Evaluación del potencial de *Lippia origanoides* kunth como fuente primaria para el desarrollo de un fitoterapéutico para tratamiento del dengue

Elizabeth Amparo Quintero Rueda

Trabajo de grado para optar por el Título de Magister en Ciencias Básicas Biomédicas

Orientadora:

Raquel E. Ocazionez Jiménez

Bacterióloga, Ph.D

Co-orientador:

Daniel Camilo Osorio Hurtado

Biólogo, Ph.D

Universidad Industrial de Santander
Facultad de Salud
Departamento de Ciencias Básicas
Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas
Bucaramanga
2022

Dedicatoria

A mis padres Luz Amparo y Carlos Alberto, mi familia muy especialmente a mi tía Celina, quienes siempre han estado junto a mí para apoyarme en todos los proyectos de mi vida.

"¡Nunca dejes que el miedo entorpezca tu camino! No tengas miedo de seguir adelante aun cuando parezca imposible, aun cuando digan que es imposible. No tengas miedo de ser independiente, de ser diferente, de equivocarte, de cometer y admitir errores, porque sólo quienes se atreven a fallar a lo grande pueden conseguir la grandeza."

Margaret Hamilton

Agradecimientos

En primer lugar, quiero expresar mi sincero agradecimiento a la profesora Raquel E. Ocazionez, quien con su experiencia y conocimientos me orientó en la investigación. Por sus consejos, enseñanzas y apoyo y por darme la oportunidad de ser miembro del grupo de investigación bajo su dirección.

Un agradecimiento especial a Daniel Osorio por su amistad, consejos, paciencia, conocimiento y colaboración en el proceso de aprendizaje y disponibilidad.

Agradezco a Sindi Alejandra Velandia, Lina Marcela Silva, Valentina Parra, Silvia Barrios y a todos mis compañeros del laboratorio por su paciencia, ayuda y buenos consejos.

A las bacteriólogas Herminia Ramírez y Marta Sánchez del Hemocentro de Santander del Hospital Universitario de Santander (HUS).

A Leidy Pico, por apoyarme cuando más la necesito, por extender su mano en momentos difíciles, por su cariño brindado cada día en tantos años de amistad, por mantener vivo el amor por la ciencia y los gatos.

A mi familia por su apoyo moral, económico y por su amor, por estar siempre presentes.

A la Universidad Industrial de Santander, por haberme brindado tantas oportunidades y enriquecerme en conocimiento.

Al proyecto # 9 del Programa Bio-Reto XXI 15:50, Programa Colombia Científica por el apoyo económico para concluir mis estudios en la maestría.

Tabla de contenido

Página

Introducción 12

1. Objetivos 17

1.1 General 17

1.2 Específicos 17

2. Marco teórico 18

2.1 Plantas en investigación de medicamentos para el dengue 18

2.2 El DENV 20

2.3 Proteínas celulares receptoras del DENV 25

2.4 Proteínas celulares con roles en producción de citoquinas 26

3. Metodología 31

3.1 Diseño del estudio 31

3.2 Muestras vegetales 32

3.3 DENV 33

3.4 Células 34

3.5 Ensayos de citotoxicidad 35

3.6 Experimento I: eficacia antiviral en célula Vero 36

3.7 Experimento II: modo de acción antiviral 37

3.8 Experimento III: efecto de la muestra sobre la producción de citoquinas 38

3.9 Análisis de acoplamiento molecular (*docking molecular*) 38

3.10 Análisis de datos 41

3.11 Consideraciones éticas 42

4. Resultados 43

4.1 Efecto antiviral de las muestras vegetales en célula Vero 43

4.2 Modo de acción antiviral de muestras de *L. origanoides* quimiotipo felandreno 45

4.3 Efecto del EXT-HD sobre citoquinas 49

4.4 Análisis de acoplamiento molecular 53

5. Discusión 70

6. Conclusiones 76

Referencias Bibliográficas 79

Apéndices 105

Lista de tablas

Página

Tabla 1. Muestras de *Lippia origanoides* seleccionadas para análisis……..32

Tabla 2. Efecto antiviral de muestras de quimiotipos de *Lippia origanoides* en célula Vero porcentaje de reducción del DENV-1-ECP……...43

Tabla 3. Potencia del efecto antiviral de muestras de *Lippia origanoides* quimiotipo felandreno de acuerdo con el tratamiento……...49

Tabla 4. Niveles de citoquinas de macrófagos humanos expuestos o no a DENV-1 y tratados con EXT-HD de *Lippia origanoides* / felandreno……...51

Tabla 5. Flavonoides encontrados en el extracto de *Lippia origanoides* con la mejor energía de enlace en el análisis de acoplamiento molecular para proteínas virales y celulares……66

Lista de figuras

Página

Figura 1. Componentes moleculares del Virus Dengue……...21

Figura 2. Diagrama de actividades realizadas durante el estudio……...……..32

Figura 3. Efecto antiviral de las muestras de *Lippia origanoides* en el ensayo de reducción de DENV-1-ECP……44

Figura 4. Efecto de muestras de *Lippia origanoides* quimiotipo felandreno sobre la viabilidad de células HepG-2. …….....45

Figura 5. Efecto de muestras de *Lippia origanoides* quimiotipo felandreno sobre DENV-1 antes y durante la adsorción a célula HepG-2…….. ……..46

Figura 6. Efecto de muestras de *Lippia origanoides* quimiotipo felandreno sobre DENV-1 después de la adsorción a células HepG-2. ……...……...47

Figura 7. Efecto del tratamiento con EXT-HD de *Lippia origanoides* /felandreno sobre la respuesta de citoquinas por macrófagos humanos…….....52

Figura 8. Efecto del tratamiento con EXT-HD de *Lippia origanoides* /felandreno sobre la producción de citoquinas por macrófagos humanos …….....53

Figura 9. Alineamiento estructural y trayectorias de simulaciones de relajación de las proteínas…….54

Figura 10. Mapa de calor de energías de interacción entre flavonoides del EXT-HD de *Lippia origanoides* y proteínas diana……55

Figura 11. Visualización tridimensional de la interacción entre flavonoides del extracto de *Lippia origanoides* y proteínas del DENV-1……..……..59

