

**Estudio de la Actividad Citotóxica y Antiviral sobre el Virus del Dengue de Extractos de
algunas Especies de Plantas de Colombia**

Aura Judit Cuadros Martínez

**Trabajo de grado para optar el título de
Magister en Ciencias Básicas Biomédicas**

Directora

Raquel E. Ocazonez J.

PhD.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Departamento de Ciencias Básicas

Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

Bucaramanga

Noviembre, 2019

Tabla de contenido

	Pág.
Introducción	11
1. Objetivos.....	15
1.1 Objetivo General	15
1.2 Objetivos Específicos.....	15
2. Marco Referencial	16
2.1 VDEN	16
2.2 Respuesta inmune y base inmunológica de la patogénesis del Dengue.....	20
2.3 Descubrimiento de medicamentos para el Dengue	21
2.3.1 Inhibidores sintéticos.	22
2.3.2 Extractos de plantas.	23
3. Materiales y Métodos	29
3.1 Materiales.....	29
3.1.1 Plantas.	29
3.1.2 Extractos.	29
3.1.3 VDEN.	30
3.1.4 Células.....	30
3.2 Diseño metodológico	31
3.3 Evaluación de actividades biológicas	32
3.3.1 Citotoxicidad.....	32

3.4 Actividad antiviral	33
3.4.1 Ensayo de la protección de la infección viral.	33
3.4.2. Ensayo de reducción de proteína viral NS1 y quimioquinas.	34
3.4.4 Modo de acción antiviral.	35
3.5 Análisis de datos	36
3.5.1 Citotoxicidad.....	36
3.5.2 Antiviral- Ensayo de protección.	37
3.5.3 Antiviral - Ensayo de reducción de proteína viral NS1 y quimioquinas.	37
3.5.4 Definición del extracto punto de partida.....	37
3.6 Consideraciones éticas	38
4. Resultados	39
4.1 Citotoxicidad.....	40
4.1.1 Algoritmo de la actividad citotóxica.....	44
4.1.2 Perfiles de citotoxicidad.....	45
4.2 Actividad antiviral	46
4.3 Modo de acción antiviral	51
5. Discusión.....	52
6. Conclusiones	58
Referencias Bibliográficas	60

Lista de Tablas

Tabla 1. Inhibidores sintéticos con actividad anti-VDEN	23
Tabla 2. Plantas seleccionadas para el estudio	30
Tabla 3. Valores de CC ₅₀ de ensayos del MTT: tratamiento antes de sembrar las células en el soporte	41
Tabla 4. Valores de CC ₅₀ de ensayos del MTT: tratamiento después de sembrar las células en el soporte	41
Tabla 5. Actividad antiviral de extractos sobre serotipos del VDEN evaluada en dos ensayos Distintos	50
Tabla 6. Efecto de <i>A. aff popayanensis</i> sobre la producción de quimioquinas por hepatocitos humanos infectados con VDEN-1	51

Listado de Figuras

Figura 1. Diseño metodológico del estudio	32
Figura 2. Curvas dosis-respuesta representativas obtenidas en los ensayos de MTT	40
Figura 3. Susceptibilidad de la célula a tratamiento con extracto según curva dosis respuesta	43
Figura 4. Susceptibilidad de la célula a tratamiento con extracto según rango de la CC ₅₀	44
Figura 5. Perfil de citotoxicidad de los extractos	46
Figura 6. Actividad antiviral de extractos evaluada en ensayos de protección	47
Figura 7. Actividad antiviral de los extractos sobre serotipos del virus evaluada en el ensayo de reducción de NS1	49
Figura 8. Modo de acción antiviral de <i>A. aff. popayanensis</i> evaluado en cultivos de células HEPG-2	51

Resumen

Título: Estudio de la actividad citotóxica y antiviral sobre el virus del dengue de extractos de algunas especies de plantas de Colombia*

Autor: Aura Judit Cuadros Martínez**

Palabras Clave: Dengue, Extractos, Antiviral, Citoquinas, Serotipo.

Descripción:

No hay medicamentos efectivos para el tratamiento del dengue a pesar de haberse descubierto numerosos inhibidores sintéticos. Como consecuencia, se requiere investigar en medicamentos de base natural y el punto de partida debe ser la identificación de plantas apropiadas. En Colombia varias plantas se utilizan para aliviar síntomas de dengue, pero no existe evidencia científica de su efecto.

Para este trabajo se seleccionaron 18 plantas. El extracto de cada planta se analizó para citotoxicidad y efecto antiviral *in vitro*, usando los ensayos del MTT, protección contra la infección viral y reducción de proteína viral (NS1) & quimioquinas (IL-8 y RANTES). El modo de acción antiviral del extracto más activo se evaluó en experimentos de adición en el tiempo. Los extractos se agruparon de acuerdo a la citotoxicidad usando una estrategia algorítmica. Los extractos menos citotóxicos en orden descendente fueron (CI en paréntesis): *Lippia americana* (7.2) < *Achyrocline satureioides* (6.8) < *Lippia micromera* (6.7), los extractos más citotóxicos fueron: *Cordia curassavica* (3.1) < *Piper subflavum* var. *Espejuelanum* < *Piper dilatifolium* (4.2).

Los extractos de *Aristolochia anguicida* y *Ageratina aff popayanensis* presentaron el mayor efecto antiviral: a 30 µg/mL protegieron contra infección por VDEN-1 (51%) y VDEN-2 (29%) en células Vero; y redujeron NS1-VDEN-1 producida en células HEPG-2 a CI₅₀ de 53 y 41 µg/mL con índices de selectividad de 5.0 y 7.9, respectivamente. El de *A. aff popayenensis* redujo RANTES e IL-8 en > 90%. Los resultados de los ensayos de adición en el tiempo sugieren que este extracto podría afectar etapas tempranas del ciclo viral. En conclusión, *A. aff popayenensis* y *A. anguicida* podrían servir como punto de partida en investigación orientada al descubrimiento de un fitoquímico o un remedio natural para tratamiento del dengue.

*Trabajo de grado

**Facultad de Salud. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director: Raquel E. Ocazonez PhD.

Abstrac

Title: Study of cytotoxic activity and antiviral on dengue virus from some plants extracts from Colombia*

Author: Aura Judit Cuadros Martínez**

Key Words: Dengue, Extract, Antiviral, Cytokines, Serotype.

Description:

There are not effective drugs available to treatment of dengue despite numerous synthetic antiviral agents discovered. Consequently, the plant-based drug discovery is required and the starting point should be identification of the right candidate plants. In Colombia, plants are used to alleviate dengue symptoms, but there is no scientific evidence of their effects.

For this work 18 plants were selected. Plant extracts were analyzed for cytotoxicity and antiviral effect *in vitro* by using the MTT, protection against viral infection, and NS1 protein & chemokines (IL-8 and RANTES) reduction assays. The mode of antiviral action was evaluated in time-addition experiments. The extracts were grouped in accordance with their cytotoxicity by using an algorithm-based approach.

The extracts less cytotoxic in descending order were (IC in parentheses): *Lippia americana* (7.2) < *Achyrocline satureioides* (6.8) < *Lippia micromera* (6.7); the extracts more cytotoxic were: *Cordia curassavica* (3.1) < *Piper subflavum* var. *Espejuelanum* < *Piper dilatifolium* (4.2). Extracts from *Aristolochia anguicida* and *Ageratina aff popayanensis* revealed the most antiviral effect: at 30 µg/mL, they protected Vero cells against infection by VDEN-1 (51%) and VDEN-2 (29%); and reduced VDEN-1-NS1 protein produced in HEPG-2 cells at IC₅₀ of 53 and 41 µg/mL with selectivity indexes of 5.0 and 7.9, respectively. Extract from *A. aff popayanensis* reduced RANTES and IL-8 by > 90%. Results of time-in-addition experiments suggest that this EXTRACTO could affect early stages of the viral cycle. In conclusion, Extracts from *A. aff popayanensis* and *A. anguicida* could serve as starting points in research focus on discovery of a phytochemical or natural medicine for treatment of dengue.

*Bachelor degree

**Facultad de Salud. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Directora: Raquel E. Ocazonez PhD.

Introducción

El dengue es causado por el virus del mismo nombre (VDEN-) y es una enfermedad problema en la salud pública de regiones tropicales y subtropicales. Se ha estimado que 3.97 billones de personas en 128 países están en riesgo de infección por el virus (*Brady et al., 2012; WHO, 2015*). Probablemente 390 millones de infecciones cada año, de los cuales 96 millones presentan manifestaciones clínicas, algunas correspondientes a dengue severo (*Bhatt et al., 2013; Castro, Wilson y Bloom, 2017; WHO, 2015*). En 2016 se reportaron 244.8 casos por cada 100.000 habitantes en países de las Américas, del total de los casos reportados 4274 corresponden a dengue severo y 1032 a muertes (*PAHO-WHO, 2017*). El impacto económico que causa el dengue es notorio. Shepard y colaboradores en el 2011, estimaron que en América el costo aproximado en servicios de salud fue de US\$ 2,1 billones de dólares por año (*Guzmán y Harris, 2015*).

Hoy día el tratamiento del dengue es paliativo. En pacientes que pueden ser manejados ambulatoriamente se recomienda reposo en cama, ingesta de líquidos en abundante cantidad y se administra antipiréticos. En pacientes hospitalizados el tratamiento está enfocado al manejo de síntomas generales, la prevención y manejo del choque hipovolémico con aporte de líquidos (*WHO, 2012*). El tratamiento es insuficiente para el manejo de las formas graves del dengue y para

prevenir que las leves progresen a esta condición. En consecuencia, las fatalidades en dengue y el alto costo para el sector salud se deben en gran parte a la carencia de medicamentos eficaces.

El uso casero de preparados de plantas y medicamentos naturales aún es una opción de tratamiento de enfermedades humanas en países con mercados emergentes y ha crecido en países con economías avanzadas (*Dutra, Campos, Santos y Calixto, 2016; Manju, Jat y Anju, 2017*). Hoy día, en varios países cerca del 70 -95% de la población depende de la medicina tradicional para la atención primaria en salud (*Gyasi, Mensah, y Siaw, 2015; Yuan, Ma, Ye y Piao, 2016*). El interés por dirigir el descubrimiento de fármacos basado en productos derivados de plantas medicinales ha aumentado en consideración a que por siglos las plantas se han usado para curar diversas enfermedades humanas (*Dutra, Campos, Santos y Calixto, 2016; Swamy y Sinniah, 2015*). Los extractos de plantas han sido usados para obtener principios activos y elaborar medicamentos, ellos contienen una amplia variedad de compuestos que pueden afectar negativamente el ciclo de vida de un patógeno y proteger al hospedero fortaleciendo el sistema inmune (*Ghasemian, Owlia y Owlia, 2016; Kumar Sarangi y Padhi, 2014*).

En Colombia el dengue es un problema prioritario de salud pública, la tasa de incidencia se incrementó de 5.2 por cada 100.000 habitantes en la década de los años 90 (1990- 1999) a 18.1 por cada 100.000 habitantes en los últimos 5 años (*INS, 2016*). En 2016 la incidencia a nivel nacional fue de 366 casos por cada 100.000 habitantes, del total de casos reportados 956 corresponden a dengue severo y 253 a muertes confirmadas (*INS- DVARSP, 2016*). El costo al sector salud que causa el dengue es notorio, para 2011 se estimó entre US\$ 52 - 61 millones de dólares en dengue y US\$ 16.9 millones en servicios de salud; para 2014 US\$ 85.63 por paciente

de consulta externa y US\$ 793.16 por hospitalización (*Castañeda et al., 2012; Rodríguez, Galera-Gelvez, Yescas y Rueda-Gallardo, 2015*).

El uso casero de preparados de plantas para tratar los síntomas del dengue es frecuente en Colombia. Sin embargo, no existe información suficiente concerniente al potencial farmacológico de las plantas. Se han realizado estudios preliminares con extractos y aceites esenciales de no más de seis especies sobre *flavivirus* como el VDEN y el Virus de la Fiebre Amarilla (*Gómez-Calderón et al., 2017; Hernández-Castro, Diaz-Castillo y Martínez-Gutierrez, 2015; Meneses, Ocazonez, Martínez y Stashenko, 2009a; Ocazonez, Meneses, Torres, y Stashenko, 2010*). En estos estudios los extractos se analizaron contra un solo serotipo del VDEN, en células animales y no humanas blanco de la infección viral y su modo de acción no se estudió.

En Colombia hasta el 2015 se han reconocido 2,404 especies de uso medicinal de las cuales 1,656 son nativas del Neotrópico, y de estas 214 son endémicas de Colombia (*Bernal et al., 2011*). En el *Vademécum de Plantas Medicinales de Colombia 2008* se registra el uso medicinal de solo 127 especies, de las cuales 38 son nativas correspondiendo al 30% de las especies registradas (*Bernal et al., 2011; Lozano et al., 2010; Ministerio de salud y protección social, 2008*). Se estima que el Sistema General de Seguridad Social podría disminuir en 7.5% el costo actual de medicamentos convencionales si reemplaza algunos por medicamentos naturales producidos en el país. Por ejemplo, el tratamiento con ibuprofeno de enfermedades febriles agudas semejantes al dengue, ocasiona un gasto anual de \$7.168.746.060 y se ha calculado que podría reducirse a \$3.584.373 si se introdujese el tratamiento con la corteza seca de *Maytenus laevis* (*Bernal et al., 2011*).

Este trabajo fue motivado por la carencia de estudios científicos sobre el potencial farmacológico para el dengue de plantas medicinales de Colombia. La pregunta fue: ¿El extracto de plantas aromáticas y medicinales de Colombia posee propiedades biológicas como fuente primaria para el descubrimiento de medicamentos para el dengue? Para dar respuesta a esta pregunta, se incluyeron 18 especies y se evaluaron la citotoxicidad y efecto antiviral del extracto usando ensayos basados en células de hígado humano y de mono. Se usó una estrategia estratificada para identificar el extracto menos toxico y con mayor efecto inhibitorio de la replicación del virus. El trabajo estuvo anidado al proyecto # 4 del programa sobre plantas aromáticas y medicinales de Colombia que desarrolla actualmente la Unión Temporal BioRed & Colciencias & CENIVAM. El proyecto # 4 está siendo ejecutado por el grupo de arbovirus del CINTROP – UIS.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Estudiar la actividad citotóxica y antiviral de extractos de algunas plantas medicinales crecidas en Colombia, para identificar especies que sirvan como puntos de partida en investigación orientada al descubrimiento de medicamentos para el dengue.

1.2 Objetivos Específicos

- Diseñar una estrategia algorítmica para agrupar extractos con base en el grado de citotoxicidad.
- Seleccionar el extracto con la mayor actividad inhibitoria de la replicación *in vitro* del VDEN.
- Determinar el modo de acción antiviral del extracto más activo

2. Marco Referencial

2.1 VDEN

El VDEN pertenece a la familia Flaviviridae, genero *Flavivirus*. Es un virus ARN de cadena simple con polaridad positiva de aproximadamente 11 kb. La partícula tiene forma esférica con tamaño aproximado de 50 nm y posee una envoltura lipídica derivada de la membrana celular del hospedero (*Halstead, 2008*). El genoma viral codifica para una poliproteína que es fragmentada por proteasas virales y celulares originando diez proteínas en este orden: 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'. Las tres primeras (C, prM y E) se conocen como estructurales porque conforman la partícula viral y los siete restantes no-estructurales (NS siglas en inglés) porque se detectan solo en la célula infectada. El virus existe como cuatro serotipos (VDEN -1, VDEN-2, VDEN-3 y VDEN-4) y cada uno puede causar enfermedad leve o severa

Se describen a continuación las funciones más reconocidas de las proteínas estructurales (*Kuhn et al., 2002*). Agrupaciones de la proteína C conforman la cápside icosaédrica donde se encuentra el ARN. La proteína E es una glicoproteína presente en la envoltura viral, mediando la fusión con la membrana de la célula hospedera, considerándose por esto el receptor para adsorción y penetración del virus; además, induce la formación de anticuerpos que protegen de la infección

viral (neutralizantes e inhibidores de la hemaglutinación) y anticuerpos amplificadores que sirven como puente para la penetración del virus al interior de la célula. La proteína prM (precursor de la proteína M) protege a la proteína E del pH ácido del fagosoma durante la maduración viral evitando su cambio conformacional que afecte la función de la proteína.

Con respecto a las funciones de las proteínas NS estas se resumen a continuación. NS1 participa en la replicación del virus, maduración de la partícula viral y activación del sistema inmune innato; NS2A participa en la replicación del ARN genómico que se utiliza como plantilla para generar los intermediarios replicativos y se asocia con la proteína C para el ensamblaje del virión. NS2B se ancla a la membrana del retículo endoplásmico y actúa como cofactor de la proteína NS3. NS3 es una enzima con funciones de helicasa y proteasa; NS4A y NS4B, forman un andamio para el complejo de replicación del virus. NS5 es la RNA polimerasa del virus (*Bollati et al., 2010*).

El VDENV es introducido en la epidermis mediante picadura de un mosquito infectado, donde es fagocitado por células de Langerhans (células dendríticas epidermales) y queratinocitos. (*Limon-Flores et al., 2005*). El virus se disemina dentro de estas células infectadas o como partícula libre a través del sistema linfático y el torrente sanguíneo. Como resultado, se obtiene una población de células infectadas de linaje mononuclear como monocitos, células dendríticas (CD) mieloides y macrófagos de hígado y bazo (*Martina, Koraka, y Osterhaus, 2009*).

El ciclo replicativo inicia con la entrada del virus a la célula: inicialmente hay un acercamiento sobre la superficie, luego la proteína E del virus y el receptor celular (LAMR1,

ICAM-3, DC-SIGN y heparan sulfato entre otros) interactúan seguido de la endocitosis del virus (*Allison et al., 1995; Germi et al., 2002; Lindenbach y Rice, 2003; Nelson et al., 2008; Tassaneetrithep et al., 2003; Tio y Cardosa., 2005*). La vesícula endocítica se transforma en un endosoma que se fusiona con un lisosoma acidificando el pH de la vesícula. El cambio de pH induce los cambios de conformación de la proteína E, favoreciendo la exposición y el anclaje inmediato del péptido de fusión a la membrana de la vesícula que conlleva a la liberación de la nucleocápside en el citoplasma (*Diamond, Edgil, Roberts, Lu y Harris, 2000*). La presencia de la nucleocápside en el citoplasma da inicio a los procesos de traducción y replicación del ARN (*Qi, Zhang, y Chi, 2008*). El genoma se utiliza directamente como ARN mensajero, con un único marco de lectura abierto que es traducido dando una poliproteína.

