuevas terapias antivirales en humanos, sino también en el ámbito de la salud animal, donde ya se emplea para el tratamiento de otras afecciones. Además, su origen vegetal sugiere un potencial menor impacto ecológico en comparación con fármacos sintéticos, lo que lo convierte en una alternativa alineada con principios de sostenibilidad. En conjunto, estos resultados aportan evidencia que respalda la exploración de agentes antivirales dentro de un enfoque

transversal e integrado, en línea con las estrategias impulsadas por el paradigma de Una Salud.

En conclusión, se logró la construcción de un resumen integrador que permite unificar y contextualizar los hallazgos experimentales de la tesis doctoral, proporcionando una visión global y coherente de los mecanismos propuestos (**Figura 76**).



**Figura 76.** Representación esquemática del abordaje multidisciplinario y de los principales hallazgos obtenidos. Los estudios *in silico* permitieron identificar a la vitamina A y al CBD como moduladores de la vía de señalización de AHR, con actividades antivirales diferenciales frente al ZIKV. El CBD, además de actuar como antiviral de amplio espectro, fue formulado en nanosistemas optimizados (NIO). A nivel celular, el mecanismo de acción antiviral del CBD involucra la alteración de la organización lipídica de las membranas, lo que impacta en el ensamblaje de partículas virales defectuosas.

# BIBLIOGRAFÍA

1. Diani E, Lagni A, Lotti V, et al. Vector-Transmitted Flaviviruses: An Antiviral Molecules Overview. *Microorganisms* 2023;11(10); doi: 10.3390/microorganisms11102427.
2. Kolimenakis A, Heinz S, Wilson ML, et al. The role of urbanisation in the spread of aedes mosquitoes and the diseases they transmit—a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 2021;15(9):1–21; doi: 10.1371/journal.pntd.0009631.
3. Organización Mundial de la Salud. Vector-Borne Diseases. 2024. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>.
4. (OPS) OP de la S. Emergencia Grado 3 Por Brote Multi-País de Dengue. 2024. Available from: <https://www.paho.org/es/temas/dengue/brote-dengue-multi-pais-grado-3>.
5. (OPS) OP de la S. Situación Epidemiológica Del Dengue En Las Américas - Semana Epidemiológica 13, 2025. 2025. Available from: <https://www.paho.org/es/documentos/situacion-epidemiologica-dengue-americas-semana-epidemiologica-13-2025>.
6. Organización Mundial de la Salud. Declaración de La OMS Sobre La Primera Reunión Del Comité de Emergencia Del Reglamento Sanitario Internacional (2005) Sobre El Virus Del Zika y El Aumento de Los Trastornos Neurológicos y Las Malformaciones Congénitas. 2016. Available from: <https://www.who.int/es/news/item/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-%282005%29-%28hr-2005%29-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations>.
7. Organización Mundial de la Salud. Virus Del Zika. 2022. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>.
8. Anonymous. Working Together for the Health of Humans, Animals, Plants and the Environment. *One Health Joint Plan of Action (2022–2026)*. 2022.; doi: 10.20506/bull.2022.2.3324.
9. Mahmoud A, Pomar L, Lambert V, et al. Prenatal and Postnatal Ocular Abnormalities Following Congenital Zika Virus Infections: A Systematic Review. *Ocul Immunol Inflamm* 2024;32(9):2217–2227; doi: 10.1080/09273948.2024.2314086.
10. Blyden K, Thomas J, Emami-Naeini P, et al. Emerging Infectious Diseases and the Eye: Ophthalmic Manifestations, Pathogenesis, and One Health Perspectives. *Int Ophthalmol Clin* 2024;64(4):39–54; doi: 10.1097/IIO.0000000000000539.
11. Geraghty RJ, Aliota MT, Bonnac LF. Broad-Spectrum Antiviral Strategies and Nucleoside Analogues. *Viruses* 2021;13(4); doi: 10.3390/v13040667.
12. Piplani S, Singh P, Petrovsky N, et al. Computational Repurposing of Drugs and Natural Products Against SARS-CoV-2 Main Protease (Mpro) as Potential COVID-19 Therapies. *Front Mol Biosci* 2022;9; doi: 10.3389/fmolb.2022.781039.
13. Liang Y, Quan X, Gu R, et al. Repurposing existing drugs for the treatment of COVID-19/SARS-CoV-2: A review of pharmacological effects and mechanism of action. *Heliyon* 2024;10(16):e35988; doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e35988.