Figura 12. Visualización tridimensional de la interacción entre flavonoides del extracto

de *Lippia origanoides* y proteínas del macrófago que actúan como receptores del DENV-1…...62

Figura 13. Visualización tridimensional de la interacción entre flavonoides del extracto de *Lippia origanoides* y proteínas de la vía de señalización TLR-2/1 del macrófago……65

Lista de Apéndices

Apéndice A. Identificación y cuantificación por UHPLC-ESI (+)-Orbitrap-MS de compuestos fenólicos presentes en extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de biomasa residual de *Lippia origanoides* quimiotipo felandreno……..…105

Apéndice B. Identificación y cuantificación por UHPLC-ESI (+)-Orbitrap-MS de compuestos fenólicos presentes en extractos obtenidos con CO_2 supercrítico a partir de biomasa residual de *Lippia origanoides* quimiotipo felandreno……..……105

Apéndice C. Composición química cualitativa y cuantitativa de los aceites esenciales *Lippia origanoides*……..…106

Apéndice D. Energías de interacción (kcal/mol) con flavonoides de extractos de *Lippia origanoides* y proteínas de DENV-1……...…….107

Apéndice E. Energías de interacción (kcal/mol) con flavonoides de *Lippia origanoides* y proteínas celulares presentes en macrófagos humanos……...…….108

Resumen

Título: Evaluación del potencial de Lippia origanoides Kunth como fuente primaria para el desarrollo de un fitoterapéutico para tratamiento del dengue[1]

Autores: Quintero Rueda, Elizabeth; Osorio Hurtado, Daniel[2]; Ocazionez Jiménez, Raquel[3]

Palabras Clave: *Lippia origanoides*, extractos, virus Dengue, flavonoides, antiviral

Descripción:

El virus del dengue (DENV) es endémico en Colombia y causa muertes anualmente. No se ha descubierto un antiviral eficaz a pesar de la intensa investigación. Existe la necesidad de terapias que puedan acortar la duración y prevenir el desarrollo de una enfermedad grave, los estudios clínicos respaldan que la medicina herbaria puede ser eficaz para reducir el riesgo de dengue grave. El objetivo fue evaluar el potencial de *Lippia origanoides* Kunth, denominado "Orégano de Monte" en Colombia, como fuente primaria para el desarrollo de un fitoterapéutico para el dengue. Se incluyeron los quimiotipos felandreno, timol y carvacrol de *L. origanoides*. Se analizaron extracto hidroalcohólico (EXT-HD), extracto por fluido supercrítico CO_2 (EXT-FSC) y aceite esencial (AE) de cada quimiotipo. Los EXT y AE de *L. origanoides*-felandreno mostraron el mayor efecto inhibitorio sobre la replicación del virus *in vitro* en el ensayo de efecto citopático. El tratamiento con EXT y AE durante la adsorción viral fue el más efectivo para inhibir la replicación viral (IC_{50} < 25 µg/mL; IS > 10) según experimentos de adición de tiempo en células hepáticas humanas (HepG-2). Las células inmunitarias de sangre periférica humana estimuladas con DENV tratadas con EXT-HD (100 µg/mL) mostraron cambios (índice de cambio, IC) en la producción de citocinas implicadas en la respuesta antiviral inmunitaria innata: IL-1β (IC=1,71), IL-8 (IC=0,75) y RANTES (IC=0,62) aumentaron, aunque se observaron diferencias significativas para IL-1β (p < 0,01); y se observó una tendencia en la reducción de TNF-α (IC= -0,38; p=0,17). El análisis de acoplamiento reveló que 11 flavonoides presentes en EXT mostraron energías de acoplamiento < −7,5 kcal/mol tanto con DENV como con proteínas celulares receptoras de virus, lo que podría explicar los efectos sobre la replicación del virus y la producción de citocinas. **Conclusión:** el extracto *L. origanoides*- felandreno podría servir como punto de partida en estudios preclínicos centrados en el descubrimiento de una preparación herbal para la prevención de enfermedades graves en individuos infectados con DENV.

1 Trabajo de Grado
2 Universidad de Texas. Co-orientador: Daniel Osorio Ph.D
3 Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Orientadora: Raquel Ocazionez Ph.D.

Abstract

Title: Evaluation of the potential of *Lippia origanoides* Kunth as a primary source for the development of a phytotherapeutic for the treatment of dengue[1]

Authors: Quintero Rueda, Elizabeth; Osorio Hurtado, Daniel[2]; Ocazionez, Jiménez, Raquel[3]

Key Words: *Lippia origanoides*, extracts, Dengue virus, flavonoids, antiviral

Description:

Dengue virus (DENV) is endemic in Colombia causing many dengue cases and deaths annually. An effective antiviral has not been discovered despite intensive research. There is a need for therapies that can shorten the duration of dengue and prevent the development of severe disease, clinical studies support the view that herbal medicine may be efficacious in reducing the risk of severe dengue. The aim of this work was to evaluate the potential of *Lippia origanoides* Kunth, called ‘‘Oregano del Monte’’ in Colombia, as a primary source for development of a phytotherapeutic for dengue. Phellandrene, thymol, and carvacrol chemotypes of *L. origanoides* were included. Hydroalcoholic extract (HD-EXT), supercritical fluid CO2 extract (SFC-EXT), and essential oil (EO) from each chemotype were analyzed. EXTs and EO from *L. origanoides* phellandrene chemotype showed the highest inhibitory effect on virus replication *in vitro* in the DENV-cytopathic effect assay. Treatment with EXTs and EO from *L. origanoides* phellandrene during viral adsorption was the most effective treatment to inhibit virus replication (IC_{50} < 25 µg/mL; IS >10) according to time-addition experiments in liver human cells (HepG-2). DENV-stimulated human peripheral blood immune cells treated with HD-EXT (100 µg/mL) showed changed (index change, IC) in production of cytokines involved in innate immune antiviral response: IL-1β (IC=1.71), IL-8 (IC=0.75) and RANTES (IC=0.62) increased although significant differences were observed for IL-1β ($p < 0.01$); and a tendency in TNF-α reduction (IC= -0.38; p=0.17) was observed. Docking analysis revealed that 11 flavonoids present in EXTs shown binding energy affinity/dock score < − 7.5 kcal/mol with both DENV and virus-receptor cell proteins, which could explain effects on virus replication and cytokine production. Conclusion: Extract from *L. origanoides* phellandrene chemotype could serve as a starting point in preclinical studies focused on discovery of an herbal preparation for prevention of severe disease in DENV-infected individuals.