Tanto la traducción como la replicación del genoma ocurren en estrecha asociación a membranas y vesículas derivadas del retículo endoplasmático. La poliproteína es fragmentada co- y post-traduccionamente por proteasas virales y celulares en las 10 proteínas del virus (*Lindenbach y Rice, 2003*). Luego de la traducción y del correcto plegamiento de las proteínas individuales, se lleva a cabo la replicación del genoma con participación de las proteínas NS (*Rodenhuis-Zybert, Wilschut, y Smit, 2010*). La replicación comienza con la síntesis de una cadena de ARN de polaridad negativa y ésta a su vez sirve como molde para la síntesis de moléculas de ARN de polaridad positiva que constituyen el genoma viral. El proceso de ensamblaje del virión comienza con la formación de la nucleocápside por interacción del ARN genómico y la proteína C en presencia de pequeñas gotas de lípidos (*Samsa et al., 2009*). Sobre esta estructura se asocian las proteínas prM/M y E que están ancladas a la membrana del retículo endoplásmico.

Posteriormente, suceden dos etapas de maduración de la partícula viral. Primero se organizan de forma heterodimérica las proteínas prM/M y E, en donde la primera recubre a la segunda. En el siguiente paso, esta partícula inmadura transita desde el retículo endoplásmico hasta el aparato de Golgi, donde se inicia la segunda etapa de maduración. Por último, un nuevo procesamiento proteolítico sobre la proteína prM/M por la proteasa furina, independiza el péptido pr y la proteína M. Esta nueva modificación estabiliza los homotrímeros de E y mantiene unido al péptido pr (*Velandia y Castellanos, 2011*). Finalmente, cuando el virus es liberado el pH neutro del espacio extracitoplásmico induce el desprendimiento del péptido pr y la proteína E adquiere la conformación final para interactuar con el receptor sobre la superficie de otra célula e iniciar un nuevo ciclo de replicación (*Urbanowski, Ilkow y Hobman, 2008*).

El VDEN se puede replicar *in vitro* en varias líneas celulares, las más utilizadas para evaluar la actividad antiviral de compuestos han sido Vero (células de riñón de mono) y C6/36 (células de mosquito) (*Idrees y Ashfaq, 2013; Talarico, 2008*), y con menor frecuencia BHK-21 (células riñón de hámster), LLC-MK2 (células riñón de mono), BSR (células riñón de hámster) (*Che, Wang y Li, 2009; Hidari, Abe y Suzuki, 2013*), HEK293 (células embrionarias de riñón humano) (*Shum et al., 2010*). Para estudiar la respuesta de citoquinas se usa el cultivo primario de mononucleares de sangre periférica (*Reis et al., 2008*), líneas celulares de linfocitos (*Lon, Liu y Jusko, 2012*) y células de hepatocitos humanos en particular la línea HEPG-2. Las células HEPG-2 son útiles debido a que secretan citoquinas y poseen varias de las características de la célula hepática normal (*De-Oliveira- Pinto et al., 2012; Gerets et al., 2012*).

2.2 Respuesta inmune y base inmunológica de la patogénesis del Dengue

La primera línea de defensa contra el VDEN en un individuo infectado es la inmunidad innata (*Green, Beatty, Hadjilaou y Harris, 2014*) Se incrementa la secreción del interferón (IFN) de tipo I (α y β) para contener la diseminación del virus; se activan por presentación antigénica células NK (natural killer) que reconocen y destruyen células infectadas y liberan IFN de tipo II (γ) y otras citoquinas resultando en la activación de la inmunidad específica de memoria o segunda línea de defensa.

La segunda línea de defensa contra la infección con el VDEN está constituida por la respuesta de linfocitos T, la cual desempeña un papel preponderante en el establecimiento de la respuesta protectora específica y de memoria. Tanto los linfocitos CD4⁺ como los CD8⁺ estimulados por diferentes citoquinas, como el IFN (tipo I y II) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), se activan y secretan diversos tipos de mediadores que amplifican la misma respuesta y la innata (*Oishi, Saito, Mapua y Natividad, 2007*).

La gravedad del cuadro clínico del dengue es producto de la interrelación de múltiples factores relacionados con el virus y el hospedero (*Whitehorn et al., 2014*). Existe evidencia bien sustentada que el tipo y nivel sérico de las citoquinas son determinantes de la gravedad. Altos niveles de IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18, TGF-1 β , TNF α , and IFN γ han sido encontradas en pacientes con dengue severo, observado en casos con incremento notorio de la permeabilidad vascular, la efusión pleural y la muerte (*Maneekean, Leaungwutiwong, Misse y Luplertlop, 2013; Martina, Koraka y Osterhaus, 2009; Rothman, 2011; Srikiatkachorn et al,*

2009). Otro mecanismo que se ha asociado al desarrollo de dengue grave, es la lisis de las células endoteliales, mediada por complemento y dependiente de anticuerpos, especialmente aquellos dirigidos contra NS1. Esta interacción activa el sistema de complemento que altera la permeabilidad vascular, induce la disfunción del tejido y lisis de las células endoteliales (Avirutnan *et al.*, 2007; Dalrymple y Mackow, 2012).

Otro grupo de moléculas que se expresan en exceso durante la infección con VDENV son las moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1, E, L y P-selectina, entre otras. Estas moléculas facilitan el reconocimiento, la unión y la posterior diapédesis de células como los monocitos, que atraviesan la barrera endotelial y circulan en los espacios intersticiales. Esto permite, por un lado, la propagación del virus a otras células y tejidos, y por otro, el paso de líquido y mediadores solubles que estimulan los procesos inflamatorios (Srikiatkhachorn *et al.*, 2009).

2.3 Descubrimiento de medicamentos para el Dengue

Estudios han reportado que la carga viral determina el curso clínico del dengue (Rodenhuis-Zybert Wilschut y Smit, 2010), originando la hipótesis de que el tratamiento con un antiviral en las primeras 48 -72 h de fiebre podría disminuir el riesgo de enfermedad severa (Lai, Lin y Hsieh, 2017; Low Ooi y Vasudevan, 2017). En la práctica, el tratamiento podría tener limitaciones: la mayoría de pacientes permanece en casa consumiendo antipiréticos de venta libre y/o remedios caseros y cuando recurren a la atención médica la viremia ha descendido marcadamente.

Se ha demostrado que el desenlace clínico del dengue depende de la respuesta inmune de defensa del hospedero. La producción de citoquinas es necesaria para activar las células de la inmunidad innata y específica llevando a la producción de anticuerpos que neutralizan el virus, de linfocitos que destruyen células infectadas y más citoquinas que robustecen y mantienen la respuesta (Guzmán, Gubler, Izquierdo, Martínez y Halstead, 2016). Desafortunadamente, en algunos casos esta respuesta es exacerbada contribuyendo al progreso hacia la forma clínica severa (Screaton, Mongkolsapaya, Yacoub, y Roberts, 2015). La contribución de la respuesta inmune exacerbada a la patogénesis del dengue llevo a considerar una estrategia de tratamiento.

Un medicamento ideal para tratamiento del dengue debería ser capaz de eliminar el virus, eficaz contra los cuatro serotipos, estable, seguro, barato de fabricar y fácil de formular. Desde finales de los años 50 se está investigando en medicamentos para el dengue: inhibidores del virus o inhibidores de procesos en el hospedero que favorecen la replicación del virus y agravan el cuadro clínico del dengue (Pan et al., 2010; Whitehorn et al., 2014).

2.3.1 Inhibidores sintéticos. Se han descubierto decenas de compuestos sintéticos que inhiben la actividad de proteínas virales que participan en cada etapa del ciclo viral, en su mayoría para la proteasa NS3 y la proteína NS1. Han resultado hepatotóxicos y sin eficacia terapéutica en ratones a pesar de tener potente actividad in vitro (H Nilar et al., 2016). Se han evaluado compuestos que inhiben proteínas celulares con diversas funciones, entre estas, péptidasa de señal, glucosidasas (α -glucosidasa), quinasas (c-Src y c-Yes) y mevalonato difosfato- decarboxilasa (Chan, Watanabe, Kavishna, Alonso y Vasudevan, 2015; Julander, Perry y Shresta, 2011; Lim et al., 2013; Noble et al., 2010). En la tabla 1 se encuentran ejemplos de antivirales sintéticos su

blanco de acción y modelo en el que fue evaluado. Los corticoides se han evaluado como inhibidores de la respuesta inmune exacerbada que conduce al incremento de la permeabilidad vascular. Los resultados hasta la fecha son controversiales debido a que su efecto no ha sido confirmado en todos los estudios (*Panpanich, Sornchai y Kanjanaratanakorn, 2006; Zhang y Kramer, 2014*). Los problemas con inhibidores celulares se relacionan con: alto costo de fabricación, la inhibición de un solo blanco celular en ocasiones no es suficiente para reducir la replicación viral y su intervención sobre proteínas que cumplen funciones importantes en el metabolismo celular puede producir efectos secundarios no deseados.

Tabla. 1

Inhibidores sintéticos con actividad anti- VDEN

Agente anti-VDEN	Blanco de acción	Modelo
Brequinar	Dihidroorotato dehidrogenasa	Cultivo celular
NITD203 (fármaco de NITD449)	Síntesis de ARN de VDEN	Ratón AG129
NITD449 (análogo de adenosina)	Síntesis de ARN de VDEN	Ratón AG129
Glutati6n	Inversi6n de la activaci6n del factor nuclear-κB	C6lulas HEPG-2
Palmatina	Inhibidor de proteasa	C6lulas Vero
β-D-2'-etinil-7-deaza-adenosina	Inhibidor de polimerasa	C6lulas HUH-7
WSS45	Infecci6n/ replicaci6n	C6lulas BHK
ETAR	Dehidrogenasa IMPDH	C6lulas VERO
IM18	Dehidrogenasa IMPDH	C6lulas VERO
Ácidos derivados de N-sulfonylantraniloco (BIP)(2)B	Inhibidor de polimerasa	Ensayos de RdRp
	Helicasa	Ensayo de helicasa

(BIP)(2)B, 1-N,4-N-bis [4-(1H-benzimidazol-2-yl)phenyl]benzene-1,4-dicarboxamide; ETAR, 1-b-d-ribofuranosyl-3-ethynyl-[1,2,4] triazole; IM18, 1-b-d-ribofuranosyl-4-ethynyl-[1,3] imidazole; IMPDH, inosine monophosphate dehydrogenase; RdRp, RNA-dependiente RNA polimerasa. Adaptado de: Julander, J. G., Perry, S. T., y Shresta, S. (2011). Important advances in the field of anti-dengue virus research. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 21(3), 105-116.

2.3.2 Extractos de plantas. En Colombia la investigaci6n del potencial farmacol6gico para el dengue en plantas est6 iniciando. Nuestro grupo ha realizado dos estudios anidados a los

proyectos generales de bioprospección del Centro de Excelencia CENIVAM. Los estudios se orientaron a identificar aceites esenciales con actividad antiviral *in vitro*, pero faltó profundizar en el modo y mecanismo de acción y ninguna muestra se evaluó en ratón. En el primer estudio se analizaron aceites esenciales de 13 especies *Lippia alba*, *Lippia origanoides* y *Lippia citradora* presentaron efecto virucidal sobre los cuatro serotipos del VDEN (Ocazonez, Meneses, Torres, y Stashenko, 2010). También resultaron activos sobre la Virus de la Fiebre Amarilla (Meneses, Ocazonez, Martínez y Stashenko, 2009a). Los aceites esenciales de *Hyptis suaveolens*, *Origanum vulgare*, *Tagetes lucida*, *Cordia cylindrostachya*, *Elettaria cardamomum* y *Ocimum tenuiflorum* L, presentaron actividad virucidal sobre el serotipo 2 del virus: redujeron el título de la progenie 90-75% a 100µg/mL pero no se hicieron ensayos dosis- respuesta para determinar su potencial actividad (Meneses, Ocazonez y Torres, 2009b).

Otros grupos de investigación del país han explorado el potencial farmacológico de plantas medicinales. Se encontraron dos reportes demostrando efecto inhibitorio *in vitro* de los extractos de *Tabernaemontana cymosa*, *Mammea americana* y *Cassia grandis*, plantas de la región Caribe (Gómez-Calderón *et al.*, 2017; Hernández-Castro, Diaz-Castillo y Martínez-Gutierrez, 2015;). De los extractos de las dos primeras especies se aislaron tres fotoquímicos: cumarinas, voacangina y lupelol acetato. Se demostró que las preparaciones crudas y los fotoquímicos inhibieron la progenie del virus producida en células de mono. En otro estudio se evaluó la actividad antiviral de la curcumina sintética (Padilla, Rodríguez, Gonzales, Gallego y Castaño, 2014), se demostró que interfiere con la replicación del virus y altera estructuras celulares necesarias para la producción de viriones. Los tres estudios se hicieron sobre un único serotipo del virus, no se evaluaron efectos adversos ni eficacia terapéutica.

A continuación, se describen algunos de estos trabajos sobre actividad anti-VDEN de extractos: efecto antiviral de *Alternanthera philoxeroides* (Lagunilla) se demostró en células de mosquito (C6/36). Los extractos de esta planta resultaron de baja toxicidad para la célula (Concentración Citotóxica 50 - CC_{50} = 535.9 $\mu\text{g/ml}$) e inhibieron la replicación del virus a concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) de 47.4 $\mu\text{g/ml}$ (Jiang, Luo, y Kuang, 2005). En otro estudio, extractos de *Uncaria tomentosa* (Uña de gato) fueron comparados (Reis et al., 2008). La actividad más eficaz se encontró con la fracción alcaloide que contenía oxindol pentacíclico a concentración de 1 $\mu\text{g/ mL}^{-1}$. El extracto hidroetanólico crudo mostró actividad antiviral a concentración de 10 $\mu\text{g/ ml}^{-1}$. En ambos casos, la actividad antiviral se observó por disminución de antígeno viral en monocitos.

El potencial inhibidor sobre el VDEN -2 del extracto acuoso de hojas de *Azidarachta indica* fue evaluado. Se observó total inhibición evidenciada por falta de efecto citopático a concentración no tóxica de 1.9 mg/ mL^{-1} (Parida, Upadhyay, Pandya y Jana, 2002). En otro estudio, las propiedades anti-VDEN del extracto de *Flagellaria indica* se investigó en células Vero. Los resultados exponen una CC_{50} de 312 $\mu\text{g/ mL}^{-1}$ y una acción antiviral del 45,52%, a una concentración de 12,5 $\mu\text{g/ ml}^{-1}$ del extracto en etanol. (Klawikkan, Nukoolkarn, Jirakanjanakit, Yoksan y Wiwat, 2010). El extracto diclorometano etanol de *Piper retrofractum* mostro actividad inhibitoria de 84,93% a concentración de 100 $\mu\text{g/ ml}^{-1}$ (Klawikkan, Nukoolkarn, Jirakanjanakit, Yoksan y Wiwat, 2010).

Otro que ha mostrado efecto inhibitorio sobre el VDEN-2 fue el extracto metanólico de *Quercus lusitánica*. Este inhibió TCID₅₀ entre 10-1.000 a concentración no tóxica de 0,25 mg/ ml⁻¹. Una dosis baja de este (0,032 mg/ ml⁻¹) mostró 100% de inhibición cuando se infectó la célula con TCID₅₀ de 10. (Muliawan, Kit, Devi, Hashim y Yusof, 2006). El extracto etanólico de *Rhizophora apiculata*, exhibió actividad entre 56,14% y 41.5 % a concentración de 12,5 µg/ ml⁻¹ y 100µg/ ml⁻¹ respectivamente (Klawikkan, Nukoolkarn, Jirakanjanakit, Yoksan y Wiwat, 2010). *Houttuynia cordata* presentó inhibición del 35,9% a concentración de 1,56 µg/ ml⁻¹. A 100µg/ml⁻¹ protege eficazmente las células de la entrada viral e inhibe la replicación del virus después de la adsorción. (Leardkamolkarn et al., 2012). El extracto de *Andrographis paniculada*, *Momordica charantia*, *Cymbopogon citratus* se examinaron sobre VDEN-1. Todos presentaron efecto inhibitorio sobre el virus a concentración entre 0.001 mg/ mL⁻¹ y 0,20 mg/ ml⁻¹ (Tang, Ling, Koh, Chye y Voon, 2012). También se han reportado baja actividad de extractos de *Cladogynos orientalis* a concentración de 12,5 µg/ml⁻¹ la actividad anti- VDEN-2 fue 34,8%. Además, a concentración de 100 µg/ml⁻¹ mostro una inhibición de 52,9%. (Klawikkan, Nukoolkarn, Jirakanjanakit, Yoksan y Wiwat, 2010). El extracto metanólico de *Ocimum sanctum* presentó un ligero efecto inhibidor sobre el virus (Tang, Ling, Koh, Chye y Voon, 2012).

Se han descubierto fitoquímicos que bloquean la actividad de proteasas virales en ensayos *in vitro*. Estos compuestos se aislaron de extractos obtenidos de una variedad amplia de especies que se usan en la medicina tradicional en países asiáticos (Teixeira et al., 2014). Entre los fitoquímicos con mayor actividad promisorio se reportan flavonoides, diterpenoides, β-carbolines, alcaloides, carragenatos, berberina baicaleina. Flavonoides como glabranine y 7-0-metil glabrabine extractoraídos de tres especies de *Tephrosia* han mostrado significativa actividad

antiviral sobre el VDEN (Sanchez, Gómez-Garibay, Taboada, y Ruiz, 2000). También Quercetin una bioflavonona mostro actividad antiviral sobre VDEN-2 en células Vero y C6/36. Sin embargo, no se conoce el tipo de acción sobre el virus (Zandi et al., 2012). El mismo compuesto extraído de *Carica papaya* mostro actividad antiviral por su gran afinidad de unión a la proteasa NS2B-NS3 al ser evaluada con herramientas bioinformáticas (Senthilvel et al., 2013). Aislamiento de nuevos flavanones de nombre chartaceones junto con pinocembrina fueron extraídos de *Cryptocarya chartacea*. Ensayos de reducción en placa revelaron que la flavanona dialquilada y chartaceones tienen efecto inhibitorio sobre la polimerasa viral NS5 (Kumar et al., 2012).