14. Singh S, Kola P, Kaur D, et al. Therapeutic Potential of Nutraceuticals and Dietary Supplements in the Prevention of Viral Diseases: A Review. *Front Nutr* 2021;8(September):1–16; doi: 10.3389/fnut.2021.679312.
15. Islam MT, Sarkar C, El-Kersh DM, et al. Natural products and their derivatives against coronavirus: A review of the non-clinical and pre-clinical data. *Phytother Res* 2020;34(10):2471–2492; doi: 10.1002/ptr.6700.
16. Costagliola G, Nuzzi G, Spada E, et al. Nutraceuticals in Viral Infections: An Overview of the Immunomodulating Properties. *Nutrients* 2021;13(7); doi: 10.3390/nu13072410.
17. Singh MP, Singh N, Mishra D, et al. Computational Approaches to Designing Antiviral Drugs against COVID-19: A Comprehensive Review. *Curr Pharm Des* 2023;29(33):2601–2617; doi: 10.2174/0113816128259795231023193419.
18. Sharma G, Kumar N, Sharma CS, et al. Identification of promising SARS-CoV-2 main protease inhibitor through molecular docking, dynamics simulation, and ADMET analysis. *Sci Rep* 2025;15(1):2830; doi: 10.1038/s41598-025-86016-9.
19. Gupta PK, Pal Y, Kumar P, et al. A Critical Review on Computational Techniques through in silico Assisted Drug Design. 2024;14(4):1035–1041; doi: 10.5530/ijpi.14.4.113.
20. Hangyu W, Panpan L, Jie S, et al. Advancements in Antiviral Drug Development: Comprehensive Insights into Design Strategies and Mechanisms Targeting Key Viral Proteins. *J Microbiol Biotechnol* 2024;34(7 July):1376–1384; doi: 10.4014/jmb.2403.03008.
21. Giovannoni F, Li Z, Remes-Lenicov F, et al. AHR signaling is induced by infection with coronaviruses. *Nat Commun* 2021;12(1):5148; doi: 10.1038/s41467-021-25412-x.
22. Giovannoni F, Bosch I, Polonio CM, et al. AHR is a Zika virus host factor and a candidate target for antiviral therapy. *Nat Neurosci* 2020;23(8):939–951; doi: 10.1038/s41593-020-0664-0.
23. Rothhammer V, Quintana FJ. The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2019;19(3):184–197; doi: 10.1038/s41577-019-0125-8.
24. Vicente J, Benedetti M, Martelliti P, et al. The Flavonoid Cyanidin Shows Immunomodulatory and Broad-Spectrum Antiviral Properties, Including SARS-CoV-2. *Viruses* 2023;15(4); doi: 10.3390/v15040989.
25. Fornaguera C, Dols-Perez A, Calderó G, et al. PLGA nanoparticles prepared by nano-emulsion templating using low-energy methods as efficient nanocarriers for drug delivery across the blood–brain barrier. *J Control Release* 2015;211:134–143; doi: 10.1016/j.jconrel.2015.06.002.
26. Fornaguera C, Feiner-Gracia N, Calderó G, et al. PLGA nanoparticles from nano-emulsion templating as imaging agents: Versatile technology to obtain nanoparticles loaded with fluorescent dyes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2016;147:201–209; doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.08.001.
27. Bayindir ZS, Yuksel N. Characterization of niosomes prepared with various nonionic surfactants for paclitaxel oral delivery. *J Pharm Sci* 2010;99(4):2049–2060; doi: 10.1002/jps.21944.
28. Sadeghi Ghadi Z, Dinarvand R, Asemi N, et al. Preparation, characterization and in vivo evaluation of novel hyaluronan containing niosomes tailored by Box-

- Behnken design to co-encapsulate curcumin and quercetin. *Eur J Pharm Sci* 2019;130:234–246; doi: 10.1016/j.ejps.2019.01.035.
29. Thabet Y, Elsabahy M, Eissa NG. Methods for preparation of niosomes: A focus on thin-film hydration method. *Methods* 2021; doi: 10.1016/j.ymeth.2021.05.004.
30. Stockinger B, Shah K, Wincent E. AHR in the intestinal microenvironment: safeguarding barrier function. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2021;18(8):559–570; doi: 10.1038/s41575-021-00430-8.
31. Quintana FJ, Sherr DH. Aryl Hydrocarbon Receptor Control of Adaptive Immunity. *Pharmacol Rev* 2013;65(4):1148–1161; doi: 10.1124/pr.113.007823.
32. Dai S, Qu L, Li J, et al. Structural insight into the ligand binding mechanism of aryl hydrocarbon receptor. *Nat Commun* 2022;13(1):6234; doi: 10.1038/s41467-022-33858-w.
33. Wen Z, Zhang Y, Zhang B, et al. Cryo-EM structure of the cytosolic AhR complex. *Structure* 2023;31(3):295-308.e4; doi: 10.1016/j.str.2022.12.013.
34. Wright EJ, De Castro KP, Joshi AD, et al. Canonical and non-canonical aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Curr Opin Toxicol* 2017;2:87–92; doi: 10.1016/j.cotox.2017.01.001.
35. Grishanova A, Perepechaeva M. Aryl Hydrocarbon Receptor in Oxidative Stress as a Double Agent and Its Biological and Therapeutic Significance. *Int J Mol Sci* 2022;23:6719; doi: 10.3390/ijms23126719.
36. Vogel CFA, Khan EM, Leung PSC, et al. Cross-talk between aryl hydrocarbon receptor and the inflammatory response: a role for nuclear factor- $\kappa$ B. *J Biol Chem* 2014;289(3):1866–1875; doi: 10.1074/jbc.M113.505578.
37. Stockinger B, Meglio P Di, Gialitakis M, et al. The aryl hydrocarbon receptor: Multitasking in the immune system. *Annu Rev Immunol* 2014;32:403–432; doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120245.
38. Denison MS, Soshilov AA, He G, et al. Exactly the same but different: Promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicol Sci* 2011;124(1):1–22; doi: 10.1093/toxsci/kfr218.
39. Kawajiri K, Fujii-Kuriyama Y. The aryl hydrocarbon receptor: A multifunctional chemical sensor for host defense and homeostatic maintenance. *Exp Anim* 2017;66(2):75–89; doi: 10.1538/expanim.16-0092.
40. Denison MS, Faber SC. And Now for Something Completely Different: Diversity in Ligand-Dependent Activation of Ah Receptor Responses. *Curr Opin Toxicol* 2017;2:124–131; doi: 10.1016/j.cotox.2017.01.006.
41. Stejskalova L, Dvorak Z, Pavek P. Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: current state of art. *Curr Drug Metab* 2011;12(2):198–212; doi: 10.2174/138920011795016818.
42. Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003;43:309–334; doi: 10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828.
43. Ciolino HP, Daschner PJ, Yeh GC. Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem J* 1999;340 ( Pt 3(Pt 3):715–722.
44. Santana MR, Santos YB, Santos KS, et al. Differential Interactions of Flavonoids with the Aryl Hydrocarbon Receptor In Silico and Their Impact on Receptor