1 Degree work
2 Texas University. Thesis co-advisor: Daniel Osorio Ph.D
3 facultad de Salud. Escuela de Medicina. Thesis advisor: Raquel Ocazionez Ph.D.

Introducción

El dengue es causado por el Virus Dengue (DENV) y es la arbovirosis más prevalente en el mundo (Harapan *et al*., 2020). En América Latina y el Caribe, el número de casos incrementó ocho veces en la última década, de 505,430 en el año 2000 a 4.2 millones en el 2019; y el número de muertes de 960 en el año 2000 a 4,032 en el 2015 (WHO,2020). Colombia ocupa los primeros lugares en la lista de países con alta endemia de dengue (Gutierrez-Barbosa *et al*., 2020), con tasas de incidencia entre 250 y 500 casos por 100,000 habitantes en la última década, las últimas epidemias ocurrieron en 2010, 2013 y 2019 con más de 100,00 casos en cada año; además, la tasa de mortalidad incrementó notoriamente de 2% hasta 14% en 2016, muy superior comparado con la tasa promedio de países de las Américas y el Caribe.

Actualmente no hay fármacos eficaces para tratamiento del dengue. Durante décadas se viene intentando el descubrimiento de un antiviral; esto es, un compuesto o molécula que bloquee la acción de una proteína, del virus o la célula huésped, indispensable para la producción de progenie viral (Nasar *et al*., 2020). Aunque se han descubierto decenas de inhibidores del DENV, ninguno cumplió con parámetros de eficacia en el ensayo preclínico para merecer ser evaluado en un ensayo clínico (Troost & Smit, 2020). También se han evaluado fármacos descubiertos para tratamiento de otras enfermedades, como por ejemplo estatinas, balapiravir y cloroquina, y ninguno mostró eficacia terapéutica en ensayos clínicos (Lai *et al*., 2017; Whitehorn *et al*., 2014 Nguyen *et al*., 2013).

Las preparaciones herbales se han usado por siglos para aliviar una amplia variedad de enfermedades. El extracto (EXT) o aceite esencial (AE) de hojas y tallos de plantas medicinales se usan para elaborar fitoterapéuticos. Estos medicamentos contienen compuestos de diversas estructuras químicas que pueden interactuar simultáneamente con distintos blancos (Ghosh, 2016).

Existe evidencia científica del efecto profiláctico o curativo de los fitoterapéuticos para tratamiento de diversas enfermedades humanas incluidas las causadas por virus (Ti *et al*., 2021; Tarkang *et al*., 2016). La eficacia de estos medicamentos se explica porque sus componentes químicos pueden bloquear simultáneamente proteínas del virus y la célula con roles importantes en la producción de progenie viral y en la respuesta inmune inflamatoria aberrante que contribuye al daño de los tejidos del infectado.

El tratamiento del dengue con fitoterapéuticos es una práctica de varios países del sudeste asiático; no obstante, hoy día no existe alguno recomendado para uso por la Organización Mundial de la Salud. La eficacia terapéutica del EXT de hojas de *Carica papaya* ha sido el más validado científicamente, en modelos *in vitro* se han demostrado efectos antiviral e inhibitorio de la activación de plaquetas (Rajapakse *et al*., 2019). Diferentes estudios han documentado que la exacerbada activación de la plaqueta resulta en trombocitopenia y respuesta inflamatoria aberrante, ambos eventos son informativos de severidad del dengue (Singh *et al*., 2020; Ojha *et al*., 2017). Recientemente se publicaron los resultados de un estudio clínico piloto (limitado número de pacientes) que evaluó la eficacia terapéutica de tabletas elaboradas con el EXT de *Carica papaya* (Sathyapalan *et al*., 2020). En pacientes tratados se observaron signos de mejoría y se concluyó que se requiere un estudio más robusto para concluir sobre la eficacia terapéutica.

En Colombia, la carencia de fármacos eficaces para tratamiento del dengue obliga a los pacientes a recurrir a las preparaciones herbales para aliviar síntomas y con la expectativa de prevenir hospitalización. Productos naturales para aminorar los síntomas del dengue se ofrecen en droguerías y tiendas naturistas. No obstante, hoy día no se cuenta con un fitoterapéutico aprobado por el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA). Más aún, la fitoterapia para el dengue no está integrada a la medicina convencional como ya existe en varios

países (Singh & Rawat, 2017a). El limitado desarrollo de la fitoterapia en Colombia se debe en gran parte a la escasa investigación científica sobre el potencial farmacológico de plantas de la medicina tradicional.

Información documentada de propiedades farmacológicas para el dengue de plantas de la medicina tradicional colombiana es muy limitada. En una revisión exhaustiva de bases bibliográficas se encontraron solo tres artículos. Gómez-Calderón y Col. (2017) documentaron eficacia antiviral *in vitro* del EXT de dos especies de plantas de la Región Caribe, aunque fue necesario usar 100 µg/mL lo cual sugiere leve efecto antiviral. En nuestro laboratorio hemos analizado EXT de varias especies, algunos presentaron eficacia antiviral *in vitro* a concentraciones < 50 µg/mL (datos no publicados). Nuestro grupo documentó el efecto antiviral *in vitro* de AEs de distintas especies incluyendo algunas del género *Lippia* (Ocazionez *et al*., 2010).

El conocimiento del potencial estratégico de la flora colombiana es de interés para varios sectores económicos del país, la investigación en actividades biológicas de productos obtenidas de las plantas medicinales y aromáticas para las industrias de medicamentos y cosméticos del país, es dirigido por la Prof. Dra. Elena Stashenko del Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas de la Universidad Industrial de Santander (CROM-MASS/UIS). Información del programa BioReto se encuentra en el portal (https://www.youtube.com/watch?v=jwy_xxMpIkE&t=48s). Una línea de investigación del programa se enfoca en el estudio del potencial de EXT de plantas medicinales como fuente primaria para el desarrollo de fitoterapéuticos para tratamiento del dengue, *Lippia origanoides* H.B.K (Familia Verbenaceae) es una de las especies seleccionadas.