Con un compuesto derivado de *Gastrodia elata* (Bl) se evidenció que interfiere en la adsorción del VDEN-2 a la célula hospedero y sin producir efectos citotóxicos significantes. La ineficacia del compuesto después de la entrada del virus a la célula sugiere que es un inhibidor de entrada (Tong et al., 2010). Derivados de chalcona ciclohexenilo (4 hydroxy panduratin A y panduratin) de la planta *Boesenbergia rotunda* (L.) fueron potentes inhibidores competitivos de proteasa NS3 del VDEN- 2 (Kiat et al., 2006). También se ha demostrado la base molecular del efecto inhibidor de castanospermina / desoxinojirimicina (aislado a partir de hojas de *Morus multicaulis*). Este alcaloide puede alterar la interacción adecuada de las proteínas virales prM y E, crucial para el ensamblaje del virus. La castanospermina es eficaz contra todos los serotipos del dengue tanto *in vitro*, así como en ratones (Kumar et al., 2012).

Macrófagos humanos infectados con VDEN-2 y tratados con el extracto de *Hippophae rhamnoides* (Elaeagnaceae) presentaron disminución de TNF α e incremento de IFN γ , y paralelamente reducción del número de placa lo cual determinó su actividad antiviral (Jain et al.,

2008). En otro estudio la fracción alcaloide del extracto de *Uncaria tomentosa* presentó potencial anti viral e inhibió TNF- α , IFN- α e IL-10 en monocitos infectados con VDEN-2. Lo cual llevo a la conclusión de que la fracción alcaloide fue eficaz al reducir los niveles de citoquinas y la tasa de infección en monocitos (Reis *et al.*, 2008).

En resumen, diversos trabajos reportan la actividad anti-VDEN de preparaciones crudas y fracciones de extractos de plantas usadas en medicina tradicional en América Latina, Asia y Medio Oriente (Abubakr, Mandal y Sugato, 2013; Kumar *et al.*, 2012; Qadir *et al.*, 2015). Algunas preparaciones y combinaciones de estas presentaron actividad promisorio *in vitro* inhibiendo los cuatro serotipos a concentraciones < 30 μ g/mL. Sin embargo, la mayoría no fue evaluada en detalle para identificar el fitoquímico y su blanco de acción ni para conocer su eficacia terapéutica.

En los últimos años el estudio con el extracto de *Cissampelos pareira*, planta de la India, ha sido el más reconocido: se evaluó en ratones y resulto eficaz para reducir la viremia por los cuatro serotipos del virus y para reducir citoquinas que contribuyen a la gravedad del dengue; además, no indujo hepatotoxicidad en el animal (Sood *et al.*, 2015). Los extractos de dos especies del genero *Carica* fue evaluado en humanos (Beesetti, Khanna,y Swaminathan, 2014; Charan, Saxena, Goyal y Yasobant, 2016; Kasture, Nagabhushan y Kumar 2016): el tratamiento incremento significativamente el número de plaquetas pero no redujo síntomas ni tampoco redujo los días de estancia hospitalaria. A demás se ha estimado la eficacia terapéutica de combinación de fitoquimicos. La combinación de berberina - artemisia mitigó los síntomas del dengue según resultados de un estudio realizado en pacientes y lo mismo se encontró en otro estudio clínico con

la combinación de carragenato- artesunate (*Beesetti, Khanna, y Swaminathan, 2014*). Hasta la fecha ningún fitoquímico se ha usado para derivar un antiviral sintético.

3. Materiales y Métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Plantas. La tabla 2 lista las 18 especies de donde el extracto se obtuvo. La colecta estuvo a cargo de investigadores del CENIVAM (Universidad Industrial de Santander) en áreas rurales y semiurbanas de los departamentos de Santander, Valle del Cauca y Arauca. La identificación taxonómica la hizo el Prof. Dr. José Luis Fernández de la Universidad Nacional (Bogotá) y una muestra con voucher se depositó para referencia en el Herbario Nacional.

3.1.2 Extractos. Las muestras fueron suministradas por la *Prof. Dra. Elena Stashenko* del Centro de Biomoléculas de la Universidad Industrial de Santander. El extracto se obtuvo por fluido supercrítico como está descrito (*Stashenko, Jaramillo y Martínez, 2004*). De cada muestra se hizo una preparación concentrada (100.000µg/mL) en dimetilsulfóxido (DMSO), la cual se distribuyó en alícuotas que se almacenaron a -20°C. Para cada experimento se utilizó una alícuota de la misma preparación, codificada de forma tal que el experimentador desconocía el nombre de la planta.

Tabla 2

Plantas seleccionadas para el estudio.

Familia	Nombre científico	Voucher
Asteraceae	<i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC.	CO579420
Asteraceae	<i>Ageratina aff popayanesis</i> (Hieron.) R.M. King & H. Rob.	CO579422
Asteraceae	<i>Ambrosia peruviana</i> Willd.	CO579246
Aristolochiaceae	<i>Aristolochia anguicida</i> Jacq.	CO578352
Myrtaceae	<i>Calycolpus moritzianus</i> (O. Berg) Burret	CO578360
Boraginaceae	<i>Cordia curassavica</i> Jacq.	CO559446
Verbenaceae	<i>Lippia americana</i> L.	CO578970
Verbenaceae	<i>Lippia micromera</i> L.	CO578971
Verbenaceae	<i>Lippia origanoides</i> L.	*
Piperaceae	<i>Piper cumanense</i> Kunth	CO578977
Piperaceae	<i>Piper dilatatifolium</i> Rich.	CO578975
Piperaceae	<i>Piper eriopodon</i> (Miq.) C. DC.	CO578364
Piperaceae	<i>Piper peltatum</i> L.	*
Piperaceae	<i>Piper subflavum</i> var. <i>E.</i>	CO578976
Myrtaceae	<i>Psidium sartorianum</i> (O. Berg) Nied.	CO578359
Asteraceae	<i>Tagetes caracasana</i> L.	CO559441
Turneraceae	<i>Turnera diffusa</i> Will. Ex Schult.	CO578361
Asteraceae	<i>Wedelia calycina</i> Rich.	CO578353

*: Identificación incompleta por ausencia de parte reproductiva en el momento de colecta.

3.1.3 VDEN. Se usaron virus de referencia de dos serotipos: VDEN-1 (Hawaii) y VDEN-2 (Nueva Guinea). Los serotipos son los que con mayor frecuencia causan dengue severo (Balmaseda et al., 2006; San Martin et al., 2010). De cada uno se hizo una preparación de trabajo producida en células de *Aedes albopictus* (clon C6/36). El título viral (ufp/mL) de la preparación fue estimada en el ensayo de plaqueo (Ocazonez, Meneses, Torres, y Stashenko, 2010). La preparación viral se distribuyó en alícuotas las cuales se almacenaron a -80°C.

3.1.4 Células. Se usaron cuatro líneas celulares de la Colección del Laboratorio de Arbovirus del CINTROP: riñón humano HEK293: (ATCC ® CRL-1573™), riñón de primate VERO: (ATCC ® CCL-81™), hígado humano HEPG-2: (ATCC ® CRL-11997™) y piel de ratón

B16F10: (ATCC ® CRL-6475™). Las células son de órganos humanos y animales frecuentemente usados en análisis toxicológicos *in vivo* (Athar *et al.*, 2007; Lasagna-Reeves *et al.*, 2010; Sasaki *et al.*, 2002); se usan en el descubrimiento de medicamentos para VDEN (Talarico *et al.*, 2005) y secretan citoquinas pro inflamatorias como respuesta a la infección por el virus (Medin. *et al.*, 2006; Martina, Koraka y Osterhaus, 2009; De- Oliveira-Pinto *et al.*, 2012). Las células humanas: hígado y riñón se cultivaron en medio DMEM-F12 [GIBCO Co.] suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF [GIPCO Co.]) y antibiótico (P/E: Penicilina / Estreptomicina [Invitrogen Carlsbad, CA.]). Las células animales de riñón fueron cultivadas en medio MEM [GIBCO Co.] suplementado con 8% de SFB y P/E; y las de piel cultivadas en medio RPMI-1640 [GIBCO Co.] suplementado con 10% de SFB y P/E. Para cada línea celular se estableció previamente el tiempo de duplicación en 24 h como tiempo mínimo para formación de monocapa viable y confluyente 50-80% (Velandia, Flechas, Stashenko, Ocazionez, 2016).

3.2 Diseño metodológico

La figura 1 muestra el diseño metodológico utilizado para el estudio. Se midió la actividad citotóxica y antiviral de extractos de plantas medicinales. A 18 extractos de plantas se les evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Las curvas dosis- respuesta y CC₅₀ resultantes fueron utilizadas para jerarquizar la actividad citotóxica de los extractos. Luego fue identificada la actividad antiviral de 8 extractos con baja y media citotóxicidad mediante el ensayo de protección en célula renal de mono. A los extractos más activos se les determinó el modo de acción antiviral utilizando el ensayo de reducción de antígeno viral NS1 en célula hepática humana y de reducción de citoquinas pro-inflamatorias.

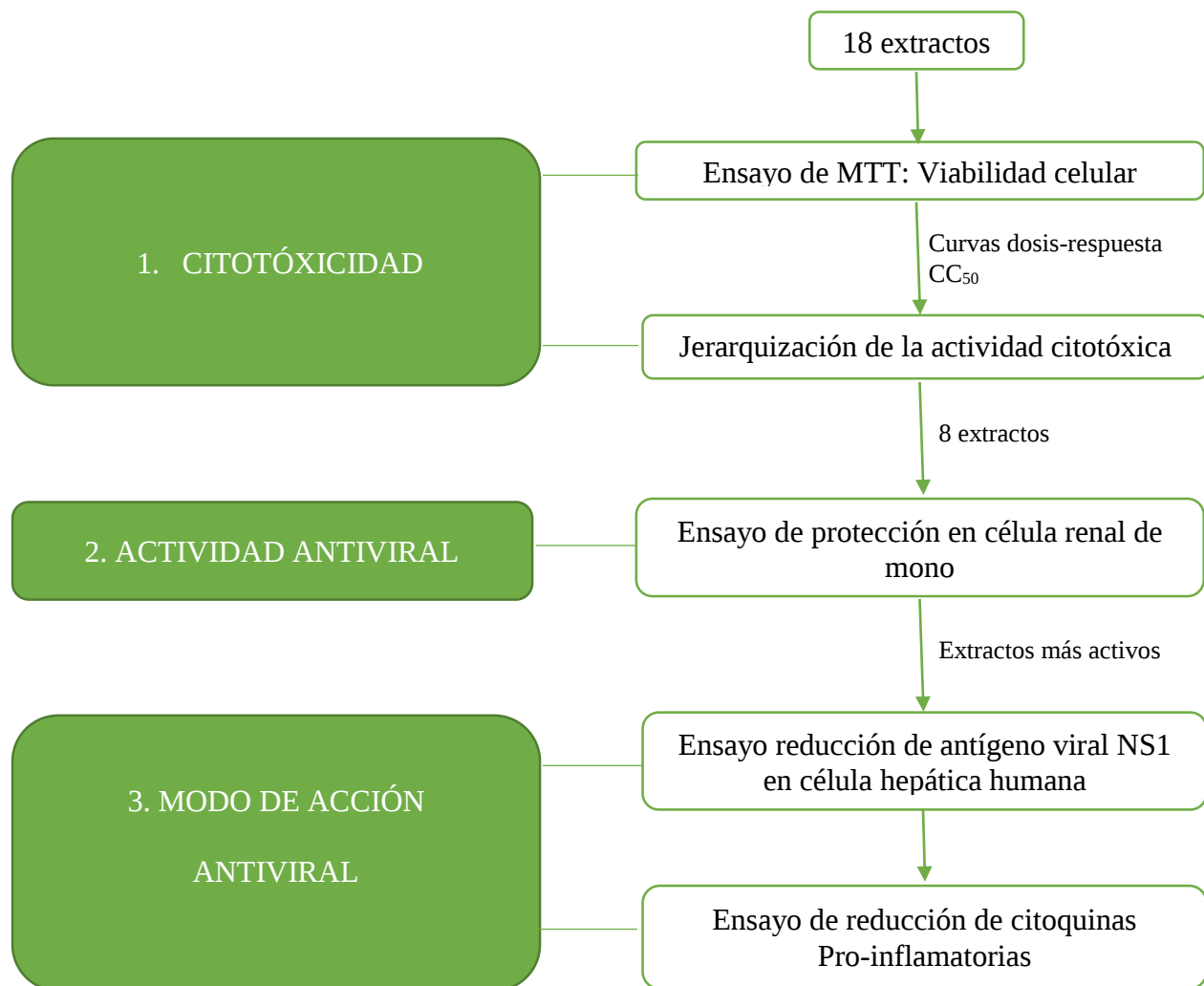


Figura 1. Diseño metodológico del estudio.

3.3 Evaluación de actividades biológicas

3.3.1 Citotoxicidad. 3.3.1.1 Tratamientos. Las células se sembraron en placas de 96 pozos y se expusieron a extractos en dos tiempos: antes de proliferar (tratamiento a), las células

(1×10^5 /mL) se sembraron en medio de cultivo que contenía extractos (50,100, 200,300,400 o 500 μ g/mL) y la placa se incubó a 37 °C por 72h.; después de proliferar (tratamiento d), las células se cultivaron en medio de cultivo sin extracto por 24 h a 37 °C, luego el medio se reemplazó por medio fresco que contenía extracto a las concentraciones mencionadas y la placa se incubó de nuevo a la misma temperatura hasta las 72h. En cada experimento se incluyeron células tratadas con DMSO y no-tratadas con extracto como controles. Cada extracto se analizó por triplicado en tres experimentos independientes.

3.3.1.2 Evaluación de la viabilidad celular. Se usó el método enzimático del MTT [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] siguiendo el protocolo publicado (Velandia, Flechas, Stashenko, Ocazonez, 2016). El medio de cultivo de células tratadas y no-tratadas con extracto se retiró, se adicionó MTT (20 μ L de una solución de 5 μ g/mL) en cada pozo y la placa se incubó 4 h a 37 °C. Luego se descartó el MTT y se adicionó dimetil-sulfóxido (100 μ L) para solubilizar los cristales de formazán. La intensidad del color de la reacción se determinó por espectrofotometría [Multiskan Go (Thermo Scientific)] a longitud de onda de 580 nm. El valor de densidad óptica se consideró proporcional a la viabilidad celular y se estimó referente a 100% de las células no tratadas (control). Los datos se analizaron como se describe en el aparte 3.5.1 Citotoxicidad.

3.4 Actividad antiviral

3.4.1 Ensayo de la protección de la infección viral. En este ensayo la actividad antiviral del extracto se interpreta como protección contra la muerte celular causada por la replicación del

virus. Se optimizó un protocolo usando como referencia el descrito por *Busschots, O'Toole, O'Leary y Stordal, 2015*. Brevemente, VDEN-1 o VDEN-2 (MOI: 0.1) diluidos en medio de cultivo que contenía extracto (10 y/o 30 µg/ mL) se adsorbió a monocapas de células VERO crecidas 24h antes en placas de 48 pozos. Las placas se incubaron 1h a 37°C, luego se retiró el extracto y se adiciono medio de cultivo fresco. La replicación del virus se permitió por 5 días a 37°C en atmosfera de CO₂-5% y después las células se tiñeron con colorante vital (200 µL/ pozo de cristal violeta al 1%). Cada muestra se evaluó por triplicado en dos ensayos independientes cada uno con controles: células infectadas/no-tratadas, células tratadas/no infectadas y células no infectadas/no tratadas. Ribavirina (100µM) se incluyó como antiviral de referencia. Las monocapas celulares teñidas se observaron al microscopio de luz corriente y se tomaron 6 fotografías al azar. El análisis de las fotografías se describe en el numeral 3.5.2 actividad antiviral.

3.4.2. Ensayo de reducción de proteína viral NS1 y quimioquinas. Se usaron células HEPG-2 (hepatocitos humanos) las cuales producen virus y secretan NS1 (*Silva et al., 2011*). El hepatocito se considera célula blanca durante la infección natural por VDEN (*Guzmán, Gubler, Izquierdo, Martinez y Halstead, 2016*). Se siguió el protocolo del laboratorio como fue publicado (*Pajaro-Castro, Flechas, Ocazonez, Stashenko y Olivero-Verbel, 2015*). VDEN (MOI: 0.5) se adsorbió 1h sobre células crecidas en placas de 96 pozos por 24h, luego de la adición de medio de cultivo que contenía extracto (1, 10, 20, 50 µg/mL) y la replicación del virus se permitió en 3 días. La concentración (unidades PanBio) de NS1 en el medio se determinó con un estuche comercial (Pan-E Dengue EARLY ELISATM, PanBio) del ELISA. Ribavirina (100µM) se incluyó como antiviral de referencia. En cada ensayo se corrieron controles (células no-infectadas / no tratadas

y células infectadas/ no tratadas) Los datos de densidad óptica (OD) se analizaron como se detalla en el numeral 3.5.3 Antiviral- Ensayo de reducción de proteína viral NS1 y quimioquinas.

Las quimioquinas RANTES e IL-8 son blanco de terapia para dengue debido a que incrementan notoriamente durante la fase febril construyendo el choque hipovolémico (Guzmán, Gubler, Izquierdo, Martinez y Halstead, 2016; Pawitan, 2011). Las células HEPG-2 producen estas quimioquinas cuando están infectadas con VDEN (De-Oliveira-Pinto *et al.*, 2012 ; Martina, Koraka y Osterhaus, 2009; Medin y Rothman, 2006). Se presumió que si el tratamiento con extracto reducía la proteína viral NS1 también sucedería con las quimioquinas. Para evaluarlo, VDEN-1 (MOI de 0.5) se adsorbió 1 h a las células y después se adicionó medio de cultivo que contenía extracto (100 µg/mL); simultáneamente en otros cultivos, el virus se dejó replicar 4 h y luego el medio se reemplazó por medio fresco que contenía extracto. En ambos casos al virus se le permitió replicar 72 h a partir de la adsorción, cuando se colectó el medio de cultivo para cuantificar las quimioquinas por el ELISA usando estuches comerciales (Invitrogen: KHC0081 y BioSource: KAC1511). Se hicieron dos experimentos independientes por duplicado y en cada uno se corrieron controles: células tratadas con ribavirina (100µM), células infectadas no-tratadas, células no-infectadas / no tratadas. Los datos se analizaron e interpretaron como describe en el numeral 3.5.3 Antiviral- Ensayo de reducción de proteína viral NS1 y quimioquinas.