- Activity In Vitro. *Pharmaceuticals* 2024;17(8); doi: 10.3390/ph17080980.
45. Casper RF, Quesne M, Rogers IM, et al. Resveratrol Has Antagonist Activity on the Aryl Hydrocarbon Receptor: Implications for Prevention of Dioxin Toxicity. *Mol Pharmacol* 1999;56(4):784–790; doi: [https://doi.org/10.1016/S0026-895X\(24\)12541-2](https://doi.org/10.1016/S0026-895X(24)12541-2).
  46. Neamah WH, Rutkovsky A, Abdullah O, et al. Resveratrol Attenuates 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin-Mediated Induction of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) and Their Functions. *Nutrients* 2023;15(21); doi: 10.3390/nu15214667.
  47. Safe S, Jin U-H, Park H, et al. Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) Ligands as Selective AHR Modulators (SAhRMs). *Int J Mol Sci* 2020;21(18); doi: 10.3390/ijms21186654.
  48. Mascanfroni ID, Takenaka MC, Yeste A, et al. Metabolic control of type 1 regulatory T cell differentiation by AHR and HIF1- $\alpha$ . *Nat Med* 2015;21(6):638–646; doi: 10.1038/nm.3868.
  49. Ota M, Koike R, Amemiya T, et al. An assignment of intrinsically disordered regions of proteins based on NMR structures. *J Struct Biol* 2013;181(1):29–36; doi: 10.1016/j.jsb.2012.10.017.
  50. Mosa FES, Alqahtani MA, El-Ghiaty MA, et al. Identifying novel aryl hydrocarbon receptor (AhR) modulators from clinically approved drugs: In silico screening and In vitro validation. *Arch Biochem Biophys* 2024;754:109958; doi: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2024.109958>.
  51. Vazquez-Rivera E, Rojas BL, Parrott JC, et al. The aryl hydrocarbon receptor as a model PAS sensor. *Toxicol Reports* 2022;9:1–11; doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.11.017>.
  52. Deller MC, Kong L, Rupp B. Protein stability: a crystallographer's perspective. *Acta Crystallogr Sect F, Struct Biol Commun* 2016;72(Pt 2):72–95; doi: 10.1107/S2053230X15024619.
  53. Gruszczuk J, Grandvuillemin L, Lai-Kee-Him J, et al. Cryo-EM structure of the agonist-bound Hsp90-XAP2-AHR cytosolic complex. *Nat Commun* 2022;13(1); doi: 10.1038/s41467-022-34773-w.
  54. Schroeder JC, Dinatale BC, Murray IA, et al. The uremic toxin 3-indoxyl sulfate is a potent endogenous agonist for the human aryl hydrocarbon receptor. *Biochemistry* 2010;49(2):393–400; doi: 10.1021/bi901786x.
  55. Wu D, Potluri N, Lu J, et al. Structural integration in hypoxia-inducible factors. *Nature* 2015;524(7565):303–308; doi: 10.1038/nature14883.
  56. Martí-Renom MA, Stuart AC, Fiser A, et al. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2000;29:291–325; doi: 10.1146/annurev.biophys.29.1.291.
  57. Rost B. Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Eng* 1999;12(2):85–94; doi: 10.1093/protein/12.2.85.
  58. Forli S, Huey R, Pique ME, et al. Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nat Protoc* 2016;11(5):905–919; doi: 10.1038/nprot.2016.051.
  59. Anonymous. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility - PubMed. 2021.
  60. Gu YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA. The PAS superfamily: sensors of

- environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000;40:519–561; doi: 10.1146/annurev.pharmtox.40.1.519.
61. Keith B, Simon MC. Hypoxia-Inducible Factors, Stem Cells, and Cancer. *Cell* 2007;129(3):465–472; doi: 10.1016/j.cell.2007.04.019.
  62. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000;88(4):1474–1480; doi: 10.1152/jappl.2000.88.4.1474.
  63. Scheuermann TH, Li Q, Ma H-W, et al. Allosteric inhibition of hypoxia inducible factor-2 with small molecules. *Nat Chem Biol* 2013;9(4):271–276; doi: 10.1038/nchembio.1185.
  64. Chen W, Hill H, Christie A, et al. Targeting renal cell carcinoma with a HIF-2 antagonist. *Nature* 2016;539(7627):112–117; doi: 10.1038/nature19796.
  65. Giani Tagliabue S, Faber SC, Motta S, et al. Modeling the binding of diverse ligands within the Ah receptor ligand binding domain. *Sci Rep* 2019;9(1):10693; doi: 10.1038/s41598-019-47138-z.
  66. Carlson HA. Protein flexibility and drug design: how to hit a moving target. *Curr Opin Chem Biol* 2002;6(4):447–452; doi: 10.1016/s1367-5931(02)00341-1.
  67. Gutierrez MA, Davis SS, Rosko A, et al. A novel AhR ligand, 2AI, protects the retina from environmental stress. *Sci Rep* 2016;6(1):29025; doi: 10.1038/srep29025.
  68. Hu P, Herrmann R, Bednar A, et al. Aryl hydrocarbon receptor deficiency causes dysregulated cellular matrix metabolism and age-related macular degeneration-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(43); doi: 10.1073/pnas.1307574110.
  69. Karmoker JR, Bounds SE, Cai J. Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated immune responses to degeneration of the retinal pigment epithelium. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2024;1870(7):167351; doi: 10.1016/j.bbadis.2024.167351.
  70. Hooks JJ, Nagineni CN, Hooper LC, et al. IFN-beta provides immuno-protection in the retina by inhibiting ICAM-1 and CXCL9 in retinal pigment epithelial cells. *J Immunol* 2008;180(6):3789–3796; doi: 10.4049/jimmunol.180.6.3789.
  71. Li R, Maminishkis A, Banzon T, et al. IFN $\gamma$  regulates retinal pigment epithelial fluid transport. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;297(6):C1452-65; doi: 10.1152/ajpcell.00255.2009.
  72. Meyers DG, Maloley PA, Weeks D. Safety of antioxidant vitamins. *Arch Intern Med* 1996;156(9):925–935.
  73. Andre CM, Hausman J-F, Guerriero G. Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Front Plant Sci* 2016;Volume 7-; doi: 10.3389/fpls.2016.00019.
  74. Procaccia S, Lewitus GM, Lipson Feder C, et al. Cannabis for Medical Use: Versatile Plant Rather Than a Single Drug. *Front Pharmacol* 2022;13(April):1–14; doi: 10.3389/fphar.2022.894960.
  75. Visković J, Zheljzkov VD, Sikora V, et al. Industrial Hemp (Cannabis sativa L.) Agronomy and Utilization: A Review. *Agronomy* 2023;13(3); doi: 10.3390/agronomy13030931.
  76. Boletín Oficial de la República Argentina. Ley N.º 27.350. (2017). Investigación Médica y Científica Del Uso Medicinal de La Planta de Cannabis y Sus Derivados.

- n.d. Available from:  
<https://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/270000-274999/273801/norma.htm>.
77. Boletín Oficial de la República Argentina. Decreto N.º 883/2020. (2020). Reglamentación de La Ley 27.350 Sobre El Uso Medicinal Del Cannabis. 2020. Available from:  
<https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/237208/20201112>.
  78. Boletín Oficial de la República Argentina. Resolución N.º 3132/2024. (2024). Modificaciones Al Programa REPROCANN. n.d. Available from:  
<https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/312511/20240820>.
  79. Atalay S, Jarocka-Karpowicz I, Skrzydlewska E. Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties of Cannabidiol. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 2019;9(1); doi: 10.3390/antiox9010021.
  80. Bhunia S, Kolishetti N, Arias AY, et al. Cannabidiol for neurodegenerative disorders: A comprehensive review. *Front Pharmacol* 2022;Volume 13; doi: 10.3389/fphar.2022.989717.
  81. Cristino L, Bisogno T, Di Marzo V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat Rev Neurol* 2020;16(1):9–29; doi: 10.1038/s41582-019-0284-z.
  82. Vučković S, Srebro D, Vujović KS, et al. Cannabinoids and Pain: New Insights From Old Molecules. *Front Pharmacol* 2018;Volume 9-; doi: 10.3389/fphar.2018.01259.
  83. Devinsky O, Cross JH, Laux L, et al. Trial of Cannabidiol for Drug-Resistant Seizures in the Dravet Syndrome. *N Engl J Med* 2017;376(21):2011–2020; doi: 10.1056/nejmoa1611618.
  84. Thiele EA, Marsh ED, French JA, et al. Cannabidiol in patients with seizures associated with Lennox-Gastaut syndrome (GWPCARE4): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 2018;391(10125):1085–1096; doi: 10.1016/S0140-6736(18)30136-3.
  85. Martini S, Gemma A, Ferrari M, et al. Effects of Cannabidiol on Innate Immunity: Experimental Evidence and Clinical Relevance. *Int J Mol Sci* 2023;24(4); doi: 10.3390/ijms24043125.
  86. Peyravian N, Deo S, Daunert S, et al. Cannabidiol as a Novel Therapeutic for Immune Modulation. *ImmunoTargets Ther* 2020;9:131–140; doi: 10.2147/ITT.S263690.
  87. Wang X, Lin C, Jin S, et al. Cannabidiol alleviates neuroinflammation and attenuates neuropathic pain via targeting FKBP5. *Brain Behav Immun* 2023;111:365–375; doi: 10.1016/j.bbi.2023.05.008.
  88. Nichols JM, Kaplan BLF. Immune Responses Regulated by Cannabidiol. *Cannabis cannabinoid Res* 2020;5(1):12–31; doi: 10.1089/can.2018.0073.
  89. Lowe HIC, Toyang NJ, McLaughlin W. Potential of Cannabidiol for the Treatment of Viral Hepatitis. *Pharmacognosy Res* 2017;9(1):116–118; doi: 10.4103/0974-8490.199780.
  90. Nguyen LC, Yang D, Nicolaescu V, et al. Cannabidiol Inhibits SARS-CoV-2 Replication and Promotes the Host Innate Immune Response. *bioRxiv Prepr Serv Biol* 2021; doi: 10.1101/2021.03.10.432967.
  91. DeMarino C, Cowen M, Khatkar P, et al. Cannabinoids Reduce Extracellular