L. origanoides es una planta aromática, que crece de forma silvestre desde México hasta Argentina, con mayor presencia en la región amazónica de Brasil, Venezuela y Colombia (Oliveira *et al*., 2007). En América Central y Brasil, preparaciones a base de *L. origanoides* se usan para

tratamiento de enfermedades respiratorias como gripe, bronquitis, tos y asma, para tratamiento de trastornos gastrointestinales como dolor de estómago, nauseas e indigestión, y como antiséptico para heridas. El AE se utiliza como condimento, preservante de alimentos y aromatizante natural (Hernandes *et al*., 2017; Pascual *et al*., 2001). El potencial farmacológico de *L. origanoides* ha sido validado científicamente, el EXT ha mostrado efecto antimicrobiano y antinflamatorio debido a que inhibe la vía de señalización NF-κB (Raman *et al*., 2017). Flavonoides presentes en el EXT como quercetina, naringenina y luteolina han mostrado efecto inhibitorio sobre la replicación del DENV en distintos modelos *in vitro* (Sinha *et al*., 2018; Frabasile *et al*., 2017). El AE contiene *trans*-β-cariofileno, carvacrol y timol, componentes que presentan actividades antimicrobianas, antimicóticas y antiinflamatoria (Cho *et al*., 2017; Bedoya *et al*., 2015; Souza *et al*., 2014).

L. origanoides es conocida en Colombia como "orégano de monte" y ha sido una de las plantas más estudiadas por el grupo CROM-MASS de la UIS (Stashenko *et al*., 2014, 2013, 2010, 2008). Análisis *in vitro* realizados en nuestro laboratorio revelaron que el AE inhibe la replicación del DENV (Ocazionez *et al*., 2010) y también de su homólogo el virus de la fiebre amarilla (Gómez *et al*., 2013).

El presente proyecto de investigación se realizó anidado al Proyecto # 9 del Programa Bio-Reto y aporta nuevo conocimiento sobre el potencial de *L. origanoides* como fuente primaria para descubrimiento de fitoterapéuticos para el dengue. Usando un protocolo guiado, se identificó una muestra de la planta con eficacia *in vitro* antiviral y se evaluó la eficacia *in vitro* de esta muestra para modular (reducir o incrementar) la respuesta de citoquinas en macrófagos humanos estimulados con DENV. Además, se realizaron análisis de acoplamiento molecular entre componentes químicos de las muestras vegetales y proteínas del DENV y la célula huésped. Este

análisis se realizó para predecir modos de acción de la muestra activa e identificar fitoquímicos que puedan servir como punto de partida en el descubrimiento de antivirales sintéticos.

1. Objetivos

1.1 General

Evaluar el potencial de *L. origanoides* como fuente primaria para el desarrollo de un fitoterapéutico para tratamiento del dengue.

1.2 Específicos

1. Identificar las muestras más activas comparando el efecto antiviral *in vitro* de EXTs y AEs de quimiotipos distintos de la planta.
2. Inferir el modo de acción antiviral de las muestras más activas, comparando el efecto de tratamientos que varían respecto al momento de adsorción del virus a la célula.
3. Determinar el efecto de la muestra vegetal más activa sobre la respuesta de citoquinas de macrófagos activados por el DENV.
4. Inferir el potencial farmacológico de la muestra vegetal más activa, comparando patrones de acoplamiento molecular de sus componentes químicos con proteínas del DENV y del macrófago.

2. Marco teórico

2.1 Plantas en investigación de medicamentos para el dengue

EXT de plantas han sido científicamente validados como fuente de fitoterapéuticos para el tratamiento del dengue (Wang *et al*., 2020; Singh & Rawat, 2017). Dos estudios preclínicos son los más citados. El efecto de un EXT liofilizado de las hojas de *Carica papaya* fue evaluado en ratones A129 (Norahmad *et al*., 2019; Mohd Abd Razak *et al*., 2018), el estudio demostró que el EXT redujo la expresión de genes de citoquinas inflamatorias como CCL6, CCL8, CCL12, CCL17, IL1R1, ILIRN / IL1Ra, NAMPT/ PBEF1 y PF4 / CXCL4; sin embargo, el tratamiento no redujo los niveles séricos de la proteína viral NS1 que es un indicador de la replicación del DENV. La eficacia terapéutica del EXT de *Cissampelos pareira*, una planta de la India, fue evaluada en ratones (Sood *et al*., 2015), el estudio demostró que el tratamiento redujo la viremia producida por los cuatro serotipos del DENV, pero no se pudo evaluar el efecto sobre la respuesta inflamatoria aberrante debido a que la cepa de ratón porta una mutación de un gen clave de la respuesta inmune antiviral.

Los EXT son mezclas de distintos compuestos químicos en especial flavonoides (Panche *et al*., 2016). Estos compuestos poseen una gran diversidad estructural, pero comparten un esqueleto de carbono con dos anillos de benceno conectados a través de un anillo de pireno heterocíclico (Maleki *et al*., 2019). La amplia variabilidad en estructura química contribuye a su capacidad para interactuar con múltiples componentes moleculares de patógenos y células blanco en los tejidos del cuerpo humano (Ghildiyal *et al*., 2020; Ullah *et al*., 2020; Efferth & Koch, 2011). Flavonoides derivados de extractos de *Scutellaria baicalensis*, *Persea americana*, *Nephelium lappaceum*, *Psidium guajava* y *Houttuynia cordata* han demostrado potencial como fuente primaria para desarrollar fármacos para tratamiento del dengue (Liao *et al*., 2021; Wu *et al*., 2019;

Trujillo-Correa *et al*., 2019; Abdul Ahma *et al*., 2017; Chiow *et al*., 2016). Baicaleina y baicalina asilados de *S. baicalensis* inhibieron la producción de IL-1β, IL-6, IL-8 y TNF-α por macrófagos estimulados con DENV mediante la inhibición de vías de señalización MAPK, Akt, NF-κB y JAK-STAT (Liao *et al*., 2021). Un flavonoide (THHY) de *Persea americana* inhibió la replicación *in vitro* de DENV-2 e incrementó la respuesta celular antiviral aumentando la expresión de genes OAS y PKR de la respuesta al interferón; y se ha reportado que flavonoides interactúan con receptores tipo Toll, quinasas Janus de la vía de señalización JAK/STAT e interferones (Wu *et al*., 2019). El potencial de flavonoides para interactuar con proteínas virales también ha sido reportado; De Sousa & Col. (2015) encontraron en estudios *in silico* e *in vitro* dos flavonoides con potencial anti-dengue, agatisflavona y miricetín inhibieron la proteasa viral NS3/NS2B a concentraciones de 11 y 4.7 μM, respectivamente.