3.4.4 Modo de acción antiviral. Con el propósito de evaluar cuál etapa del ciclo viral podría ser interrumpida por el tratamiento con extracto, se usó el ensayo de reducción de NS1. El extracto (100 µg/mL) se adicionó en tiempos distintos: i) en el momento (0h) de adsorber el virus (VDEN-1: MOI de 0.5); ii) después de la adsorción: 1h, 4h, 8h y 12h; iii) antes de adsorber el virus

(tratamiento de la célula). La replicación del virus se permitió por 72h a 37°C. Y al término se colectó el medio para cuantificar la proteína NS1 por ELISA. Se hicieron dos experimentos independientes por duplicado y en cada uno se corrieron controles: células tratadas con ribavirina (100µM), células infectadas no-tratadas, células no-infectadas / no tratadas. Los datos se analizaron e interpretaron como se describe en el numeral 4.3 Modo de acción antiviral.

3.5 Análisis de datos

3.5.1 Citotoxicidad. Los valores de DO generados en los ensayos de MTT se usaron para obtener curvas dosis-respuesta, que fueron agrupadas en clases con base en la medida del ajuste a un modelo de regresión logística simple (test de Wald) y con estas se estimó la concentración que redujo el 50% de la viabilidad celular (CC_{50}), usando el programa R (R Core Team, 2009-2016; libre acceso usando el enlace <https://www.R-project.org/>). Posteriormente se determinó la susceptibilidad de las células a los extractos de acuerdo a valores de CC_{50} y tipo de curva. Con los valores de CC_{50} de las ocho condiciones experimentales (cuatro líneas celulares y dos tratamientos) se construyó una matriz de datos con el programa Excel. Para identificar los extractos con menor tendencia a toxicidad se usó una estrategia de jerarquización de la actividad que fue publicada (*Velandia, Flechas, Stashenko, Ocazonez, 2016*), y se basa en el siguiente algoritmo:

- i) Ponderación por puntos de las líneas celulares.
- ii) Jerarquización por condición experimental (línea celular y tratamiento)
- iii) Cálculo del Índice de Citotoxicidad (IC).

3.5.2 Antiviral- Ensayo de protección. Las fotografías de las monocapas celulares se procesaron con el software ImageJ (*Rasband, W.S.* 1997-2016. Instituto Nacional de Salud, USA, libre acceso usando el portal: <https://imagej.nih.gov/ij/>) y se obtuvo la fracción de área oscura (teñida con cristal violeta o FA) que corresponde a las células viables (o infección viral inaparente). La actividad antiviral se expresó como porcentaje de protección (PP) contra la muerte celular (mantenimiento de viabilidad) y se calculó con la formula siguiente: $PP = [(FA \text{ células infectadas} - FA \text{ células infectadas-no tratadas}) / (FA \text{ células no infectadas} - FA \text{ células infectadas-no tratadas})] \times 100$. Un valor PP igual o mayor de 29% se adoptó como parámetro de actividad.

3.5.3 Antiviral - Ensayo de reducción de proteína viral NS1 y quimioquinas. Los valores de DO se usaron para estimar la concentración de proteína viral NS1 y se expresó en Unidades PanBio de acuerdo al fabricante del estuche. Se estimó el porcentaje de NS1 del tratamiento respecto al 100% del control (no tratado). Los porcentajes se usaron para construir curvas dosis-respuesta y generar los valores de concentración que inhibió 50% la replicación viral o CI_{50} utilizando el software GraphPad Prims (*Motulsky.,* 1995-2016. Versión 6 libre acceso encontrada en el enlace <https://www.graphpad.com>). Se estimó el índice de selectividad (IS) que correspondió CC_{50} / CI_{50} . Un valor de $CI_{50} \leq 50 \mu\text{g/mL}$ e $IS \geq 4.0$ se adoptó como parámetro de actividad relevante. Los valores (pg/mL) de IL-8 y RANTES en cultivos tratados con extracto se compararon con los valores en cultivos no tratados y la significancia de la diferencia se estimó por ANOVA usando el software R.

3.5.4 Definición del extracto punto de partida. Un extracto se consideró fuente primaria para descubrimiento de medicamentos para el dengue cuando presento actividad antiviral relevante

($CI_{50} \leq 50 \mu\text{g/mL}$ e $IS \geq 4.0$) en dos ensayos distintos y redujo significativamente la producción de quimioquinas RANTES e IL-8.

3.6 Consideraciones éticas

Este estudio está anidado al proyecto # 4 del programa “Estudio Integral de Especies Aromaticas y Medicinales Tropicales Promisorias para el desarrollo Competitivo y Sostenible de la Agroindustria de Escencias, extractos y derivados naturales de Colombia” de la Unión Temporal BioRed/ Colciencias/ CENIVAM (UT-BioRed-Co-CENIVAM). El proyecto está liderado por la profesora Raquel Ocazonez y el programa de la profesora Elena Stashenko. El programa es financiado por Colciencias y está registrado bajo el código 550754331904-31893. El material vegetal utilizado para ejecutar el programa es proveído por el estado colombiano mediante contrato suscrito entre el Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Unión Temporal BioRed-CO-CENIVAM (contrato # 01, junio 03,2014).

Los experimentos se realizaron conforme a los principios éticos consagrados en el artículo 63 del capítulo I, Título IV, de la Resolución 008430 de octubre 4 de 1993 en ejercicio de sus atribuciones legales en especial las conferidas por el Decreto 2164 de 1992 y la ley 10 del 1990 del Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia, sobre la investigación con microorganismos patógenos o material biológico que pueda contenerlos.

El riesgo concierne a la manipulación del virus del dengue, el cual, según el artículo 67 de la citada resolución y las directrices que en el año 2005 expidió la Organización Mundial de la

Salud (OMS), se encuentra dentro de la clasificación de microorganismos infecciosos de riesgo II, toda vez que representa peligro moderado para el individuo y limitado para la comunidad. Las garantías de seguridad prestadas por el laboratorio de Actividad Biológica –CINTROP– son las siguientes: cuenta con instalaciones, equipos y procedimientos de bioseguridad conforme con las normas técnicas de la OMS para laboratorios básicos de nivel II (OMS., 2005), y el manual de gestión integrado de la UIS (UIS., 2007) las cuales garantizan el manejo seguro del patógeno. Las instalaciones están organizadas en áreas de trabajo definidas y señalizadas con espacio suficiente para realizar el trabajo de laboratorio en condiciones de seguridad, para la limpieza y el mantenimiento. Posee equipos tales como congeladores a -70°C, cabinas de seguridad biológica y autoclaves los cuales permiten el almacenamiento, la manipulación y descarte del material biológico poseedor del patógeno. Dentro de los procedimientos de bioseguridad para el trabajo en el laboratorio se encuentran: la utilización obligatoria de los elementos de protección personal (bata, gorro, tapa bocas, guantes); capacitación y adiestramiento sobre manipulación, transporte, descontaminación y eliminación de desechos (sistema de gestión ambiental universidad Industrial de Santander); y afiliación por parte de los integrantes a entidades prestadoras de servicios de salud, y riesgos profesionales.

4. Resultados

4.1 Citotoxicidad

Cada extracto se evaluó sobre células de órganos humanos y animales frecuentemente usadas en análisis toxicológicos *in vivo*. Células de riñón (HEK293 y VERO), hígado (HEPG-2) y piel (B16F10) se trataron 72 h con extracto (concentraciones variadas) en el momento o 24 h después de la siembra y al término se estimó la viabilidad. La Figura 2 presenta curvas dosis-respuesta derivadas de los ensayos, las cuales se agruparon en clases con base en la medida del ajuste a un modelo de regresión logística simple (test de Wald).

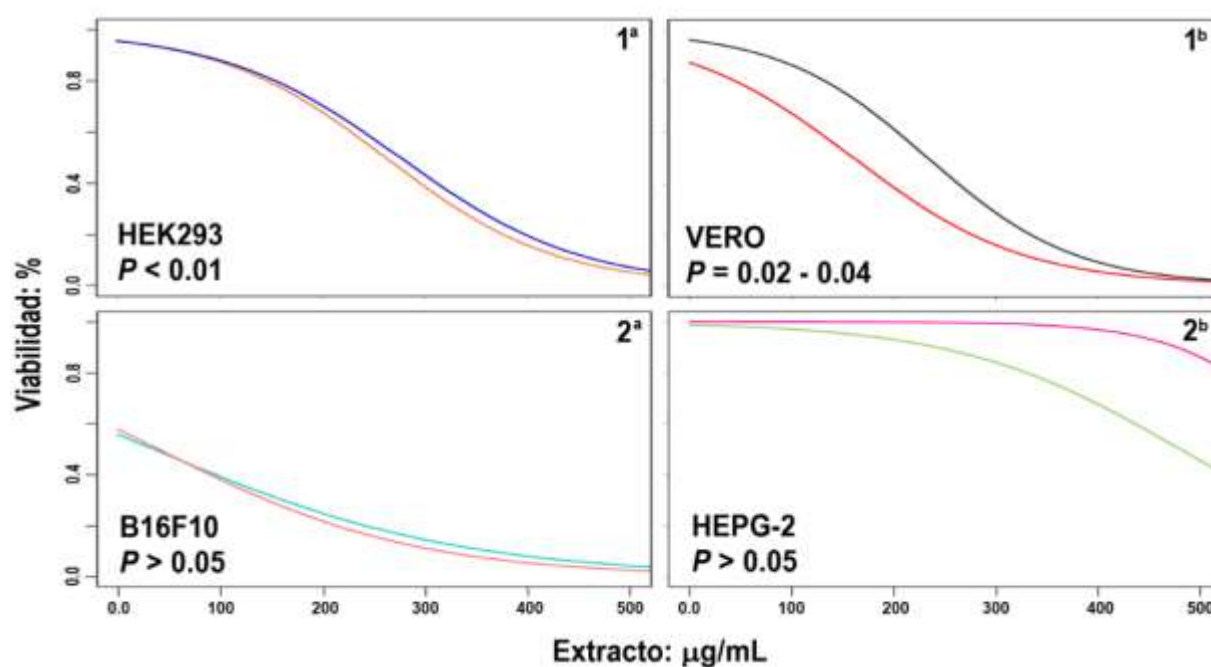


Figura 2. Curvas dosis-respuesta representativas obtenidas en los ensayos de MTT. Las células se trataron con el extracto (50, 100, 200, 300, 400 y 500 µg/mL) y la viabilidad con respecto al control se determinó 72 h después. Células: HEK293: riñón humano embrionario. HEPG-2: hígado humano. VERO: riñón de mono. B1610: piel (melanocitos) de ratón. El valor P se calculó con la prueba de Wald y refleja el ajuste a un modelo de regresión logística simple. La designación 1^a, 1^b, 2^a y 2^b hace referencia a la clase de curva (texto). Cada curva corresponde a un extracto.

Las clases de curvas dosis-respuesta fueron: clase 1^a, con buen ajuste ($P_{[Wald]} < 0.01$); clase 1^b, con ajuste aceptable ($P_{[Wald]} : 0.02 - 0.049$); clase 2^a, sin ajuste ($P_{[Wald]} > 0.05$) y reducción de la viabilidad más que 50% a la concentración menor (50 µg/mL) de extracto; clase 2^b, sin ajuste ($P_{[Wald]} > 0.05$) y reducción de la viabilidad menos que 50% a la máxima concentración (500 µg/mL). Las curvas clase 1^a y 1^b fueron más frecuentes por tratamiento durante la siembra que después (86.1% vs 45.8%). De las curvas dosis – respuesta se generaron los valores de CC₅₀, cuando no fue posible se asignó la mínima (50 µg/mL) o máxima (500 µg/mL) concentración evaluada (Tablas 3 y 4).

Tabla 3

Valores de CC₅₀ de ensayos del MTT: tratamiento antes de sembrar las células en el soporte.

EXTRACTO: planta	HEK293	HEPG-2	VERO	B16F10
<i>Achyrocline satureioides</i>	224 ± 71.3	434 ± 166.3	154 ± 60.2	151 ± 107.9
<i>Ageratina aff. Popayanensis</i>	264 ± 52.0	268 ± 51.8	226 ± 46.1	263 ± 50.6
<i>Ambrosia peruviana</i>	225 ± 87.0	368 ± 135.5	159 ± 52.0	208 ± 58.8
<i>Aristolochia anguicida</i>	244 ± 68.8	229 ± 56.1	233 ± 47.8	121 ± 93.7
<i>Calycolpus moritzianus</i>	202 ± 50.1	241 ± 49.0	142 ± 46.3	177 ± 52.6
<i>Cordia curassavica</i>	151 ± 45.8	148 ± 45.5	149 ± 46.0	123 ± 51.5
<i>Lippia americana</i>	270 ± 68.0	480 ± 95.7	246 ± 59.0	246 ± 92.4
<i>Lippia micromera</i>	353 ± 73.6	367 ± 86.1	313 ± 53.8	197 ± 52.1
<i>Lippia organoides</i>	219 ± 51.5	244 ± 50.7	223 ± 45.4	211 ± 52.5
<i>Piper cumanense</i>	188 ± 49.0	195 ± 52.5	161 ± 49.7	135 ± 53.0
<i>Piper dilatatifolium</i>	130 ± 47.5	158 ± 47.0	158 ± 44.4	164 ± 49.1
<i>Piper eriopodon</i>	170 ± 57.9	197 ± 53.1	148 ± 51.5	191 ± 56.1
<i>Piper peltatum</i>	279 ± 54.2	324 ± 75.2	294 ± 46.3	194 ± 52.7
<i>P. subflavum</i>	187 ± 47.6	192 ± 48.6	147 ± 51.1	182 ± 51.8
<i>Psidium sartorianum</i>	160 ± 52.3	261 ± 53.6	109 ± 50.7	238 ± 164.7
<i>Tagetes caracasana</i>	222 ± 58.9	228 ± 58.3	206 ± 49.8	215 ± 69.1
<i>Turnera diffusa</i>	171 ± 47.6	197 ± 52.4	172 ± 51.1	169 ± 63.3
<i>Wedelia calycina</i>	205 ± 48.5	191 ± 53.9	202 ± 47.6	100 ± 68.0

CC₅₀: concentración (µg/mL) que redujo 50% la viabilidad celular. Los datos se derivaron de curvas dosis – respuesta de ensayos del MTT. Células: HEK293, riñón humano; HEPG-2, hígado humano; VERO, riñón de mono; B16F10, melanoma de ratón. 500 es la concentración mayor usada en el ensayo. Valores son promedio ± EE de tres ensayos independientes por triplicado.

Tabla 4

Valores de CC_{50} de ensayos del MTT: tratamiento después de sembrar las células en el soporte.

EXTRACTO: planta	HEK293	HEPG-2	VERO	B16F10
<i>Achyrocline satureioides</i>	500	500	82 ± 92.9	117 ± 71.3
<i>Ageratina aff. Popayanensis</i>	322 ± 108.7	348 ± 57.2	113 ± 62.7	147 ± 45.6
<i>Ambrosia peruviana</i>	346 ± 50.4	327 ± 51.8	94 ± 80.6	115 ± 61.8
<i>Aristolochia anguicida</i>	297 ± 69.3	266 ± 79.5	55 ± 109.1	193 ± 61.3
<i>Calycolpus moritzianus</i>	211 ± 61.5	254 ± 55.7	78 ± 72.4	115 ± 50.7
<i>Cordia curassavica</i>	141 ± 67.3	138 ± 74.4	46 ± 98.8	91 ± 62.7
<i>Lippia americana</i>	332 ± 55.4	350 ± 52.1	68 ± 98.7	191 ± 48.5
<i>Lippia micromera</i>	428 ± 73.6	472 ± 104.2	114 ± 82.6	128 ± 51.3
<i>Lippia origanoides</i>	337 ± 62.8	363 ± 62.5	82 ± 92.5	131 ± 51.9
<i>Piper cumananse</i>	310 ± 69.9	272 ± 97.3	143 ± 75.8	81 ± 102.1
<i>Piper dilatatifolium</i>	279 ± 56.2	266 ± 55.4	82 ± 78.0	116 ± 49.1
<i>Piper eriopodon</i>	219 ± 68.4	242 ± 59.1	61 ± 108.4	124 ± 53.8
<i>Piper peltatum</i>	358 ± 86.2	430 ± 108.5	111 ± 84.8	117 ± 53.0
<i>P. subflavum</i>	194 ± 77.7	231 ± 85.8	44 ± 110.9	34 ± 100.7
<i>Psidium sartorianum</i>	384 ± 49.7	416 ± 41.0	123 ± 68.1	131 ± 47.5
<i>Tagetes caracasana</i>	399 ± 87.4	398 ± 86.5	74 ± 182.3	145 ± 85.2
<i>Turnera diffusa</i>	260 ± 48.4	271 ± 50.0	63 ± 95.3	133 ± 48.8
<i>Wedelia calycina</i>	349 ± 111.0	332 ± 317.7	24 ± 288.3	81 ± 102.1

CC_{50} : concentración ($\mu\text{g/mL}$) que redujo 50% la viabilidad celular. Los datos se derivaron de curvas dosis – respuesta de ensayos del MTT. Células: HEK293, riñón humano; HEPG-2, hígado humano; VERO, riñón de mono; B16F10, melanoma de ratón. 500 es la concentración mayor usada en el ensayo. Valores son promedio $\pm$ EE de tres ensayos independientes por triplicado.

En varios estudios se ha demostrado que la citotoxicidad de una muestra varía notoriamente dependiendo del tipo de célula (Akter, Uddin, Grice y Tiralongo, 2014; Shahneh et al., 2013; Xia et al., 2008). Para identificar las líneas celulares más y menos susceptibles a cada tratamiento se usaron dos parámetros:

(i) Proporción (%) de extractos que presentaron curva dosis-respuesta clase 2^b. Se usó este criterio debido a que la respuesta celular indicó baja toxicidad del extracto (reducción de viabilidad < 50% a 500 $\mu\text{g/mL}$); así, cuanto menor la proporción es mayor la susceptibilidad de la línea

celular (Figura 3). Con el tratamiento *a*, la susceptibilidad por línea celular fue en el siguiente rango de mayor a menor: (proporción de extractos en paréntesis): HEK293 (0%) $\approx$ VERO (0%) $\approx$ B16F10 (0%) > HEPG-2 (16.7%). Con el tratamiento *d*, el rango fue el siguiente: VERO (0%) $\approx$ B16F10 (0%) > HEK293 (16.7 %) > HEPG-2 (27.8 %).