- Vesicle Release from HIV-1 Infected Myeloid Cells and Inhibit Viral Transcription. *Cells* 2022;11(4); doi: 10.3390/cells11040723.
92. Corpetti C, Del Re A, Seguella L, et al. Cannabidiol inhibits SARS-Cov-2 spike (S) protein-induced cytotoxicity and inflammation through a PPAR $\gamma$ -dependent TLR4/NLRP3/Caspase-1 signaling suppression in Caco-2 cell line. *Phytother Res* 2021;35(12):6893–6903; doi: 10.1002/ptr.7302.
  93. Nguyen LC, Yang D, Nicolaescu V, et al. Cannabidiol inhibits SARS-CoV-2 replication through induction of the host ER stress and innate immune responses. *Sci Adv* 2022;8(8); doi: 10.1126/sciadv.abi6110.
  94. Anil SM, Shalev N, Vinayaka AC, et al. Cannabis compounds exhibit anti-inflammatory activity in vitro in COVID-19-related inflammation in lung epithelial cells and pro-inflammatory activity in macrophages. *Sci Rep* 2021;11(1):1462; doi: 10.1038/s41598-021-81049-2.
  95. Chamoso-Sanchez D, Panini M, Caroli C, et al. Unveiling cellular changes in leukaemia cell lines after cannabidiol treatment through lipidomics. *Sci Rep* 2025;15(1):2238; doi: 10.1038/s41598-025-86044-5.
  96. Huang T, Xu T, Wang Y, et al. Cannabidiol inhibits human glioma by induction of lethal mitophagy through activating TRPV4. *Autophagy* 2021;17(11):3592–3606; doi: 10.1080/15548627.2021.1885203.
  97. Esmaeli M, Dehabadi MD, Khaleghi AA. Cannabidiol as a novel therapeutic agent in breast cancer: evidence from literature. *BMC Cancer* 2025;25(1); doi: 10.1186/s12885-025-14175-z.
  98. Gonca Ersöz, Darıcı Faruk. The Effect of Cannabidiol on Ischemia/Reperfusion-Induced Ventricular Arrhythmias: The Role of Adenosine A1 Receptors. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2014;20(1):76–83; doi: 10.1177/1074248414532013.
  99. Guo Y, Wei R, Deng J, et al. Research progress in the management of vascular disease with cannabidiol: a review. *J Cardiothorac Surg* 2024;19(1):6; doi: 10.1186/s13019-023-02476-y.
  100. Durst R, Danenberg H, Gallily R, et al. Cannabidiol, a nonpsychoactive Cannabis constituent, protects against myocardial ischemic reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293(6):H3602-7; doi: 10.1152/ajpheart.00098.2007.
  101. Couch DG, Maudslay H, Doleman B, et al. The Use of Cannabinoids in Colitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Inflamm Bowel Dis* 2018;24(4):680–697; doi: 10.1093/ibd/izy014.
  102. Stanescu AMA, Bejan GC, Balta MD, et al. The Perspective of Cannabidiol in Psoriasis Therapy. *Psoriasis (Auckland, NZ)* 2024;14:51–61; doi: 10.2147/PTT.S469698.
  103. Wiciński M, Fajkiel-Madajczyk A, Kurant Z, et al. The Use of Cannabidiol in Metabolic Syndrome-An Opportunity to Improve the Patient's Health or Much Ado about Nothing? *J Clin Med* 2023;12(14); doi: 10.3390/jcm12144620.
  104. Marquez AB, Vicente J, Castro E, et al. Broad-Spectrum Antiviral Effect of Cannabidiol Against Enveloped and Nonenveloped Viruses. *Cannabis Cannabinoid Res* 2023;0(0):1–15; doi: 10.1089/can.2023.0103.
  105. Denison MS, Pandini A, Nagy SR, et al. Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chem Biol Interact* 2002;141:3–24.