Los AEs son mezclas de hidrocarburos y sus derivados oxigenados surgen de dos vías de isoprenoides diferentes, contienen monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanoides principalmente, lo cual les confiere un amplio espectro de mecanismos de acción (Sharifi-Rad *et al*., 2017). Los AE de diferentes especies vegetales contienen más de 200 componentes que les confiere propiedades farmacológicas (Aziz *et al*., 2018), para prevenir y tratar diversas enfermedades infecciosas del tracto respiratorio, sistema digestivo, piel y enfermedades del sistema nervioso (Ali *et al*., 2015).

Investigaciones demuestran el efecto virucidal de AEs sobre virus patógenos para humanos que poseen envoltura similar a la del DENV entre los que se incluyen Virus Herpes Simple, Virus Influenza, Virus de la Inmunodeficiencia Humana (Ma & Yao, 2020) y recientemente el SARS-CoV-2 (Asif *et al*., 2020). Existe evidencia científica demostrando que los AE también inactivan el virus del DENV y Virus de la Fiebre Amarilla (García *et al*., 2010; Meneses *et al*., 2009).

Resultados de experimentos *in vitro* y análisis *in silico* sugieren que los AEs contienen terpenos que podrían bloquear la fusión de la envoltura viral con la membrana celular y bloquean la adsorción del virus a la célula (Pájaro-Castro *et al*., 2015; Ocazionez *et al*., 2010). Los AEs se consideran una alternativa terapéutica para tratar enfermedades que tienen una base inmunopatogénica como el dengue debido a sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (Valdivieso-Ugarte *et al*., 2019). El tratamiento con AE reduce la producción de citoquinas y mediadores proinflamatorios IL-6, IL-1β, IL-8 y TNF-α en experimentación *in vitro* e *in vivo*; además, incrementan niveles de citoquinas categorizadas como antiinflamatorias, como el caso de IL-10 (Valdivieso-Ugarte *et al*., 2019; De Lavor *et al*., 2018; Aoe *et al*., 2017).

2.2 El DENV

El DENV está conformado por una cápside icosaédrica rodeada por una membrana lipídica (envoltura viral) derivada de la célula. El genoma es ARN monocatenario de polaridad positiva que trascribe una poliproteína la cual se fragmenta en 10 proteínas individuales (Tomar *et al*., 2017; Figura 1). Las proteínas E, (envoltura), C (cápside), prM/M (membrana) forman la partícula viral (virión) y las siete proteínas restantes se conocen como no estructurales (NS) dado que no forman parten de la partícula viral. Se conocen cuatro serotipos del virus (DENV-1,-2,-3 y -4), DENV-1 ha sido el predominante en Colombia causando la mayoría de casos severos en la última década (Carreño *et al*., 2019; Villar *et al*., 2015).

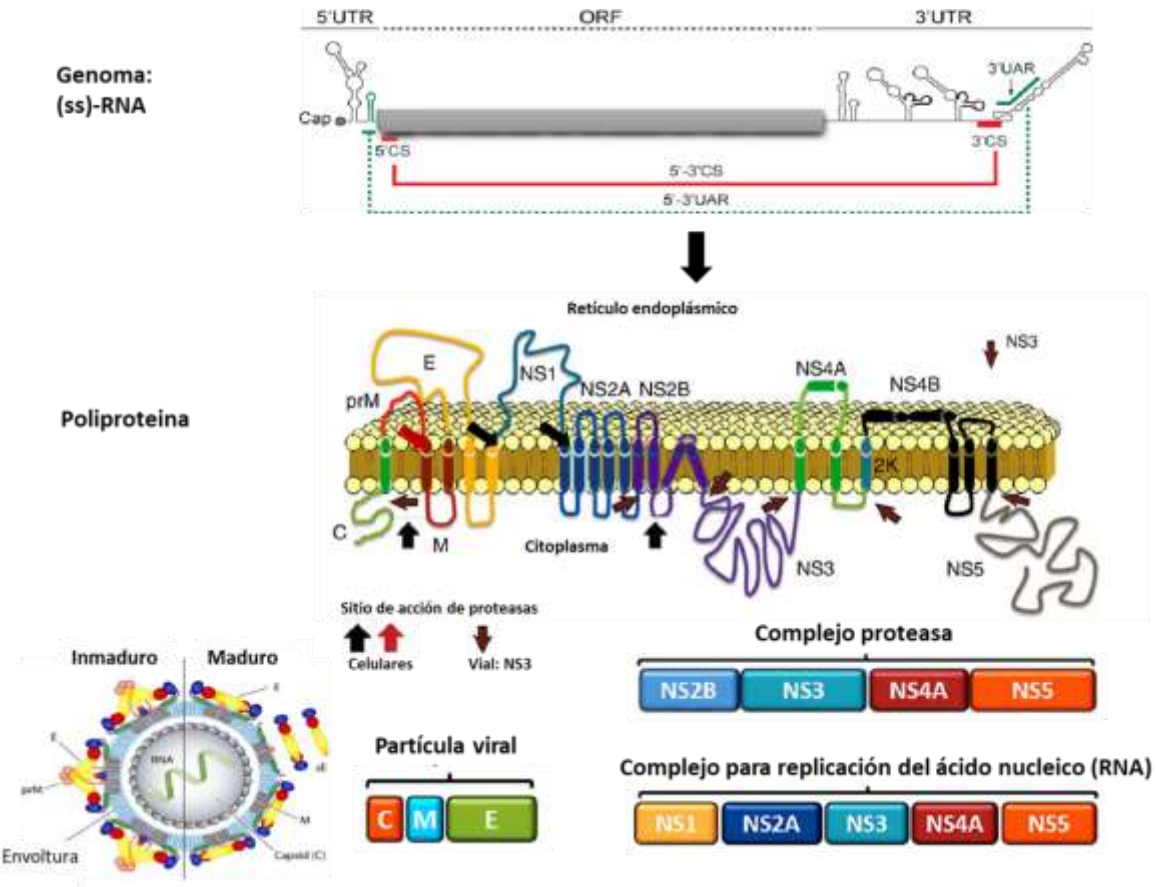


Figura 1. Componentes moleculares del Virus Dengue. Modificado de: Tomar *et al*. 2017, *Viral Proteases and Their Inhibitors*, p. 173-161. Heinz & Stiasny, 2017, *Microbiol Mol Biol Rev*, 81, p. 1-27.