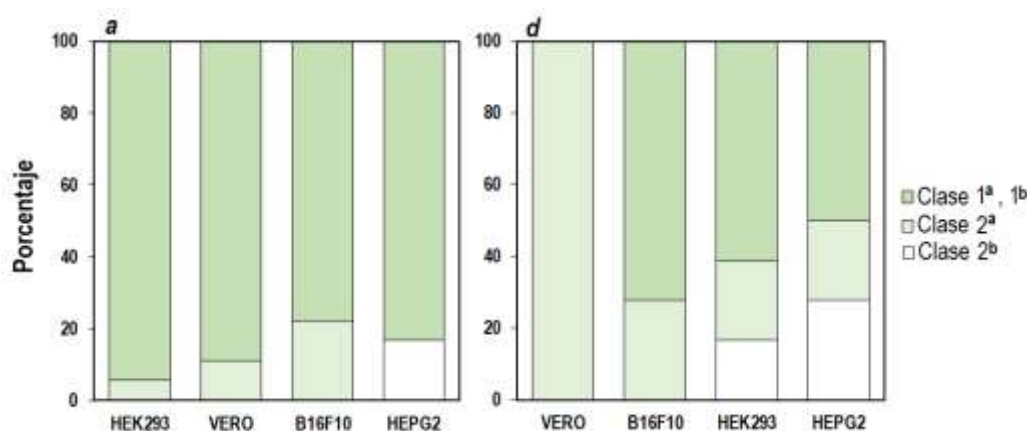


Figura 3. Susceptibilidad de la célula a tratamiento con extractos según curva dosis respuesta. Cuanto menor la proporción de muestras con curvas clase 2b mayor la susceptibilidad de la línea celular. Tratamiento en el momento (*a*) y 24 h (*d*) después de la siembra Células humanas: HEPG-2-hígado, HEK293-riñón. Células de animal: B16F10-piel de ratón, VERO-riñón de mono.

(ii) Valores de CC_{50} . No existen valores de CC_{50} referentes para definir el grado de citotoxicidad de un extracto según el ensayo del MTT. Para este trabajo se adoptaron rangos de CC_{50} propuestos por otros autores (Cos, Vlietinck, Berghe y Maes, 2006; Ferraz et al. 2013) y la citotoxicidad se consideró de cuatro grados: baja, valores $> 350 \mu\text{g/mL}$; media, $350 - 201 \mu\text{g/mL}$; alta, $200 - 101 \mu\text{g/mL}$; muy alta $< 100 \mu\text{g/mL}$. Cuanto mayor la proporción de extractos con valores de $CC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ mayor la susceptibilidad de la línea celular a los tratamientos (Figura 4). Con tratamiento *a* la susceptibilidad fue en el siguiente rango de mayor a menor (proporción de extractos con $CC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ en paréntesis): B16F10 (5.6%) > VERO (0%) $\approx$ HEK293 (0%)

$\approx$ HEPG-2 (0%). Con tratamiento *d*: VERO (72.2%) > B16F10 (22.2%) > HEK293 (0%) $\approx$ HEPG2 (0%). Los resultados muestran que células de riñón de mono (VERO) y de piel de ratón (B16F10) fueron las más susceptibles al tratamiento con los extractos al momento y 24 h después de sembrarlas. Al contrario, las células de hígado humano (HEPG-2) fueron las más resistentes. Con respecto a las células de riñón humano (HEK293), resultaron más susceptibles al tratamiento *a* que al *d*.

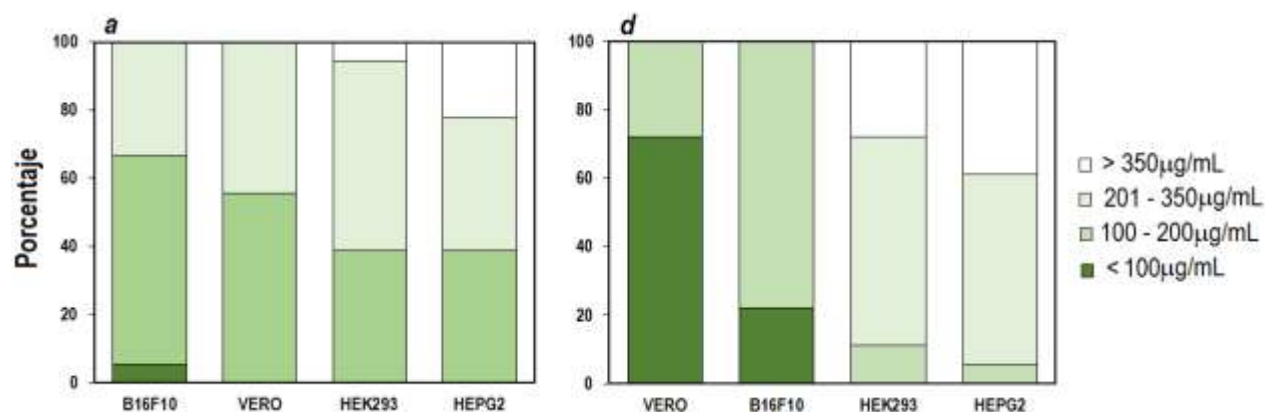


Figura 4. Susceptibilidad de la célula a tratamiento con extracto según rango de la CC_{50} . Cuanto mayor la proporción de muestras con valores < 100 µg/mL mayor la susceptibilidad de la línea celular. Tratamiento durante (*a*) y 24 h (*d*) después de la siembra. Células humanas: HEPG-2, hígado; HEK293, riñón. Células de animal: B16F10-piel de ratón, VERO-riñón de mono.

4.1.1 Algoritmo de la actividad citotóxica. Se utilizó un método de jerarquización para generar el factor de sobrevivencia un indicador de citotoxicidad (IC). Para esto se empleó el siguiente algoritmo:

i) Se hizo una ponderación por puntos de las líneas celulares: más puntos para las de origen humano ya que son de mayor interés; más para las de hígado porque son cancerosas, resultaron las

más resistentes y porque son blanco de la infección natural por VDEN. De las animales, más puntos para las de melanoma porque resultaron también las más resistentes. La ponderación (P) fue la siguiente: HEPG-2= 40 puntos; B16F10 =30 puntos; HEK293 = 20 puntos; VERO= 10 puntos.

ii) Se jerarquizó por condición experimental, esto es, por línea celular y tratamiento. Para cada extracto se aplicó la fórmula: $JPI = (CC_{50} \times r / CM) \times P$, donde $r = 5$ como referente común, CM = concentración máxima de extracto usada en el ensayo, P = puntos asignados a la línea celular.

iii) Se calculó la IC sumando los valores JPI de las ocho condiciones experimentales (cuatro líneas x dos tratamientos). Valores $IC > 6$, entre 5.9-4.0 y < 4.0 se adoptaron como baja, media y alta toxicidad, respectivamente; y correspondieron con rangos de la CC_{50} : $> 350 \mu\text{g/mL}$, 300-201 $\mu\text{g/mL}$, 200-101 $\mu\text{g/mL}$ y $< 100 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

4.1.2 Perfiles de citotoxicidad. Las muestras se ordenaron de manera descendente usando los valores de IC y se generaron los perfiles (figura 5). En los primeros lugares se ubicaron extractos con valores $CC_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ en el mayor número de condiciones experimentales, correspondiendo con valores de IC entre 7.2 y 5.7. En los últimos lugares se ubicaron extractos con valores $CC_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$ en el mayor número de condiciones y valores de IC entre 4.6 y 3.1. Los cinco que resultaron menos citotóxicos en orden descendente fueron (IC en paréntesis): *L. americana* (7.2) $<$ *A. saturoioides* (6.8) $<$ *L. micromera* (6.7) $<$ *P. peltatum* (6.5) $<$ *A. aff popayanensis* (6.0). Los cinco extractos que resultaron más citotóxicos fueron: *C. curassavica*

(3.1) < *P. subflavum* var *Espejuelanum* (3.6) < *P. dilatatifolium* (4.2) $\approx$ *P. cumanense* (4.2) < *P. eriopodon* (4.3).

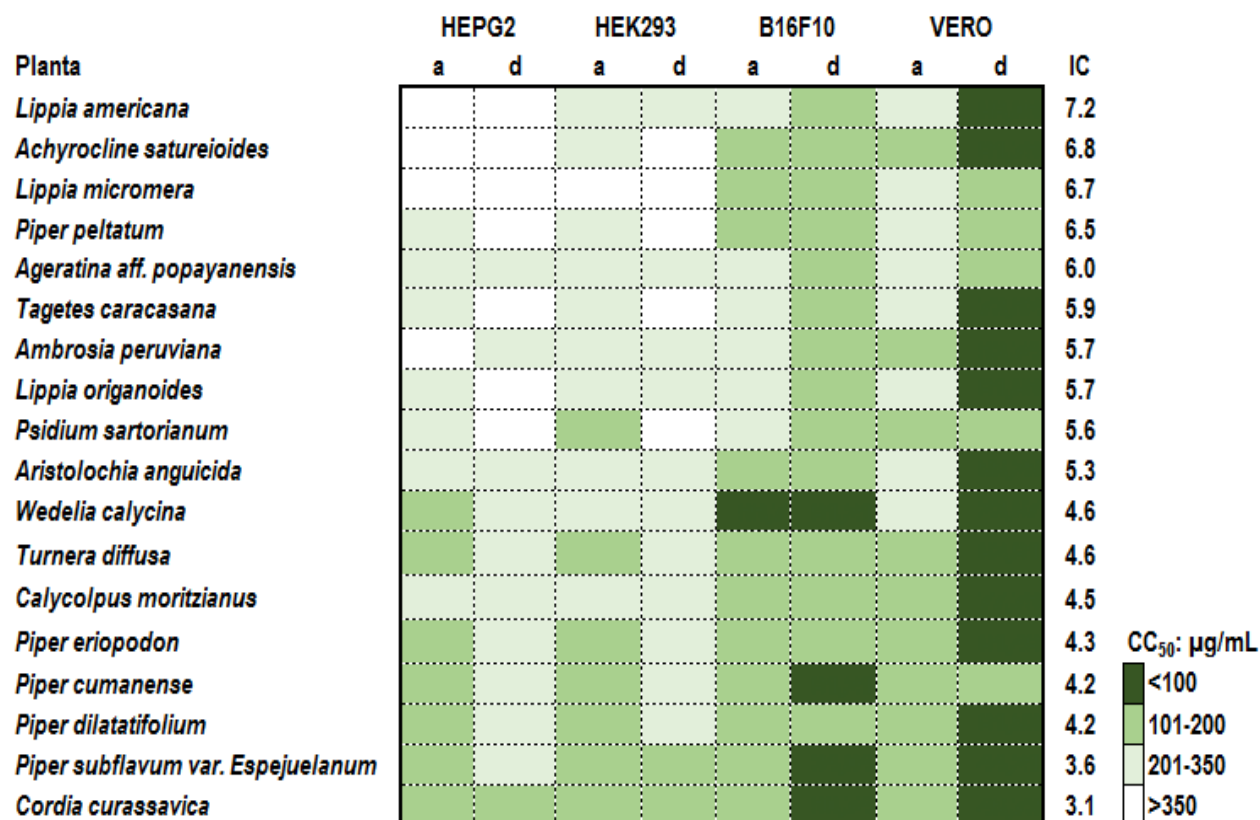


Figura 5. Perfiles de citotoxicidad de los extractos. Las muestras se presentan organizadas de menos a más citotóxicas con base en los valores del indicador de citotoxicidad (IC) derivados de la CC₅₀. Cuanta mayor intensidad del color mayor citotoxicidad. Líneas celulares humanas: HEK293, riñón; HEPG-2, hígado. Líneas celulares animales: VERO, riñón de mono; B16F10, piel de ratón. Tratamiento, durante (a) y 24 h después (d) de la siembra.

4.2 Actividad antiviral

Se seleccionaron ocho extractos de plantas con citotoxicidad baja y media, algunas con uso medicinal en Colombia (Bernal et al., 2011), a los cuales se les evaluó el efecto antiviral sobre el

VDEN-1 y VDEN-2 a concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$ y 10 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados del ensayo de protección se presentan en la Figura 6.

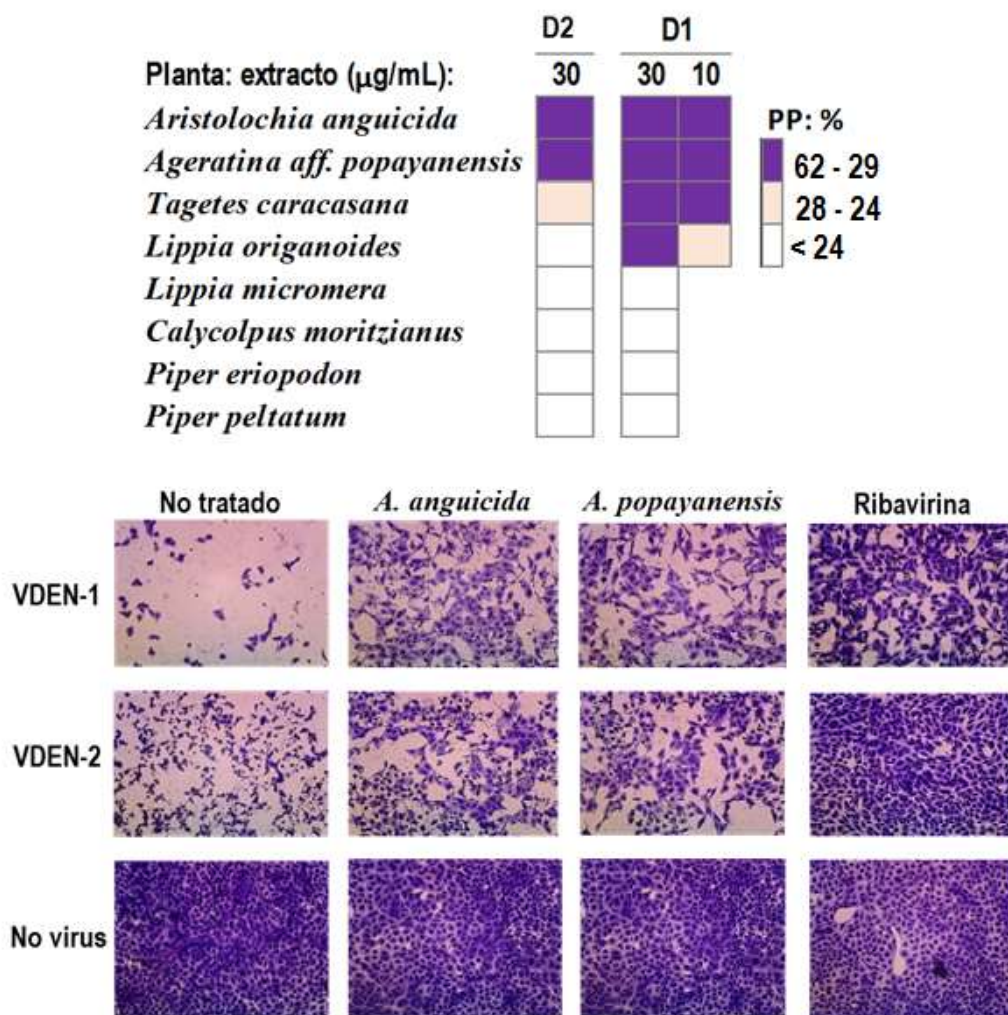


Figura 6. Actividad antiviral de extractos evaluada en ensayos de protección. VDEN-1 (D1) y VDEN-2 (D2) se adsorbió 1 h a células VERO y la replicación se permitió cinco días en medio con extracto (10 o 30 $\mu\text{g/mL}$). Las células se colorearon con cristal violeta para viabilidad y se estimó el porcentaje de protección usando el software ImageJ. Fotografías representativas de monocapas celulares coloreadas. Las muestras se listan de mayor a menor actividad antiviral con base en el porcentaje de protección (PP). Valores PP ≥ 29 % son relevantes. Resultados son el promedio de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

El extracto de *A. angucida* a 30 µg/mL protegió en 47.2% y 32.3% la infección, respectivamente, por VDEN-1 y VDEN-2. Los extractos de *A. aff popayanensis*, *T. caracasana* y *L. origanoides* a 30 µg/mL protegieron de infección por VDEN-1 en 51.0%, 60.6% y 49.5%, respectivamente; y por VDEN-2 en 29.0%, 6.8% y 26.6%, respectivamente. Con los cuatro extractos usados a 10 µg/mL los porcentajes de protección fueron entre 36.4% y 28.8%. Con extractos de *L. micromera*; *P. eridopodon*, *C. moritzianus*, *P. peltatum* no se observó cambio notorio con respecto al no-tratado: a las dos concentraciones usadas porcentaje de protección máximo de 18.1% independiente del serotipo.

En consideración a que los extractos de *A. angucida* y *A. aff. popayanensis* fueron los más activos con ambos serotipos del VDEN, se seleccionaron para confirmar la actividad antiviral en el ensayo de reducción de NS1. En este ensayo se usaron las células de hígado humano (HEPG-2) y es conocido que el VDEN se replica en células produciendo abundante proteína NS1 que se secreta al torrente sanguíneo (*Lima et al., 2011*). Esta proteína viral juega papel preponderante en la patogénesis del dengue y por esto es un blanco para descubrimiento de antivirales (*Watterson Modhiran y Young, 2016*).

Para evaluar si los extractos activos en el ensayo de protección pueden reducir la producción de la proteína viral de NS1, células HEPG-2 previamente infectadas se trataron con extractos a varias concentraciones y tres días después se midió la concentración de NS1 en el medio de cultivo. Los resultados se presentan en la Figura 7. Sobre VDEN-1, los extractos de *A. aff. popayanensis* y *A. angucida* redujeron la producción de proteína viral, respectivamente, a CI_{50} de 41 µg/mL con IS de 7.8 y CI_{50} de 53 µg/mL con IS de 5.0. Con VDEN-2 no se observó

reducción relevante de proteína NS1: a la máxima concentración de 50 µg/mL no hubo diferencias con respecto al control (no-tratado).