106. Narita Y, Tamura A, Hatakeyama S, et al. The components of the AhR-molecular chaperone complex differ depending on whether the ligands are toxic or non-toxic. *FEBS Lett* 2024;598(12):1478–1490; doi: 10.1002/1873-3468.14871.
107. Pollenz RS, Sattler CA, Poland A. The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunofluorescence microscopy. *Mol Pharmacol* 1994;45(3):428–438; doi: [https://doi.org/10.1016/S0026-895X\(25\)10014-X](https://doi.org/10.1016/S0026-895X(25)10014-X).
108. Davarinos NA, Pollenz RS. Aryl Hydrocarbon Receptor Imported into the Nucleus following Ligand Binding Is Rapidly Degraded via the Cytosolic Proteasome following Nuclear Export\*. *J Biol Chem* 1999;274(40):28708–28715; doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.40.28708>.
109. Hahn ME, Allan LL, Sherr DH. Regulation of constitutive and inducible AHR signaling: complex interactions involving the AHR repressor. *Biochem Pharmacol* 2009;77(4):485–497; doi: 10.1016/j.bcp.2008.09.016.
110. Lano G, Laforêt M, Von Kotze C, et al. Aryl Hydrocarbon Receptor Activation and Tissue Factor Induction by Fluid Shear Stress and Indoxyl Sulfate in Endothelial Cells. *Int J Mol Sci* 2020;21(7); doi: 10.3390/ijms21072392.
111. Wan F, Lenardo MJ. The nuclear signaling of NF- $\kappa$ B: current knowledge, new insights, and future perspectives. *Cell Res* 2010;20(1):24–33; doi: 10.1038/cr.2009.137.
112. Jiang B, Brecher P, Cohen RA. Persistent Activation of Nuclear Factor- $\kappa$ B by Interleukin-1 $\beta$  and Subsequent Inducible NO Synthase Expression Requires Extracellular Signal-Regulated Kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(12):1915–1920; doi: 10.1161/hq1201.099424.
113. Hiscott J, Kwon H, Génin P. Hostile takeovers: viral appropriation of the NF- $\kappa$ B pathway. *J Clin Invest* 2001;107(2):143–151; doi: 10.1172/JCI11918.
114. Nawas AF, Solmonson A, Gao B, et al. IL-1 $\beta$  mediates the induction of immune checkpoint regulators IDO1 and PD-L1 in lung adenocarcinoma cells. *Cell Commun Signal* 2023;21(1):331; doi: 10.1186/s12964-023-01348-1.
115. Yndart Arias A, Kolishetti N, Vashist A, et al. Anti-inflammatory effects of CBD in human microglial cell line infected with HIV-1. *Sci Rep* 2023;13(1); doi: 10.1038/s41598-023-32927-4.
116. Kim S, Dere E, Burgoon LD, et al. Comparative analysis of AhR-mediated TCDD-elicited gene expression in human liver adult stem cells. *Toxicol Sci* 2009;112(1):229–244; doi: 10.1093/toxsci/kfp189.
117. Safe S, Han H, Goldsby J, et al. Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Ligands as Selective AhR Modulators: Genomic Studies. *Curr Opin Toxicol* 2018;11–12:10–20; doi: 10.1016/j.cotox.2018.11.005.
118. Martinez Naya N, Kelly J, Corna G, et al. Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Cannabidiol. *Molecules* 2023;28(16); doi: 10.3390/molecules28165980.
119. Lagarde F, , Claire Beausoleil SMB, Belzunces LP, et al. Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment. *Class Philol* 1971;66(2):114–115; doi: 10.1086/365729.
120. Simon TW, Budinsky RA, Rowlands JC. A model for aryl hydrocarbon receptor-activated gene expression shows potency and efficacy changes and predicts

120. squelching due to competition for transcription co-activators. *PLoS One* 2015;10(6):e0127952; doi: 10.1371/journal.pone.0127952.
121. Evans BR, Karchner SI, Allan LL, et al. Repression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) signaling by AHR repressor: role of DNA binding and competition for AHR nuclear translocator. *Mol Pharmacol* 2008;73(2):387–398; doi: 10.1124/mol.107.040204.
122. Wajda A, Łapczuk-Romańska J, Paradowska-Gorycka A. Epigenetic Regulations of AhR in the Aspect of Immunomodulation. *Int J Mol Sci* 2020;21(17); doi: 10.3390/ijms21176404.
123. Endler A, Chen L, Shibasaki F. Coactivator recruitment of AhR/ARNT1. *Int J Mol Sci* 2014;15(6):11100–11110; doi: 10.3390/ijms150611100.
124. Wang Y-T, Branche E, Xie J, et al. Zika but not Dengue virus infection limits NF-κB activity in human monocyte-derived dendritic cells and suppresses their ability to activate T cells. *Nat Commun* 2025;16(1):2695; doi: 10.1038/s41467-025-57977-2.
125. Pokhrel S. Zika and Dengue Viruses Differentially Modulate Host mRNA Processing Factors Defining Its Virulence. *Αγχη* 2024;15(1):37–48.
126. Martinez Naya N, Kelly J, Corna G, et al. Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Cannabidiol. *Molecules* 2023;28(16):1–24; doi: 10.3390/molecules28165980.
127. Guard SE, Chapnick DA, Poss ZC, et al. Multiomic Analysis Reveals Disruption of Cholesterol Homeostasis by Cannabidiol in Human Cell Lines. *Mol Cell Proteomics* 2022;21(10):100262; doi: <https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2022.100262>.
128. Kaufmann B, Rossmann MG. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. *Microbes Infect* 2011;13(1):1–9; doi: 10.1016/j.micinf.2010.09.005.
129. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science; 2015.
130. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9(2):112–124; doi: 10.1038/nrm2330.
131. Sarmiento MJ, Llorente A, Petan T, et al. The expanding organelle lipidomes: current knowledge and challenges. *Cell Mol Life Sci* 2023;80(8):237; doi: 10.1007/s00018-023-04889-3.
132. Casares D, Escribá P V, Rosselló CA. Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues. *Int J Mol Sci* 2019;20(9); doi: 10.3390/ijms20092167.
133. Iaea DB, Maxfield FR. Cholesterol trafficking and distribution. *Essays Biochem* 2015;57:43–55; doi: 10.1042/bse0570043.
134. Herrera-Moro Huitron L, De Jesús-González LA, Martínez-Castillo M, et al. Multifaceted Nature of Lipid Droplets in Viral Interactions and Pathogenesis. *Microorganisms* 2023;11(7); doi: 10.3390/microorganisms11071851.
135. Zhang C, Liu P. The lipid droplet: A conserved cellular organelle. *Protein Cell* 2017;8(11):796–800; doi: 10.1007/s13238-017-0467-6.
136. Anselmo S, Bonaccorso E, Gangemi C, et al. Lipid Rafts in Signalling, Diseases, and Infections: What Can Be Learned from Fluorescence Techniques?