Las proteínas del DENV se han estudiado extensivamente y este conocimiento ha permitido seleccionarlas como blancos antivirales (Nasar *et al*., 2020). A continuación, se describen las propiedades relevantes de cada proteína:

Proteína E. Es el componente mayoritario de la envoltura viral y por esto es responsable de la unión del virus a proteínas receptoras de la célula expuestas en su superficie durante la internalización del citoplasma (Slon Campos *et al*., 2017). Está formada por tres dominios (DI, DII y DIII) conectados por regiones de bisagras que median cambios conformacionales durante el ciclo replicativo viral. DI se encuentra en la región central de la proteína anclado en un lado por el DII y en el otro lado por el DIII (Modis *et al*., 2004). Como dominio central, DI estabiliza la

orientación de la proteína y participa en los cambios conformacionales que orienta la penetración del virus al interior de la célula. Entre la región bisagra de DI-DII se encuentra el bolsillo βOG que es esencial para fusión de la envoltura viral con la membrana de la célula (Tambunan *et al*. 2015). DIII es un dominio conservado que interactúa con proteínas celulares receptoras y contiene epítopos que estimulan la producción de anticuerpos neutralizantes (Nasar *et al*., 2020; Zhang *et al*., 2017).

Proteína prM. Se denomina proteína precursora de membrana, está presente en los viriones inmaduros y junto con la proteína E participa en el proceso de maduración del virión. prM forma trímeros con la proteína E lo cual crea una apariencia de "picos" en el virión (Zhang *et al*., 2012). En el compartimiento *trans*-Golgi, la proteasa celular furina escinde prM para generar la proteína M madura, lo que da como resultado el reordenamiento de los trímeros de la proteína E que forman la estructura icosaédrica lisa del virión maduro (Wahala *et al*., 2011).

Proteína C. Es el componente de la cápside y por lo mismo juega un papel importante en la protección del ARN viral participando en el ensamblaje de viriones (Nasar *et al*., 2020). Posee cuatro hélices α: α1-α3 componen el núcleo del monómero y α4 se extiende fuera del núcleo (Byk & Gamarnik, 2016). Las hélices α3 y α4 son hidrofóbicas y anclan la proteína a la membrana del retículo endoplasmático (RE), mientras que la hélice α1 posee aminoácidos básicos que se asocian al ARN formando la nucleocápside que protege al ARN viral de la degradación y promueve la organización del ARN en el interior de la partícula viral (Schneemann, 2006).

Proteína NS1 es una glicoproteína multifuncional que se transloca en el lumen del RE de forma co-translacional (Muller & Young, 2013). Dentro del RE, NS1 se dimeriza rápidamente tras la adición de carbohidratos con alto contenido de manosa, se localiza en sitios de replicación viral y membrana plasmática y es secretara al torrente sanguíneo (Muller & Young, 2013). La mayor

parte de NS1 secretada es un hexámero formado por tres dímeros. El dímero contiene tres dominios: el dominio β-roll formado por dos láminas β entrelazadas de naturaleza hidrofóbica que interactúa con la membrana del RE y con otras proteínas virales transmembrana; dominio Wing, formado por un subdominio α/β que se conecta con β-roll; y el dominio β-ladder formado por 18 láminas antiparalelas ensambladas en una hoja β continua que se extiende a lo largo de toda la longitud del dímero. Las puntas distales de β-ladder y los bucles del dominio Wing apuntan hacia afuera y se exponen al solvente (Scaturro *et al*., 2015). NS1 secretada y de la membrana tienen importancia en la evasión inmunitaria por unión a proteínas del complemento y modula eventos tempranos de la replicación viral. NS1 secretada se utiliza para diagnóstico de dengue.

Complejo NS3/NS2. NS3 es multifuncional, es decir, en el dominio N-terminal actúa como serina proteasa mientras que en el dominio C-terminal como ARN helicasa que participa en la replicación del genoma y la síntesis del ARN viral (Nasar *et al*., 2020). El dominio N- se asocia con la proteína NS2B (15 kDa) la cual actúa como cofactor y es responsable de la actividad de proteasa. El complejo NS3/NS2B se escinde co y postraduccional en la membrana del RE y su asociación es esencial para el plegamiento y la actividad proteasa adecuada (Tomar *et al*., 2017).

NS4A y NS4B son pequeñas proteínas hidrófobas. NS4A induce alteraciones de la membrana del RE que son importantes para la replicación del virus. NS4B ayuda a la replicación del ARN viral a través de su interacción directa con NS3 y bloquea la transducción de señales inducida por el interferón. NS4A y NS4B se unen por una región C-terminal de 23 residuos denominada “fragmento 2K”, es escindida por NS3/NS2B para producir NS4A y 2K-NS4B, este último se dirige al lumen del RE, que luego se escinde de NS4B por una proteasa celular (Gopala-Reddy *et al*., 2018). Estas proteínas son de importancia porque participan en el reordenamiento de la membrana para facilitar la formación del complejo de replicación viral (Nasar *et al*., 2020).

Proteína NS5. Es la más conservada entre la población viral (Lim *et al*., 2015). El dominio MTasa del extremo N-terminal posee actividad enzimática metiltransferasa y guanidiltransferasa, responsable de la metilación del extremo 5´ del ARN genómico, mientras que el dominio RdRp en el extremo C-terminal, es una enzima esencial para el proceso de replicación del DENV (Nasar *et al*., 2020). Tiene subdominios de dedos y pulgar que forman canales para la entrada del ARN molde en el sitio activo (Picarazzi *et al*., 2020).