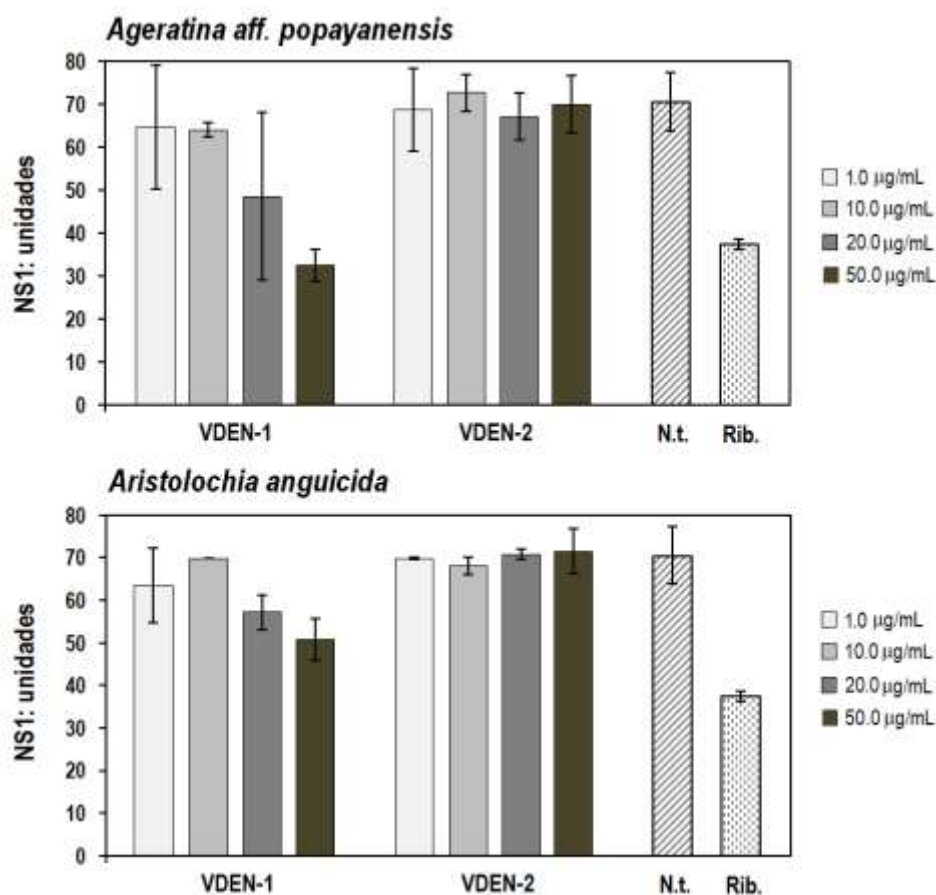


Figura 7. Actividad antiviral de los extractos sobre serotipos del virus evaluada en el ensayo de reducción de NS1. El virus se adsorbió 1 h sobre células HEPG-2 y la replicación se permitió tres días en medio de cultivo que contenía extracto a las concentraciones mostradas. Resultados son el promedio de dos experimentos independientes realizados por duplicado. N. t.: no-tratado. Rib.: ribavirina (100 µM)

La Tabla 5 resume la actividad antiviral de los dos extractos. *A. aff. popayanensis* protegió casi 50% la infección causada por VDEN-1 en las células VERO y redujo NS1 en células HEPG-2; sin embargo no presentó efecto inhibitorio relevante de la infección por VDEN-2. *A. anguicida*,

protegió en casi el 50% la infección por VDEN-1 y VDEN-2, pero no redujo la producción de proteína NS1 de los dos serotipos a la máxima concentración.

Tabla 5

Actividad antiviral de extractos sobre serotipos del VDEN evaluada en dos ensayos distintos

EXTRACTO: planta	CC ₅₀ : µg/mL	VDEN-1		VDEN-2	
		Prot.	NS1:CI ₅₀ (IS)	Prot.	NS1:CI ₅₀ (IS)
<i>A. aff popayanensis</i>	322 ± 108.7	51%	41 ± 2.8 (7.9)	29%	N.c
<i>A. anguicida</i>	266 ± 79.5	47%	53 ± 13.0 (5.0)	32%	N.c

Prot.: ensayo de protección. NS1: ensayo de reducción de proteína viral: CI₅₀ concentración (µg/mL) que redujo 50%; IS = índice de selectividad (CC₅₀/CI₅₀). N.c: no se calculó, a la máxima concentración (50 µg/mL) de extracto usada en el ensayo la reducción de NS1 fue 10%

Es conocido que el hígado produce varias quimioquinas y el nivel elevado en el torrente sanguíneo contribuye al desarrollo del dengue severo (*De-Oliveira- Pinto et al., 2012; Martina, Koraka, y Osterhaus, 2009*). Como células HEPG-2 infectadas con VDEN producen las quimioquinas RANTES e IL-8 (*Lin et al., 2000; Medin y Rothman, 2006*) se presumió que el tratamiento con extracto podría también reducir el nivel de estas proteínas en el sobrenadante del cultivo. Las células infectadas se trataron con 100 µg/mL del extracto de *A. aff popayanensis* 1 h y 4 h después de la adsorción de VDEN-1 y la concentración de las quimioquinas en el medio de cultivo se determinó 72 h después. Los resultados se presentan en la Tabla 6. El tratamiento 1 h después de la adsorción redujo RANTES completamente pero IL-8 solo 18% y esto coincidió con reducción en 54% de la proteína NS1. Con el tratamiento a las 4 h, se redujo 95% RANTES y 97% IL-8 pero esto no coincidió con reducción de NS1. Los resultados confirman el efecto anti-dengue el extractoracto y sugieren que bloquea procesos de la internalización del virus al interior de la célula pero no etapas subsiguientes.

Tabla 6.

Efecto de A. aff popayanensis sobre la producción de quimioquinas por hepatocitos humanos infectados con VDEN-1

Tratamiento*	Virus: NS1 (%)	IL8: pg/mL (%)	RANTES: pg/mL (%)
1 hora	32 ± 3.6 (54)	22 ± 5.6 (18)	0.02 (100)
4 horas	75 ± 5.1 (4)	1 ± 1.1 (97)	85 ± 12.7 (95)
Ninguno	79 ± 1.2	27 ± 3.2	1553 ± 611.4

*: Tiempo después de la adsorción del virus. Células HEPG-2 infectadas con VDEN-1(MOI de 0.5) se trataron con 100 µg/mL de extracto y tres días después se midió la concentración de quimioquinas por ELISA. Los datos son promedios ± DS de experimentos independientes hechos por duplicado. (%): porcentaje de reducción con respecto al control no tratado.

4.3 Modo de acción antiviral

En la Figura 8 se observa reducción de NS1 solamente con el tratamiento 1 h después de la adsorción: NS1 = 32 ± 3.6 vs. 79 ± 1.2 ($p = 0.01$) del control. En tratamientos 0 h, 4 h, 8 h y 12 h no se observó reducción relevante de NS1 = 77 ± 3.0, 75 ± 5.1, 74 ± 0.7 y 66 ± 1.9, respectivamente. El tratamiento a la célula antes de adicionar el virus no afectó su replicación: NS1 = 76 ± 0.1 vs. 79 ± 1.2 del control.

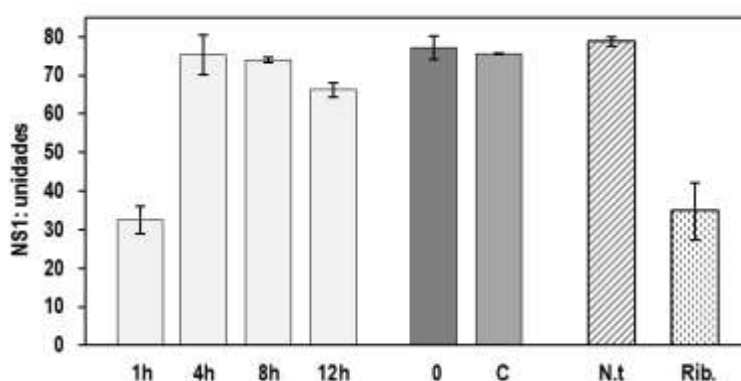


Figura 8. Modo de acción antiviral de *A. aff. popayanensis* evaluado en el ensayo de reducción de NS1. Los cultivos se trataron con extracto (100 µg/mL) 1 h, 4 h, 8 h y 12 h después de adsorber VDEN-1 (MOI de 0.5); en el momento de adsorber el virus (0) y antes de adsorber el virus (C). Cultivos infectados (virus adsorbido 1 h) no-tratados (N.t.) y tratados con ribavirina (Rib.:100 µM) son controles. En todos los casos, el medio de cultivo se colectó 72 h después de adsorber el virus

para cuantificar proteína NS1 por ELISA. Los datos son el promedio $\pm$ DS de experimentos independientes hechos por duplicado.

Los resultados indican que el tratamiento con el extracto de *A. aff popayanensis* puede afectar alguna interacción molecular durante el proceso de penetración del virus al interior de la célula. Esto se deduce por la reducción de NS1 cuando el extracto se adiciono 1 h después de la adsorción, pero no en las horas siguientes. De otra parte, no parece que componentes del extracto enmascaren moléculas expuestas sobre la membrana celular y/o la envoltura viral que participan en la interacción virus-célula durante la adsorción. Esto se concluye porque no hubo reducción de NS1 por los tratamientos antes y en el momento de adsorber el virus. La no reducción de NS1 por los tratamientos 2 h después de la adsorción viral sugieren que no fueron interrumpidas etapas del ciclo viral como: descapsulación, transcripción y replicación del genoma, síntesis y proteólisis de proteínas, ensamble y liberación del virión.

5. Discusión

Los derivados de plantas han sido utilizados como puntos de partida en el descubrimiento de cerca del 30% de medicamentos licenciados para tratamiento de diversas enfermedades (*Atanasov et al, 2015; Padmavathy y Devarajan, 2017; Siddiqu, Iram, Siddiqui y Sahu, 2014*). No existe aún un medicamento para el dengue. En el marco de referencia se mencionaron evidencias que soportan el concepto que las plantas pueden ser una fuente de alto valor para descubrimiento de

medicamentos para el dengue. De ellas se puede obtener un extracto para la formulación de un medicamento natural y un fitoquímico para derivar un antiviral sintético (*Huang et al., 2014*). El extracto de una planta de la India mostró eficacia terapéutica en ratones infectados y se consideró promisorio (*Sood et al., 2015*).

Colombia es uno de los países del mundo más ricos en flora y también uno de los que aporta a la región de las Américas el mayor número de casos de dengue. A pesar que la medicina tradicional es ampliamente usada para aliviar síntomas del dengue, la evidencia científica del efecto antiviral de productos de las plantas es muy escasa como ya se mencionó. En este trabajo se analizó el potencial farmacológico *in vitro* para el dengue de 18 plantas usadas en la medicina tradicional colombiana para tratamiento de diversas dolencias. El extracto de cada una se analizó en ensayos basados en célula y se siguió un protocolo guiado hacia identificar el más activo.

Es conocido que la baja citotoxicidad es un parámetro para seleccionar compuestos líderes para el descubrimiento de fármacos (*Krewski, Westphal, Al-Zoughool, Croteau y Andersen, 2011*). A los extractos de plantas se les atribuye alta citotoxicidad y algunos consideran esta propiedad un impedimento para considerarlos puntos de partida en investigaciones para descubrimiento de fármacos (*Lai, Lin y Hsieh, 2017; Low Ooi y Vasudevan, 2017*). No hay aún acuerdo sobre los parámetros para establecer el grado de citotoxicidad de extractos y en parte se debe a variaciones entre los procedimientos técnicos que impiden comparar resultados. *Cos, Vlietinck, Berghe y Maes* (2006) y *Ferraz et al* (2013) han propuesto que valores de $CC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ se consideren alta citotoxicidad. En este trabajo se creó un algoritmo para determinar los perfiles de citotoxicidad de los extractos. Dada la variación entre líneas celulares y tratamientos se ponderó dando más puntos

a células humanas y más resistentes. De esta manera se pudo evidenciar que los extractos más citotóxicos presentaron valores de $CC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ en varias condiciones experimentales.

El extracto de *A. satureioides* se identificó como el menos citotóxico entre las 18 muestras analizadas, lo mismo encontraron Sabini *et al* (2013). Los extractos de *C. curassavica* y *T. diffusa* se ubicaron entre los más citotóxicos y lo mismo reportaron Cepleanu *et al* (1994) con una muestra de la primera planta y Avelino-Flores, Cruz-López, Jiménez-Montejo y Reyes-Leyva (2015) con una muestra de la segunda. Los extractos de especies de *Lippia* se ubicaron entre los de baja y mediana citotoxicidad y varios trabajos lo reportan de la misma manera (Pascual, Slowing, Carretero, Mata y Villar, 2001). Los extractos de las especies de *Piper* se ubicaron entre los más citotóxicos como Giovannini y Howes (2017) lo reportan y fue un resultado esperado ya que estas especies se consideran fuentes ricas en compuestos para descubrimiento de medicamentos para el cáncer. La estrategia usada en este trabajo para evaluar la citotoxicidad se puede considerar confiable, los perfiles se mantuvieron cambiando valores de ponderación de la línea celular en cada tratamiento y los resultados son similares a los reportados por otros.

Es conocido que los componentes químicos del extracto determinan sus propiedades. En este estudio no se determinó la composición química de los extractos. Otros (Retta, Dellacassa, Villamil, Suárez y Bandoni, 2012) han identificado flavonoides y polifenoles en el extracto de *A. satureioides* y se creen son los responsables de sus propiedades antioxidantes y protectoras de la viabilidad celular. En el extracto de *T. diffusa* se ha identificado la flavona apegénina a la cual se le atribuye la citotoxicidad (Avelino-Flores, Cruz-López, Jiménez-Montejo y Reyes-Leyva, 2015; Clere, Faure, Martinez, y Andriantsitohaina, 2011; Zhao, Pawar, Ali y Khan, 2007). La piperina

es un alcaloide que se encuentra en especies de *Piper* y varios trabajos demuestran su potente efecto apoptótico (Giovannini y Howes, 2017).

Algunos autores han propuesto que un extracto se puede considerar activo *in vitro* si presenta $CI_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ y el IS es mayor a 4.0 (Li, Ooi, Wang, But, y Ooi, 2004; Sood *et al.*, 2015). Los resultados de este estudio demuestran que los extractos de *A. aff. popayenensis* y *A. anguicida* presentaron actividad antiviral sobre el VDEN-1, reduciendo proteína viral NS1 a $CI_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ con $IS > 4.0$. La evaluación antiviral no incluyó la reducción de la progenie viral dado que ensayos de plaqueo no se realizaron. No obstante, se puede asumir que el extracto inhibió la progenie considerando que al virus se le permitió replicar 72 h en el hepatocito cuando ya han ocurrido varios ciclos virales. Se ha demostrado que en células HEPG2 infectadas con VDEN, la nueva progenie viral se detecta a las 24 h después de la adorción del virus (Suksanpaisan, Susantad y Smith, 2009).

Es conocido que el hígado produce IL-8 y RANTES, estas quimioquinas se increemntan notoriamente en pacientes con dengue severo contribuyendo a los eventos que llevan al choque hipovolémico (De-Oliveira-Pinto *et al.*, 2012). Un medicamento que regule negativamente la producción de estas quimioquinas podría servir para prevenir un desenlace severo del dengue. Como se muestra en la Tabla 4, el tratamiento de células HEPG-2 con extracto de *A. aff. popayenensis* inhibió casi completamente RANTES e IL-8. Aunque no se realizaron experimentos para evaluar la acción directa del extracto, los niveles bajos de las quimioquinas a las 4 h en ausencia de reducción de proteína viral sugieren que el extracto contiene compuestos que podrían bloquear directamente vías de señalización que conducen a la síntesis de las quimioquinas. Cabe

mentonar que el extracto redujo RANTES cuando se adicionó 1h y 4 h después de la adsorción del virus e IL-8 solo a las 4 h La diferencia pudo deberse a que la producción de IL-8 se activa ligada a eventos de la replicación viral y esto no es requerido para activar RANTES. No se encontraron estudios del efecto inhibitorio de citoquinas de *A. aff. popayenensis*. No obstante, con varias especies de la familia Asterácea se ha demostrado efecto potente inmunomodulador de citoquinas pro-inflamatorias (Bo et al., 2012; Capelari-Oliveira et al., 2011; Kogiannou, Kalogeropoulos, Kefalas, Polissiou y Kaliora., 2013; Maas, Deters, y Hensel ,2011; Mukherjee et al., 2014; Talhouk, Karam, Fostok, El-Jouni y Barbour, 2007).

La actividad contra más de un serotipo fue otro parámetro considerado en este estudio para seleccionar el extracto más activo. En el ensayo de protección, los de *A. anguicida*, y *A. aff. popayenensis* se identificaron como los más activos dado que se evidenció protección para VDENV-1 y VDENV-2. No obstante, la actividad sobre el serotipo 2 no se confirmó en el ensayo de reducción de NS1 y esta fue la razón por la cual se analizaron sobre los otros dos serotipos. Una explicación del resultado del resultado conflictivo es que la producción del VDENV-2 pudo ser mayor en los hepatocitos humanos que los de mono y en consecuencia las mismas concentraciones del extracto fueron insuficientes para bloquear la replicación del virus. Se evaluar la actividad antiviral en otros ensayos para concluir con precisión si los extractos poseen o no actividad panDENV.

El modo de acción antiviral del extracto *A. aff. popayenensis* se puede inferir de los resultados en cada ensayo. En el de protección, con el tratamiento inmediatamente después de adsorber el virus a la célula el extracto posiblemente interactúa con componentes de la membrana celular que bloquean cambios conformacionales requeridos para la internalización completa del

virus al interior del citoplasma, un mecanismo que ha sido propuesto por otros (*Talarico et al.*, 2005). Adicional a esto, las células HEPG-2 expresan heparan-sulfato sobre la superficie al cual se une el VDEN para penetrar al citoplasma (*Kaufmann y Rossmann*, 2011; *Thepparit y Smith*, 2004). Es posible que el extracto interactúe con el heparan-sulfato bloqueando la fusión de la envoltura viral con la membrana celular y en consecuencia impidiendo la internalización del virus. Los resultados de adición en el tiempo, soportan este supuesto. Se observó reducción de la proteína viral NS1 solamente cuando el extracto se adicionó 1 h después de la adsorción del virus. Esto a pesar que múltiples ciclos de replicación viral ocurrieron dado que la medición de la proteína se hizo a las 72 h. Se ha demostrado que un ciclo de replicación del VDEN en células HEPG-2 se completa en 12 h (*Suksanpaisan, Susantad y Smith*, 2009).