- Membranes (Basel) 2025;15(1); doi: 10.3390/membranes15010006.
137. Harrison SC. Mechanism of membrane fusion by viral envelope proteins. *Adv Virus Res* 2005;64:231–261; doi: 10.1016/S0065-3527(05)64007-9.
  138. Navaratnarajah CK, Warriar R, Kuhn RJ. Assembly of Viruses: Enveloped Particles. *Encycl Virol* 2008;193–200; doi: 10.1016/B978-012374410-4.00667-1.
  139. Pletan ML, Tsai B. Non-enveloped virus membrane penetration: New advances leading to new insights. *PLoS Pathog* 2022;18(12):e1010948; doi: 10.1371/journal.ppat.1010948.
  140. Owusu IA, Quaye O, Passalacqua KD, et al. Egress of non-enveloped enteric RNA viruses. *J Gen Virol* 2021;102(3); doi: 10.1099/jgv.0.001557.
  141. Charman M, Weitzman MD. Replication Compartments of DNA Viruses in the Nucleus: Location, Location, Location. *Viruses* 2020;12(2); doi: 10.3390/v12020151.
  142. Miller S, Krijnse-Locker J. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol* 2008;6(5):363–374; doi: 10.1038/nrmicro1890.
  143. Chan YHM, Boxer SG. Model membrane systems and their applications. *Curr Opin Chem Biol* 2007;11(6):581–587; doi: 10.1016/j.cbpa.2007.09.020.
  144. Mardešić I, Boban Z, Subczynski WK, et al. Membrane Models and Experiments Suitable for Studies of the Cholesterol Bilayer Domains. *Membranes (Basel)* 2023;13(3); doi: 10.3390/membranes13030320.
  145. Leung SSW, Brewer J, Bagatolli LA, et al. Measuring molecular order for lipid membrane phase studies: Linear relationship between Laurdan generalized polarization and deuterium NMR order parameter. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2019;1861(12):183053; doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.183053>.
  146. Morales-Pennington NF, Wu J, Farkas ER, et al. GUV preparation and imaging: minimizing artifacts. *Biochim Biophys Acta* 2010;1798(7):1324–1332; doi: 10.1016/j.bbamem.2010.03.011.
  147. Orlikowska-Rzeznik H, Krok E, Chattopadhyay M, et al. Laurdan Discerns Lipid Membrane Hydration and Cholesterol Content. *J Phys Chem B* 2023;127(15):3382–3391; doi: 10.1021/acs.jpcc.3c00654.
  148. Højgaard Hansen A, Sørensen K, Mathieu R, et al. Propofol modulates the lipid phase transition and localizes near the headgroup of membranes. *Chem Phys Lipids* 2013;175; doi: 10.1016/j.chemphyslip.2013.08.002.
  149. Bartelds R, Barnoud J, Boersma AJ, et al. Lipid phase separation in the presence of hydrocarbons in giant unilamellar vesicles. *AIMS Biophys* 2017;4(4):528–542; doi: 10.3934/biophys.2017.4.528.
  150. DiPasquale M, Nguyen MHL, Rickeard BW, et al. The antioxidant vitamin E as a membrane raft modulator: Tocopherols do not abolish lipid domains. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2020;1862(8):183189; doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183189>.
  151. Maxfield FR, Wüstner D. Analysis of cholesterol trafficking with fluorescent probes. *Methods Cell Biol* 2012;108:367–393; doi: 10.1016/B978-0-12-386487-1.00017-1.
  152. Hossain KR, Alghalayini A, Valenzuela SM. Current Challenges and Opportunities for Improved Cannabidiol Solubility. *Int J Mol Sci* 2023;24(19); doi:

- 10.3390/ijms241914514.
153. Kosović E, Sýkora D, Kuchař M. Stability Study of Cannabidiol in the Form of Solid Powder and Sunflower Oil Solution. *Pharmaceutics* 2021;13(3); doi: 10.3390/pharmaceutics13030412.
  154. Millar SA, Stone NL, Yates AS, et al. A Systematic Review on the Pharmacokinetics of Cannabidiol in Humans. *Front Pharmacol* 2018;9:1365; doi: 10.3389/fphar.2018.01365.
  155. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)* 2011;3(3):1377–1397; doi: 10.3390/polym3031377.
  156. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, et al. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *J Control Release* 2012;161(2):505–522; doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043>.
  157. Cunha A, Gaubert A, Latxague L, et al. PLGA-Based Nanoparticles for Neuroprotective Drug Delivery in Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceutics* 2021;13(7); doi: 10.3390/pharmaceutics13071042.
  158. Yasamineh S, Kalajahi HG, Yasamineh P, et al. An overview on nanoparticle-based strategies to fight viral infections with a focus on COVID-19. *J Nanobiotechnology* 2022;20(1):440; doi: 10.1186/s12951-022-01625-0.
  159. Rezvantalab S, Drude NI, Moraveji MK, et al. PLGA-based nanoparticles in cancer treatment. *Front Pharmacol* 2018;9(NOV):1–19; doi: 10.3389/fphar.2018.01260.
  160. Pinto M, Silva V, Barreiro S, et al. Brain drug delivery and neurodegenerative diseases: Polymeric PLGA-based nanoparticles as a forefront platform. *Ageing Res Rev* 2022;79:101658; doi: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101658>.
  161. Gao S, Sui Z, Jiang Q, et al. Functional Evaluation of Niosomes Utilizing Surfactants in Nanomedicine Applications. *Int J Nanomedicine* 2024;19:10283–10305; doi: 10.2147/IJN.S480639.
  162. Ge X, Wei M, He S, et al. Advances of Non-Ionic Surfactant Vesicles (Niosomes) and Their Application in Drug Delivery. *Pharmaceutics* 2019;11(2); doi: 10.3390/pharmaceutics11020055.
  163. Lens M. Niosomes as Vesicular Nanocarriers in Cosmetics: Characterisation, Development and Efficacy. *Pharmaceutics* 2025;17(3); doi: 10.3390/pharmaceutics17030287.
  164. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J Control Release* 2016;235:337–351; doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.
  165. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* 2018;10(2); doi: 10.3390/pharmaceutics10020057.
  166. Prabhu S, Murugan K. Zeta potential measurements in colloidal suspensions. *Int Conf Syst Sci Control Commun Eng Technol* 2015;221–224.
  167. Park J-K, Utsumi T, Seo Y-E, et al. Cellular distribution of injected PLGA-nanoparticles in the liver. *Nanomedicine* 2016;12(5):1365–1374; doi: 10.1016/j.nano.2016.01.013.
  168. Cartiera MS, Johnson KM, Rajendran V, et al. The uptake and intracellular fate of PLGA nanoparticles in epithelial cells. *Biomaterials* 2009;30(14):2790–2798; doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.01.057.

169. Obeid MA, Haifawi S, Khadra I. The impact of solvent selection on the characteristics of niosome nanoparticles prepared by microfluidic mixing. *Int J Pharm X* 2023;5:100168; doi: 10.1016/j.ijpx.2023.100168.
170. Hoo C, Starostin N, West P, et al. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distribution. *J Nanoparticle Res* 2008;10:89–96; doi: 10.1007/s11051-008-9435-7.
171. Torti MF, Giovannoni F, Quintana FJ, et al. The Aryl Hydrocarbon Receptor as a Modulator of Anti-Viral Immunity. *Front Immunol* 2021;12:624293; doi: 10.3389/fimmu.2021.624293.
172. Pastorková B, Vrzalová A, Bachleda P, et al. Hydroxystilbenes and methoxystilbenes activate human aryl hydrocarbon receptor and induce CYP1A genes in human hepatoma cells and human hepatocytes. *Food Chem Toxicol* 2017;103:122–132; doi: 10.1016/j.fct.2017.03.008.
173. Chen H, Gou X, Mao Y, et al. PARP7 Inhibitors and AHR Agonists Act Synergistically across a Wide Range of Cancer Models. *Mol Cancer Ther* 2025;24(1):56–68; doi: 10.1158/1535-7163.MCT-24-0211.
174. Kober C, Roewe J, Schmees N, et al. Targeting the aryl hydrocarbon receptor (AhR) with BAY 2416964: a selective small molecule inhibitor for cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer* 2023;11(11):e007495; doi: 10.1136/jitc-2023-007495.
175. Crosio MA, Vico R V, Wilke N. Chapter Four - Giant Unilamellar Vesicles (GUVs): A Key Tool for the Study of Biophysical Properties of Membranes. (Iglič A, Rappolt M, Losada-Pérez PBT-A in B and LS-A. eds) Academic Press; 2024; pp. 55–65; doi: <https://doi.org/10.1016/bs.abl.2024.10.005>.
176. Wang HY, Bharti D, Levental I. Membrane Heterogeneity Beyond the Plasma Membrane. *Front Cell Dev Biol* 2020;8(November); doi: 10.3389/fcell.2020.580814.
177. Maier A-M, Huth K, Alessandrini F, et al. The aryl hydrocarbon receptor regulates lipid mediator production in alveolar macrophages. *Front Immunol* 2023;14:1157373; doi: 10.3389/fimmu.2023.1157373.
178. Alexander DL, Ganem LG, Fernandez-Salguero P, et al. Aryl-hydrocarbon receptor is an inhibitory regulator of lipid synthesis and of commitment to adipogenesis. *J Cell Sci* 1998;111 ( Pt 22):3311–3322; doi: 10.1242/jcs.111.22.3311.
179. Zheng W, Liu M, Lv X, et al. AhR governs lipid metabolism: the role of gut microbiota. *Front Microbiol* 2025;16(January); doi: 10.3389/fmicb.2025.1442282.
180. Nguyen LP, Bradfield CA. The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem Res Toxicol* 2008;21(1):102–116; doi: 10.1021/tx7001965.
181. Tanos R, Patel RD, Murray IA, et al. Aryl hydrocarbon receptor regulates the cholesterol biosynthetic pathway in a dioxin response element-independent manner. *Hepatology* 2012;55(6):1994–2004; doi: 10.1002/hep.25571.