Resultados de varios estudios muestran que el DENV es capaz de infectar células de la piel incluidos macrófagos, células dendríticas, queratinocitos, células endoteliales, fibroblastos y mastocitos (Begum *et al*., 2019). Varias células en los ganglios linfáticos se encontraron infectadas por DENV y probablemente apoyan la replicación del virus entre ellas, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas (García *et al*., 2017). DENV se recupera de células de hígado (Basilio de Oliveira *et al*., 2005; Jessie *et al*., 2004). DENV ha sido detectado en biopsias de hígado en casos fatales (King *et al*., 2020). El tropismo del DENV por las células mencionadas está determinado en gran parte por la presencia de moléculas expuestas en la superficie celular conocidas como receptores del virus (Cruz-Oliveira *et al*., 2015). Existe suficiente evidencia científica demostrando el papel de varias moléculas receptoras, siendo las más reconocidas: DC-SIGN (en inglés dendritic cell-scpecific ICAM-3-grabbing non-integrin); el receptor de manosa, proteínas de choque térmico HSP90 y HSP70 (heat shock protein); la proteína regulada por glucosa GRP78 entre otras (Ahammad *et al*., 2019; Sprokholt *et al*., 2017; Cruz-Oliveira *et al*., 2015).

El ciclo replicativo del DENV comprende varias etapas: (i) adsorción del virión a la célula mediante interacción entre la proteína E y proteínas celulares receptoras mencionadas; (ii) internalización del virión por endocitosis mediada por clatrina; (iii) fusión entre la envoltura viral y membrana celular mediada por cambio conformacional de la proteína E inducido por el pH ácido

del endosoma; (iv) liberación de la nucleocápside en el citoplasma; (v) síntesis de componentes del virus; el ARN se traduce en una poliproteína que es fragmentada por proteasas del virus y la célula en las 10 proteínas individuales mencionadas; se forma el complejo de replicación del ARN viral conformado por las proteínas NS; (vi) ensamblaje de la partícula viral, se realiza en balsas de lípidos sobre las membranas del RE, se forma la nucleocápside que se rodea de membrana del retículo que contiene proteínas E y prM; (vii) el virión con envoltura es transportado a la membrana citoplasmática a través de la vía secretora siendo blanco de una proteasa celular (furina) que escinde un péptido de la proteasa prM; y (viii) el virión maduro (con proteína M) es excretado por la célula (Screaton *et al*., 2015; Rodenhuis-Zybert *et al*., 2010).

2.3 Proteínas celulares receptoras del DENV

Es conocido que proteínas de la célula huésped y proteínas de la envoltura del DENV interactúan durante las fases tempranas del ciclo viral (adsorción y penetración). Numerosos estudios presentados en varias revisiones (Begum *et al*., 2019a, 2009b., Cruz-Oliveira *et al*., 2014); proponen varios receptores dependiendo de la célula, con base en afinidad e interacción con la proteína E del virus. En células dendríticas (CD) y células endoteliales de ganglios linfáticos, las lectinas tipo C conocidas como CD209 (DC-SIGN) y CD209L (L-SIGN), en el dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD), ligan proteína E (aminoácido Asn67 tiene rol importante).

Monocitos y macrófagos (Mϕ) de órganos linfoides, pulmón, hígado y piel; y monocitos de sangre periférica son células donde el DENV se replica produciendo progenie y en ellas se han identificado varios receptores (Begum *et al*., 2019b; Jhan *et al*., 2017; Cerny *et al*., 2014). Proteínas de choque térmico HSP90 y HSP70, que interactúan con la proteína E o partícula completa de

DENV; estudios demuestran que pretratamiento de monocitos con anticuerpos anti-HSP90 y anti-HSP70 redujo la infección por DENV (Reyes-Del Valle *et al*., 2005). Otros receptores propuestos son el receptor de manosa (CD205); proteína asociada a CD14; y proteínas CLEC-5, AXL, TIM1. Estas proteínas son traductores de señales de activación, sobrevivencia, diferenciación de monocitos en Mϕ y fagocitosis (Begum *et al*., 2019; Sprokholt *et al*., 2017).

La proteína 78 regulada por glucosa (GRP78) se considera otro receptor celular del DENV (Royle *et al*., 2020). Se expresa en varias células, es la proteína chaperona residente predominantemente en retículo endoplasmático facilitando el plegamiento y ensamblaje de proteínas nacientes y previniendo el transporte de proteínas plegadas incorrectamente. En células de hígado infectadas con DENV, GRP78 se incrementa como respuesta de estrés inducida por la replicación del virus (Ibrahim *et al*., 2019; Wati *et al*., 2009).

2.4 Proteínas celulares con roles en producción de citoquinas

Se ha demostrado que citoquinas y quimioquinas como TNF-α, IL-8 e IL-1β se encuentran en niveles elevados en pacientes con dengue grave (Bhatt *et al*., 2021). Existe evidencia que TNF-α e IL-1β causan directamente fuga vascular (Kamaladasa *et al*., 2016; Hottz *et al*., 2014), mientras que ambas junto con IL-8 y otras son potentes citoquinas inflamatorias producidas por diferentes células inmunes (Tang *et al*., 2020). Las células del sistema inmune innato, junto con las células epiteliales y endoteliales, son responsables de la activación temprana de la respuesta inflamatoria al DENV.

Las CD y monocitos tienen numerosos sensores de virus, incluidos los receptores tipo Toll (TLR) y receptores RLR como el gen I inducido por ácido retinoico (RIG-1). Estos receptores detectan y responden a una variedad de productos DENV, incluidos ARN viral y proteínas, así

como a patrones moleculares asociados al peligro derivados de tejidos (DAMP), liberados por células estresadas e infectadas (Rehwinkel *et al*., 2020). Después de la unión del DENV a la célula, TLR o RLR activan cascadas de señalización intracelular que inducen respuestas proinflamatorias. La regulación de esta respuesta es crucial, ya que se sabe que la liberación exacerbada de mediadores proinflamatorios desencadena efectos adversos que incluyen la activación inflamatoria endotelial excesiva, permeabilidad vascular y manifestaciones hemorrágicas como las que se observan en pacientes con dengue grave (Onomoto *et al*., 2021).