La actividad antiviral de un extracto está determinada por el tipo y contenido de sus compuestos (fitoquímicos). Hasta la fecha no se ha reportado el aislamiento de fitoquímicos en el extracto de *A. aff. popayensis*. Se reportó que lactonas sesquiterpénicas, sesquiterpenos y flavonoides podrían ser responsables de la actividad biológica de extractos de varias especies de *Eupatorium* (*Ageratina*). Se ha demostrado que estos fitoquímicos poseen actividad inmunoestimuladora y anti-inflamatoria (*Chaturvedi*, 2011; *Sharma*, Dawra, Kurade y Sharma, 1998); algunos de ellos pueden bloquear la vía de señalización NF-Kb que es la más potente para regular positivamente la expresión de citoquinas pro-inflamatorias; con los flavonoides está demostrada la actividad antiviral sobre VDEN (*Zandi et al*, 2011).

De los 18 extractos analizados solo 2 se identificaron como activos sobre el VDEN. El indicador usado fue el efecto inhibitorio en al menos 50% a concentración máxima de 50 µg/mL.

Inicilamente, los extractos se analizaron a 30 µg/mL en el ensayo de protección y se escogieron los que mayormente preservaron la viabilidad de la monocapa celular respecto al control (sin virus). Este parámetro está influenciado por la viabilidad *per se* de la monocapa en el pozo de la placa y en consecuencia se presentan resultados falsos negativos. Esto es, la viabilidad celular se perdió pero el extracto puede bloquear la replicación del virus. Bajo esa circunstancia, los extractos que fueron excluidos podrán presentar actividad antiviral en otros ensayos basados en célula.

6. Conclusiones

El algoritmo para evaluar la citotoxicidad permitió identificar extractos de plantas de Colombia que pueden servir de puntos de partida en investigación. Los menos citotóxicos para estudios enfocados al desarrollo de medicamentos naturales y descubrimiento para tratamiento de enfermedades infecciosas, metabólicas y de base inmunológica. Los más citotóxicos para estudios sobre medicamentos para el cáncer.

El extracto de *A. aff popayensis* se identificó como el más potente inhibidor de la infección de hepatocitos humanos por VDEN-1: redujo la replicación del virus y producción de quimioquinas que se han asociado a la severidad de la enfermedad. El extracto parece ser más efectivo para bloquear etapas tempranas que tardías del ciclo de vida del virus. En Colombia, *A. aff popayensis* es un arbusto que se conoce con el nombre de chilco negro y se cultiva en varios

departamentos del país (<http://www.tropicos.org/Name/2712311?projectid=11>) el ejemplar usando para el estudio se colectó en el área rural de Zapatoca (Santander). Esta planta no está en el listado de plantas medicinales del Instituto Alexander von Humboldt (Bernal *et al.* 2011). *A. aff popayenensis* es un arbusto exclusivo de Colombia que crece rápidamente y merece seleccionarse para investigación sobre medicamentos de base natural para el dengue.

El extracto de *A. anguicida* presentó efecto antiviral sobre el VDEN-1, redujo la infección sobre células de riñón de mono y replicación del virus en hepatocitos humanos. En Colombia, esta planta se conoce con los nombres de capitana, waraara y curarín, se encuentra en la lista de plantas medicinales del Instituto Alexander von Humboldt. Las infusiones de la planta se usan en la medicina tradicional colombiana para tratamiento de la malaria una enfermedad que presenta síntomas similares al dengue. En otros países Latinoamérica, infusiones de hojas se usan para tratar distintas dolencias, entre ellas mordeduras de serpiente, dolores de estómago, prurito, diabetes y lavado de heridas (Cruz y Andrade-Cetto, 2015; Gómez-Estrada *et al.*, 2011; Heinrich, Chan, Wanke, Neinhuis y Simmonds, 2009; Pfeifer, 1966). *A. anguicida* merece seleccionarse para investigación sobre medicamentos de base natural para el dengue.

El estudio aporta dos nuevos puntos de partida para el descubrimiento de medicamentos de base natural para el dengue. Se requiere más investigación en el potencial farmacológico para el dengue de plantas de uso medicinal en Colombia.

Referencias Bibliográficas

- Abubakr, Md., Mandal, S., y Sugato, B. (2013). Natural Compounds against Flaviviral Infections. *Natural product communication*, 8 (10), 1487-1492.
- Akter, R., Uddin, S. J., Grice, I. D., & Tiralongo, E. (2014). Cytotoxic activity screening of Bangladeshi medicinal plant extracts. *Journal of natural medicines*, 68(1), 246-252.
- Allison, S. L., Schalich, J., Stiasny, K., Mandl, C. W., Kunz, C., y Heinz, F. X. (1995). Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *Journal of virology*, 69(2), 695-700.
- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., ... y Rollinger, J. M. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology advances*, 33(8), 1582-1614.
- Athar, M., Back, JH., Tang, X., Kim, KH., Kopelovich, L., Bickers, DR., y Kim, AL. (2007). Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 224(3), 274-283.
- Avelino-Flores, M. D. C., Cruz-López, M. D. C., Jiménez-Montejo, F. E., y Reyes-Leyva, J. (2015). Cytotoxic activity of the methanolic extract of *Turnera diffusa* Willd on breast cancer cells. *Journal of medicinal food*, 18 (3), 299-305.

- Avirutnan, P., Zhan, g L., Punyadee, N., Manuyakorn ,A., Puttikhunt, C., Kasinrerker, W.,... Diamond, MS. (2007). Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate. *PLos Pathogens*, 3 (11), 1798-1812.
- Balmaseda, A., Hammond, SN., Pérez, L., Tellez, Y., Saborío, SI., Mercado, JC.,... Harris, E. (2006). Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 74(3), 449-456.
- Beesetti, H., Khanna, N., y Swaminathan, S. (2014). Drugs for dengue: a patent review (2010–2014). *Expert opinion on therapeutic patents*, 24(11), 1171-1184.
- Bernal, H., García, H., Londoño, C., Molano, M., Quevedo, G., y Vázquez, C. (2011). Pautas para el conocimiento, conservación y uso sostenible de las plantas medicinales nativas en Colombia. Estrategia nacional para la conservación de plantas. Bogotá. Colombia: Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial 2011 e Instituto de Investigaciones de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Bhatt, S., Gething, P. Brady, O., Messina, J., Farlow, A., Moyes, C.,... Hay, S. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504-507.
- Bo, Y., Yuan, L. P., Zhang, J. J., Meng, D. D., Jing, H., y Dai, H. J. (2012). Total flavonoids of *Bidens bipinnata* L. a traditional Chinese medicine inhibits the production of inflammatory cytokines of vessel endothelial cells stimulated by sera from *Henoch–Schönlein purpura* patients. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64(6), 882-887.
- Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., Baronti, C., Canard, B., Cook, E.,.... y Bolognesi, M.(2010). Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Research*, 87(2), 125-48.

- Brady, O., Gething, P., Bhatt, S., Messina, J., Brownstein, J., Hoen, A..... y Hay, S. (2012). Refining the global spatial limit of dengue virus transmission by evidence- based consensus. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 6 (8), 1-15.
- Busschot, S., O'Toole, S., O'Leary, J., y Stordal, B. (2015). Non-invasive and non-destructive measurements of confluence in cultured adherent cell lines. *MethodsX*, 2, 8-13.
- Capelari-Oliveira, P., Paula, C. A. D., Rezende, S. A., Campos, F. T., Grabe-Guimarães, A., Lombardi, J. A., y Saúde-Guimarães, D. A. (2011). Anti-inflammatory activity of *Lychnophora passerina*, Asteraceae (Brazilian “arnica”). *Journal of ethnopharmacology*, 135(2), 393-398.
- Castañeda, C., Díaz, H., Alvis-Guzmán, N., Olarte, A., Rodriguez, H., Camargo, G... y De la Hoz, F. (2012). Economic evaluation: Burden of disease and economic impact of dengue and severe dengue in Colombia, 2011. *Value in health regional Issues*, 1(2), 123-128.
- Castro, M., Wilson, M., y Bloom, D. (2017) Disease and economic burdens of dengue. *The lancet-series*, 17(3), e70- e78.
- Catálogo de plantas vasculares del departamento de Antioquia, Colombia. (2017). *Ageratina popayanensis* (Hieron.) R.M. King y H. Rob. Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO. USA. Recuperado de: <http://www.tropicos.org/Name/2712311?projectid=11>
- Cepleanu, F., Hamburger, M. O., Sordat, B., Msonthi, J. D., Gupta, M. P., Saadou, M., y Hostettmann, K. (1994). Screening of tropical medicinal plants for molluscicidal, larvicidal, fungicidal and cytotoxic activities and brine shrimp toxicity. *International Journal of Pharmacognosy*, 32(3), 294-307.
- Chan, K., Watanabe, S., Kavishna, R., Alonso, S., y Vasudevan , SG. (2015). Animal models for studying dengue pathogenesis and therapy. *Antiviral Research*, 123, 5-14.

- Charan, J., Saxena, D., Goyal, J. P., y Yasobant, S. (2016). Efficacy and safety of Carica papaya leaf extract in the dengue: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 6(4), 249-254.
- Chaturvedi, D. (2011). Sesquiterpene lactones: structural diversity and their biological activities, In-Opportunity, Challanges and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry. *Research Signpost, Trivandrum*, 313-334.
- Che, P., Wang, L., y LI, Q. (2009). The development optimization and validation of an assay for high throughput antiviral drug screening against Dengue virus. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2(4), 363-373.
- Clere, N., Faure, S., Carmen Martinez, M., y Andriantsitohaina, R. (2011). Anticancer properties of flavonoids: roles in various stages of carcinogenesis. *Cardiovascular y Hematological Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Cardiovascular y Hematological Agents)*, 9(2), 62-77.
- Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. V., y Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(3), 290-302.
- Cruz, E. C., y Andrade-Cetto, A. (2015). Ethnopharmacological field study of the plants used to treat type 2 diabetes among the Cakchiquels in Guatemala. *Journal of ethnopharmacology*, 159, 238-244.
- Dalrymple, N. A., y Mackow, E. R. (2012). Roles for endothelial cells in dengue virus infection. *Advances in virology*, 2012(5),1-8.
- De-Oliveira-Pinto, L. M., Marinho, C. F., Pova, T. F., De Azeredo, E. L., De Souza, L. A., Barbosa, L. D. R., ... y Da Cunha, R. V. (2012). Regulation of inflammatory chemokine

- receptors on blood T cells associated to the circulating versus liver chemokines in dengue fever. *PloS one*, 7(7), e38527.
- Diamond, M. S., Edgil, D., Roberts, T. G., Lu, B., y Harris, E. (2000). Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *Journal of virology*, 74(17), 7814-7823.
- Dutra, R. C., Campos, M. M., Santos, A. R., y Calixto, J. B. (2016). Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological research*, 112, 4-29.
- Ferraz, R. P., Bomfim, D. S., Carvalho, N. C., Soares, M. B., da Silva, T. B., Machado, W. J., ... y Bezerra, D. P. (2013). Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). *Phytomedicine*, 20(7), 615-621.
- Gerets, H. H. J., Tilmant, K., Gerin, B., Chanteux, H., Depelchin, B. O., Dhalluin, S., y Atienzar, F. A. (2012). Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell biology and toxicology*, 28(2), 69-87.
- Germi, R., Crance, J. M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R. W., ... y Drouet, E. (2002). Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology*, 292(1), 162-168.
- Ghasemian, M., Owlia, S., y Owlia, M. B. (2016). Review of anti-inflammatory herbal medicines. *Advances in pharmacological sciences*, 2016, 1-11.
- Giovannini, P., y Howes, M. J. R. (2017). Medicinal plants used to treat snakebite in Central America: review and assessment of scientific evidence. *Journal of ethnopharmacology*, 199(6), 240-256.

- Gómez-Calderón, C., Mesa-Castro, C., Robledo, S., Gómez, S., Bolivar-Avila, S., Diaz-Castillo, F., y Martínez-Gutierrez, M. (2017). Antiviral effect of compounds derived from the seeds of *Mammea americana* and *Tabernaemontana cymosa* on Dengue and Chikungunya virus infections. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(57), 1-12.
- Gómez-Estrada, H., Díaz-Castillo, F., Franco-Ospina, L., Mercado-Camargo, J., Guzmán-Ledezma, J., Medina, J. D., y Gaitán-Ibarra, R. (2011). Folk medicine in the northern Coast of Colombia: an overview. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 7(27), 1-10.
- Green, A. M., Beatty, P. R., Hadjilaou, A., & Harris, E. (2014). Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. *Journal of molecular biology*, 426(6), 1148-1160.
- Guzmán, M. G., y Harris, E. (2015). Dengue. *The Lancet*, 385(9966), 453-465.
- Guzmán, M., Gubler, D., Izquierdo, A., Martinez, E., y Halstead, S. (2016). Dengue infection. *Nature reviews/ Disease Primers*, 2 (1), 1-25.
- Gyasi, R. M., Mensah, C. M., y Siaw, L. P. (2015). Predictors of traditional medicines utilisation in the Ghanaian health care practice: Interrogating the Ashanti situation. *Journal of Community Health*, 40(2), 314-325.
- Halstead, S. (2008). Dengue. Recuperado de <https://books.google.com.co/books?hl=esylr=yid=M127CgAAQBAJyoi=fndypg=PR7ydq=Dengue.+Tropical+Medicine:+Science+and+Practice.yots=vbVYW7qQS0ysig=SKLlDJaWlNftUq7VFRmq3WNFe0#v=onepageyq=Dengue.%20Tropical%20Medicine%3A%20Science%20and%20Practice.yf=false>.
- Heinrich, M., Chan, J., Wanke, S., Neinhuis, C., y Simmonds, M. S. (2009). Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2—a global

- assessment based on bibliographic sources. *Journal of ethnopharmacology*, 125(1), 108-144.
- Hernández-Castro, C., Diaz-Castillo, F., y Martínez-Gutierrez, M. (2015). Ethanol extracts of *Cassia grandis* and *Tabernaemontana cymosa* inhibit the in vitro replication of dengue virus serotype 2. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(2), 98-106.
- H Nilar, S., B Lakshminarayana, S., Ling Ma, N., H Keller, T., Blasco, F., & W Smith, P. (2016). Artificial Neural Network Analysis of Pharmacokinetic and Toxicity Properties of Lead Molecules for Dengue Fever, Tuberculosis and Malaria. *Current computer-aided drug design*, 12(1), 52-61.
- Hidari, K. I., Abe, T., y Suzuki, T. (2013). Carbohydrate-related inhibitors of dengue virus entry. *Viruses*, 5(2), 605-618.
- Huang, T. J., Chou, B. H., Lin, C. W., Weng, J. H., Chou, C. H., Yang, L. M., y Lin, S. J. (2014). Synthesis and antiviral effects of isosteviol-derived analogues against the hepatitis B virus. *Phytochemistry*, 99, 107-114.
- Idrees, S., y Ashfaq, U. A. (2013). RNAi: antiviral therapy against dengue virus. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3(3), 232-236.
- Instituto Nacional de Salud: INS. (2016-12). “Temas de interés: Enfermedades transmitidas por vectores: Dengue”. Recuperado de: <http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/paginas/dengue.aspx>.
- Instituto Nacional de Salud: INS y División de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública: DVARSP. (Diciembre, 2016) Boletín epidemiológico semanal: semana epidemiológica número 43. Recuperado de: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Paginas/default.aspx>

- Jain, M., Ganju, L., Katiyal, A., Padwad, Y., Mishra, K. P., Chanda, S., ... y Sawhney, R. C. (2008). Effect of Hippophae rhamnoides leaf extract against Dengue virus infection in human blood-derived macrophages. *Phytomedicine*, 15(10), 793-799.
- Jiang, W. L., Luo, X. L., y Kuang, S. J. (2005). Effects of Alternanthera philoxeroides Griseb against dengue virus in vitro. *Di 1 jun yi da xue xue bao= Academic journal of the first medical college of PLA*, 25(4), 454-456.
- Julander, J. G., Perry, S. T., y Shresta, S. (2011). Important advances in the field of anti-dengue virus research. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 21(3), 105-116.
- Kasture, P. N., Nagabhushan, K. H., & Kumar, A. (2016). A multi-centric, double blind, placebo controlled, randomized, prospective study to evaluate the efficacy and safety of Carica papaya leaf extract against dengue fever. *J Assoc Physicians India*, 64, 15-20.
- Kaufmann, B., y Rossmann, M. G. (2011). Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. *Microbes and infection*, 13(1), 1-9.
- Kiat, T. S., Pippen, R., Yusof, R., Ibrahim, H., Khalid, N., y Rahman, N. A. (2006). Inhibitory activity of cyclohexenyl chalcone derivatives and flavonoids of fingerroot, *Boesenbergia rotunda* (L.), towards dengue-2 virus NS3 protease. *Bioorganic y medicinal chemistry letters*, 16(12), 3337-3340.
- Klawikkan, N., Nukoolkarn, V., Jirakanjanakit, N., Yoksan, S., y Wiwat, C. (2010). Effect of Thai medicinal plant extracts against Dengue virus in vitro. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Science*, 38 (1-2), 13-18.

- Kogiannou, D. A., Kalogeropoulos, N., Kefalas, P., Polissiou, M. G., y Kaliora, A. C. (2013). Herbal infusions; their phenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory effects in HT29 and PC3 cells. *Food and chemical toxicology*, 61, 152-159.
- Krewski, D., Westphal, M., Al-Zoughool, M., Croteau, M. C., y Andersen, M. E. (2011). New directions in toxicity testing. *Annual review of public health*, 32, 161-178.
- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., ... y Baker, T. S. (2002). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, 108(5), 717-725.
- Kumar Sarangi, M., y Padhi, S. (2014). Dengue and Its Phytotherapy: A Review. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*, 4(1), 37-46.
- Kumar, S., Kumar, S., Rehman, I., Dhyani, P., Kumari, L., Acharya, S., ... y Kumar, A. (2012). Molecular herbal inhibitors of dengue virus: an update. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 2(1), 1-21.
- Lai, J. H., Lin, Y. L., y Hsieh, S. L. (2017). Pharmacological intervention for dengue virus infection. *Biochemical pharmacology*, 129, 14-25.
- Lasagna-Reeves, C., Gonzalez-Romero, D., Barria, M. A., Olmedo, I., Clos, A., Ramanujam, V. S., ... y Soto, C. (2010). Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 393(4), 649-655.
- Leardkamolkarn, V., Sirigulpanit, W., Phurimsak, C., Kumkate, S., Himakoun, L., y Sripanidkulchai, B. (2012). The inhibitory actions of *Houttuynia cordata* aqueous extract on dengue virus and dengue-infected cells. *Journal of Food Biochemistry*, 36(1), 86-92.

- Li, Y., Ooi, L. S., Wang, H., But, P. P., y Ooi, V. E. (2004). Antiviral activities of medicinal herbs traditionally used in southern mainland China. *Phytotherapy research*, 18(9), 718-722.
- Lim, S. P., Wang, Q. Y., Noble, C. G., Chen, Y. L., Dong, H., Zou, B., ... y Lescar, J. (2013). Ten years of dengue drug discovery: progress and prospects. *Antiviral research*, 100(2), 500-519.
- Lima, M. D. R. Q., Nogueira, R. M. R., Schatzmayr, H. G., de Filippis, A. M. B., Limonta, D., y dos Santos, F. B. (2011). A new approach to dengue fatal cases diagnosis: NS1 antigen capture in tissues. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 5(5), e1147. 1-8.
- Limon-Flores, A. Y., Perez-Tapia, M., Estrada-Garcia, I., Vaughan, G., Escobar-Gutierrez, A., Calderon-Amador, J., ... y Cedillo-Barron, L. (2005). Dengue virus inoculation to human skin explants: an effective approach to assess in situ the early infection and the effects on cutaneous dendritic cells. *International journal of experimental pathology*, 86(5), 323-334.
- Lin, Y. L., Liu, C. C., Chuang, J. I., Lei, H. Y., Yeh, T. M., Lin, Y. S., ... y Liu, H. S. (2000). Involvement of oxidative stress, NF-IL-6, and RANTES expression in dengue-2-virus-infected human liver cells. *Virology*, 276(1), 114-126.
- Lindenbach, B. D., y Rice, C. M. (2003). Molecular biology of flaviviruses. *Advances in virus research*, 59, 23-61.
- Lon, H. K., Liu, D., y Jusko, W. J. (2012). Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in inflammation. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, 40(4), 295-312.
- Lozano, M. (2010). Análisis del Origen de las Especies de Plantas Medicinales Aceptadas en el Vademecum de Colombia. Bogotá, Colombia. Presencia.
- Low, J. G., Ooi, E. E., & Vasudevan, S. G. (2017). Current Status of Dengue Therapeutics Research and Development. *The Journal of infectious diseases*, 215(suppl_2), S96-S102.

- Maas, M., Deters, A. M., y Hensel, A. (2011). Anti-inflammatory activity of *Eupatorium perfoliatum* L. extracts, eupafolin, and dimeric guaianolide via iNOS inhibitory activity and modulation of inflammation-related cytokines and chemokines. *Journal of ethnopharmacology*, 137(1), 371-381.
- Maneekan, P., Leaungwutiwong, P., Misse, D., y Luplertlop, N. (2013). T helper (Th) 1 and Th2 cytokine expression profile in dengue and malaria infection using magnetic bead-based bio-plex assay. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 44(1), 31-36.
- Manju, K., Jat, R. K., y Anju, G. (2017). A review on medicinal plants used as a source of anticancer agents. *International Journal of Drug Research and Technology*, 2(2), 6-12.
- Martina, B. E., Koraka, P., y Osterhaus, A. D. (2009). Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clinical microbiology reviews*, 22(4), 564-581.
- Medin, C. L., y Rothman, A. L. (2006). Cell type-specific mechanisms of interleukin-8 induction by dengue virus and differential response to drug treatment. *Journal of Infectious Diseases*, 193(8), 1070-1077.
- Meneses, R., Ocazonez, R. E., Martínez, J. R., y Stashenko, E. E. (2009a). Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication in vitro. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8(8), 1-6.
- Meneses, R., Ocazonez, R. E., y Torres, F. A. (2009b). Essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia: chemical composition, cytotoxicity and in vitro virucidal effect on the dengue virus. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, 3, 129-135.
- Ministerio de Salud. (Octubre 4 de 1993). Resolución 008430. Normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Bogotá. Colombia. Recuperado de:

<https://www.invima.gov.co/resoluciones-medicamentos/2977-resolucion-no-8430-del-4-de-octubre-de-1993.html>.

Ministerio de Salud y Protección social. (2008). Vademecum colombiano de plantas medicinales. Colombia. Recuperado de:

<http://www.minproteccionsocial.gov.co/VBeContent/library/documents/DocNewsNo17421DocumentNo6871.PDF>.

Motulsky, H. GraphPad Software. (1995-2016) GraphPad Prism version 6.00 for Windows. La Jolla California USA. Recuperado de: www.graphpad.com.

Mukherjee, P. K., Nema, N. K., Bhadra, S., Mukherjee, D., Braga, F. C., y Matsabisa, M. G. (2014). Immunomodulatory leads from medicinal plants. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 13(2). 235-256.

Muliawan, S. Y., Kit, L. S., Devi, S., Hashim, O., y Yusof, R. (2006). Inhibitory potential of *Quercus lusitanica* extract on dengue virus type 2 replication. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 37 (suppl 3), 132-135.

Nelson, J., McFerran, N. V., Pivato, G., Chambers, E., Doherty, C., Steele, D., y Timson, D. J. (2008). The 67 kDa laminin receptor: structure, function and role in disease. *Bioscience reports*, 28(1), 33-48.

Noble, C. G., Chen, Y. L., Dong, H., Gu, F., Lim, S. P., Schul, W., ... y Shi, P. Y. (2010). Strategies for development of dengue virus inhibitors. *Antiviral research*, 85(3), 450-462.

Ocazonez, R. E., Meneses, R., Torres, F. Á., y Stashenko, E. (2010). Virucidal activity of Colombian *Lippia* essential oils on dengue virus replication in vitro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(3), 304-309.

- Oishi, K., Saito, M., Mapua, C. A., y Natividad, F. F. (2007). Dengue illness: clinical features and pathogenesis. *Journal of Infection and chemotherapy*, 13(3), 125-133.
- Organización Mundial de la Salud: OMS. (2005). Manual de Bioseguridad en Laboratorio. Tercera edición. Ginebra. Suiza. Organización Mundial de la Salud.
- Padilla-s, L., Rodríguez, A., Gonzales, M. M., Gallego-g, J. C., y Castaño-o, J. C. (2014). Inhibitory effects of curcumin on dengue virus type 2-infected cells in vitro. *Archives of virology*, 159(3), 573-579.
- Padmavathy, J., y Devarajan, S. (2017). Natural product as a source of prodrug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12(2), 5-2017.
- PAHO-WHO (Pan American Health Organization and World Health Organization regional office for the Americans). (February 6, 2017). Number of reported cases of dengue and severe dengue (SD) in the Americans, by country: figures for 2016 (to week noted by each country). Epidemiological Week / EW 52. Recuperado de: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=6290&Itemid=40734&lang=en.
- Pajaro-Castro, N., Flechas, M. C., Ocazonez, R., Stashenko, E., y Olivero-Verbel, J. (2015). Potential interaction of components from essential oils with dengue virus proteins. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(3), 141-155.
- Pan, S. Y., Pan, S., Yu, Z. L., Ma, D. L., Chen, S. B., Fong, W. F., ... y Ko, K. M. (2010). New perspectives on innovative drug discovery: an overview. *Journal of Pharmacy y Pharmaceutical Sciences*, 13(3), 450-471.
- Panpanich, R., Sornchai, P., y Kanjanaratanakorn, K. (2006). Corticosteroids for treating dengue shock syndrome. *The Cochrane Library*, 3(3), 1-17.

- Parida, M. M., Upadhyay, C., Pandya, G., y Jana, A. M. (2002). Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on dengue virus type-2 replication. *Journal of ethnopharmacology*, 79(2), 273-278.
- Pascual, M. E., Slowing, K., Carretero, E., Mata, D. S., y Villar, A. (2001). *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of ethnopharmacology*, 76(3), 201-214.
- Pawitan, J. A. (2011). Dengue virus infection: predictors for severe dengue. *Acta Medica Indonesiana*, 43(2), 129-135.
- Pfeifer, H. W. (1966). Revision of the North and Central American hexandrous species of *Aristolochia* (Aristolochiaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 53(2), 115-196.
- Qadir, M. I., Abbas, K., Tahir, M., Irfan, M., Raza Bukhari, S. F., Ahmed, B., ... y Ali, M. (2015). Dengue fever: Natural management. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 28(2), 647-655.
- Qi, R. F., Zhang, L., y Chi, C. W. (2008). Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 40(2), 91-101.
- R Core Team. (2009-2016). R: A language and environment for statistical computing. Version 0.99.902. Vienna, Austria. Recuperado de: <https://www.R-project.org/>.
- Rasband, W.S. (1997-2016). ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. Recuperado de: <http://imagej.nih.gov/ij/>.
- Reis, S. R. I., Valente, L. M., Sampaio, A. L., Siani, A. C., Gandini, M., Azeredo, E. L., ... y Kubelka, C. F. (2008). Immunomodulating and antiviral activities of *Uncaria tomentosa* on human monocytes infected with Dengue Virus-2. *International immunopharmacology*, 8(3), 468-476.

- Retta, D., Dellacassa, E., Villamil, J., Suárez, S. A., y Bandoni, A. L. (2012). Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: a review. *Industrial Crops and Products*, 38, 27-38.
- Rodenhuis-Zybert, I. A., Wilschut, J., y Smit, J. M. (2010). Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and molecular life sciences*, 67(16), 2773-2786.
- Rodriguez, R. C., Galera-Gelvez, K., Yescas, J. G. L., y Rueda-Gallardo, J. A. (2015). Costs of dengue to the health system and individuals in Colombia from 2010 to 2012. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 19(4), 709-714.
- Rothman, A. L. (2011). Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nature reviews Immunology*, 11(8), 532-543
- Sabini, M. C., Cariddi, L. N., Escobar, F. M., Mañas, F., Comini, L., Reinoso, E., ... y Zanon, S. M. (2013). Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and apoptotic induction of an aqueous extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. *Food and chemical toxicology*, 60, 463-470.
- Samsa, M. M., Mondotte, J. A., Iglesias, N. G., Assunção-Miranda, I., Barbosa-Lima, G., Da Poian, A. T., ... y Gamarnik, A. V. (2009). Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathogens*, 5(10), e1000632.
- Sanchez, I., Gómez-Garibay, F., Taboada, J., y Ruiz, B. H. (2000). Antiviral effect of flavonoids on the dengue virus. *Phytotherapy Research*, 14(2), 89-92.
- San Martín, J. L., Brathwaite, O., Zambrano, B., Solórzano, J. O., Bouckenooghe, A., Dayan, G. H., y Guzmán, M. G. (2010). The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 82(1), 128-135.

- Sasaki, Y. F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., ... y Tsuda, S. (2002). The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 519(1), 103-119.
- Screaton, G., Mongkolsapaya, J., Yacoub, S., y Roberts, C. (2015). New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nature Reviews Immunology*, 15(12), 745-759.
- Senthilvel, P., Lavanya, P., Kumar, K. M., Swetha, R., Anitha, P., Bag, S., ... y Anbarasu, A. (2013). Flavonoid from *Carica papaya* inhibits NS2B-NS3 protease and prevents Dengue 2 viral assembly. *Bioinformation*, 9(18), 889-895.
- Shahneh, F. Z., Valiyari, S., Baradaran, B., Abdolalizadeh, J., Bandehagh, A., Azadmehr, A., y Hajiaghaee, R. (2013). Inhibitory and cytotoxic activities of *Salvia officinalis* L. extractoract on human lymphoma and leukemia cells by induction of apoptosis. *Advanced. Pharmaceuticall Bulletin*, 3(1), 51-55.
- Sharma, O. P., Dawra, R. K., Kurade, N. P., y Sharma, P. D. (1998). A review of the toxicosis and biological properties of the genus *Eupatorium*. *Natural Toxins*, 6(1), 1-14.
- Shepard, D. S., Coudeville, L., Halasa, Y. A., Zambrano, B., y Dayan, G. H. (2011). Economic impact of dengue illness in the Americas. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 84(2), 200-207.
- Shum, D., Smith, J. L., Hirsch, A. J., Bhinder, B., Radu, C., Stein, D. A., ... y Djaballah, H. (2010). High-content assay to identify inhibitors of dengue virus infection. *Assay and drug development technologies*, 8(5), 553-570.

- Siddiqui, A. A., Iram, F., Siddiqui, S., y Sahu, K. (2014). Role of natural products in drug discovery process. *International journal of drug development and research*, 6(2), 172-204.
- Silva, B. M., Sousa, L. P., Gomes-Ruiz, A. C., Leite, F. G., Teixeira, M. M., da Fonseca, F. G., ... y Bonjardim, C. A. (2011). The dengue virus nonstructural protein 1 (NS1) increases NF- κ B transcriptional activity in HepG2 cells. *Archives of virology*, 156(7), 1275-1279.
- Sood, R., Raut, R., Tyagi, P., Pareek, P. K., Barman, T. K., Singhal, S., ... y Sharma, N. (2015). *Cissampelos pareira* Linn: Natural source of potent antiviral activity against all four dengue virus serotypes. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(12), 1-20.
- Srikiatkhachorn, A. (2009). Plasma leakage in dengue haemorrhagic fever. *Thrombosis and Haemostasis*, 102(6), 1042-1049.
- Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., y Martínez, J. R. (2004). Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*, 1025(1), 93-103.
- Suksanpaisan, L., Susantad, T., & Smith, D. R. (2009). Characterization of dengue virus entry into HepG2 cells. *Journal of biomedical science*, 16(17), 1-13.
- Swamy, M. K., y Sinniah, U. R. (2015). A comprehensive review on the phytochemical constituents and pharmacological activities of *Pogostemon cablin* Benth.: an aromatic medicinal plant of industrial importance. *Molecules*, 20(5), 8521-8547.
- Talarico, L. B., Pujol, C. A., Zibetti, R. G. M., Faria, P. C. S., Nosedá, M. D., Duarte, M. E. R., y Damonte, E. B. (2005). The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antiviral research*, 66(2), 103-110.

- Talarico, L. B. (2008). La entrada del virus dengue a la célula como un potencial blanco antiviral: estudio de polisacáridos sulfatados como antivirales. *Química Viva*, 7(002), 113-133.
- Talhok, R. S., Karam, C., Fostok, S., El-Jouni, W., y Barbour, E. K. (2007). Anti-inflammatory bioactivities in plant extracts. *Journal of medicinal food*, 10(1), 1-10.
- Tang, L. I., Ling, A. P., Koh, R. Y., Chye, S. M., y Voon, K. G. (2012). Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants. *BMC complementary and alternative medicine*, 12(1), 1-10.
- Tassaneetrithep, B., Burgess, T. H., Granelli-Piperno, A., Trumpfheller, C., Finke, J., Sun, W., ... y Steinman, R. M. (2003). DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 197(7), 823-829.
- Teixeira, R. R., Pereira, W. L., Oliveira, A. F. C. D. S., da Silva, A. M., de Oliveira, A. S., da Silva, M. L., ... y de Paula, S. O. (2014). Natural products as source of potential dengue antivirals. *Molecules*, 19(6), 8151-8176.
- Thepparit, C., y Smith, D. R. (2004). Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *Journal of virology*, 78(22), 12647-12656.
- Tio, P. H., Jong, W. W., y Cardoso, M. J. (2005). Two dimensional VOPBA reveals laminin receptor (LAMR1) interaction with dengue virus serotypes 1, 2 and 3. *Virology journal*, 2(1), 1-11.
- Tong, X. K., Qiu, H., Zhang, X., Shi, L. P., Wang, G. F., Ji, F. H., ... y Zuo, J. P. (2010). WSS45, a sulfated α -D-glucan, strongly interferes with Dengue 2 virus infection in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31(5), 585-592.

- Universidad Industrial de Santander: UIS. (2007). Manual de gestión integrado. Procesos de la Universidad Industrial de Santander. NTC GP 1000:2009 – NTC ISO 9001:2008 -NTC ISO 14001:2004 – NTC OHSAS 18001:2007 - NTC 5906:2012. Bucaramanga. Colombia. Universidad industrial de Santander.
- Urbanowski, M. D., Ilkow, C. S., y Hobman, T. C. (2008). Modulation of signaling pathways by RNA virus capsid proteins. *Cellular signalling*, 20(7), 1227-1236.
- Velandia, M. L., y Castellanos, J. E. (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*, 15(1), 33-43.
- Velandia, S. A., Flechas, M. C., Stashenko, E. E., y Ocazonez, R. E. (2016). Propuesta para seleccionar aceites esenciales de plantas de Colombia para investigación con base en su citotoxicidad. *Vitae (01214004)*, 23(1). 18-29.
- Watterson, D., Modhiran, N., y Young, P. R. (2016). The many faces of the flavivirus NS1 protein offer a multitude of options for inhibitor design. *Antiviral research*, 130, 7-18.
- Whitehorn, J., Yacoub, S., Anders, K. L., Macareo, L. R., Cassetti, M. C., Van, V. C. N., ... y Simmons, C. P. (2014). Dengue therapeutics, chemoprophylaxis, and allied tools: state of the art and future directions. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(8), 1-6.
- World Health Organization: WHO. (2012). Dengue: a global threat –global answer. In: Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020. France. WHO.
- World Health Organization: WHO. (2015). Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Third WHO report on neglected tropical diseases 2015. Switzerland. World Health Organization.

- Xia, M., Huang, R., Witt, K. L., Southall, N., Fostel, J., Cho, M. H., ... y Tice, R. R. (2008). Compound cytotoxicity profiling using quantitative high-throughput screening. *Environmental health perspectives*, 116(3), 284-291.
- Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., y Piao, G. (2016). The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules*, 21(5), 559 (1-18).
- Zandi, K., Lani, R., Wong, P. F., Teoh, B. T., Sam, S. S., Johari, J., ... y AbuBakar, S. (2012). Flavone enhances dengue virus type-2 (NGC strain) infectivity and replication in Vero cells. *Molecules*, 17(3), 2437-2445.
- Zandi, K., Teoh, B. T., Sam, S. S., Wong, P. F., Mustafa, M. R., y AbuBakar, S. (2011). Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. *Virology journal*, 8(560), 1-11.
- Zhang, F., y Kramer, C. V. (2014). Corticosteroids for dengue infection. *The Cochrane Library*, (7), 1-55.
- Zhao, J., Pawar, R. S., Ali, Z., y Khan, I. A. (2007). Phytochemical investigation of *Turnera diffusa*. *Journal of natural products*, 70(2), 289-292.