TLR2 se expresa en la superficie de las células inmunes, la especificidad de unión al ligando de TLR2 está modulada por la heterodimerización con: TLR1 o TLR6 y moléculas co-estimuladoras CD14 y CD3. La interacción de DENV con TLR2 conduce a la activación de la vía NF-κB, aumento de la expresión génica y liberación de citoquinas que impulsan la inflamación como, entre otros, IL-1β y TNF-α (Aguilar-Briseño *et al*., 2020; Barbalat *et al*., 2009). TLR2, junto con sus co-receptores CD14 y TLR6, es un sensor innato de partículas DENV que inducen la expresión de citocinas inflamatorias y deterioran la integridad vascular *in vitro* (Kieser & Kagan, 2017). El bloqueo de TLR2 antes de la infección por DENV de células mononucleares de sangre periférica previene la activación del endotelio vascular humano, lo que sugiere un papel potencial de la respuesta de TLR2 en la integridad vascular. La expresión de TLR2 en monocitos $CD14^{++}$ aislados en fase aguda de pacientes pediátricos infectados con DENV se correlaciona con el desarrollo de una enfermedad grave. En conjunto, estos datos identifican un papel de TLR2 en la infección por DENV y proporcionan información sobre la compleja interacción entre el virus y los receptores innatos que pueden ser la base de la patogénesis de la enfermedad (Aguilar-Briseño *et al*., 2020).

La unión de DENV con TLR2 induce el acoplamiento entre monómeros de TLR1 o TLR6 y estos dímeros reclutan a la proteína MAL (MyD88-adaptor-like) que acopla la proteína MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88) (Horng *et al*., 2002). MyD88 se acopla a las quinasas IRAK (interleukin-1 receptor (IL-1R) associated kinase) formando el complejo MyD88-IRAK4-IRAK2 (Myddosoma) y esto resulta en la activación del factor NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) que activa genes de citoquinas (Aguilar-Briseño *et al*., 2020; Oliveira-Nascimento *et al*., 2012).

Por otra parte, los RLR son sensores de ARN localizados en el citosol. Esta familia de proteínas comprende tres miembros: RIG-I, proteína asociada a la diferenciación de melanoma 5 (MDA5) y laboratorio de genética y fisiología 2 (LGP2) (Yoneyama *et al*., 2005). Todos los RLR tienen un dominio helicasa central y un dominio carboxilo-terminal (CTD). RIG-I y MDA5 son activados por ARN viral, y luego experimentan cambios conformacionales que exponen y multimerizan sus dominios de activación y reclutamiento de caspasas (CARD), lo que permite interacciones CARD-CARD homotípicas con MAVS (Mitochondrial antiviral-signaling protein). MAVS está anclado con su domino transmembranal C-terminal a las membranas asociadas a mitocondrias (MAM) y peroxisomas, y transmite la señal a la quinasa 1 de unión a TANK (TBK1) y la quinasa IκB-ε (IKKε). Estos a su vez activan el factor regulador de interferón 3 (IRF3) y el IRF7, que junto con NF-κB inducen la expresión de interferones tipo I y otros genes (Rehwinkel *et al*., 2020). RIG-I y MDA5 participan en la respuesta inmune innata y adaptativa contra DENV, y dirigirse a estos receptores tiene el potencial de disminuir la fiebre hemorrágica en los pacientes. Estudios en cultivo celular han demostrado que el DENV es reconocido tanto por RIG-1 como por MDA5, y las fosfatasas PP1α y PP1γ son necesarios para la respuesta del interferón de tipo I (Wies *et al*., 2013; Loo *et al*., 2008).

Una vez producida la respuesta a la detección de ARN viral, el IFN de tipo I secretado se une a los dominios extracelulares de su receptor afín (IFNAR1 / 2) expresado en la misma célula o en células vecinas. Es importante destacar que la mayoría de los tipos de células responden a los IFN de tipo I debido a la expresión casi omnipresente de IFNAR1 / 2 (Lazear *et al*., 2019). El IFNAR está asociado con tirosina quinasas y Janus quinasa que fosforilan los dominios intracelulares del IFNAR, lo que permite el acoplamiento del transductor de señal y los activadores (STAT1 y STAT2) que se translocan al núcleo y acoplan el factor de transcripción IRF9. Este complejo hetero-trimérico llamado factor 3 del gen estimulado por interferón (ISGF3) se une a los elementos de respuesta estimulados por IFN (ISRE) en la regulación positiva de su transcripción y traducción (Coldbeck-Shackley *et al*., 2020; Ngono & Shresta, 2018). Los ISG codifican diversas proteínas que llevan a cabo una serie de funciones efectoras o reguladoras, incluidas las proteínas que bloquean el ciclo replicativo del DENV (Schoggins, 2019). Otras proteínas activan linfocitos T y B y en consecuencia la inmunidad de tipo adaptativo que deja células de memoria inmunológica contra el DENV, algunas de las cuales producen anticuerpos que neutralizan el virus (Ngono & Shresta, 2018). Diferentes estudios indican que el sistema del interferón tipo I es el mediador central de la protección contra DENV, por ejemplo, muestras de pacientes infectados con DENV han demostrado que, durante el periodo febril temprano, los pacientes contienen niveles altos de interferones tipo I en el suero (Becquart *et al*., 2010), y la expresión del interferón tipo I es prominente en el perfil transcripcional de células mononucleares de sangre periférica (Sun *et al*., 2013; Tolfvenstam *et al*., 2011).

Los linfocitos T $CD8^+$ pueden controlar la infección viral por mecanismos como la citotoxicidad sobre la célula infectada y la producción de citoquinas como TNF-α e IFN-γ (Tian *et al*., 2019). Los linfocitos T-$CD4^+$ controlan la infección incrementando la activación de

linfocitos $CD8^+$ y B, aumentan la producción de citoquinas como IFN-γ e IL-4 y promueven la respuesta de memoria (Tian *et al*., 2016). Estudios han demostrado que las células T-$CD4^+$ y $CD8^+$ confieren inmunidad de larga duración contra la infección con DENV, además pueden proliferar y producir IFN-γ y lisar células infectadas (Tian *et al*., 2019).

3. Metodología

3.1 Diseño del estudio

Se plantearon dos hipótesis que pretendía evaluar el estudio, la primera fue si el extracto y aceite esencial de *L. origanoides* posee eficacia antiviral *in vitro* que varía con respecto al quimiotipo de la planta y tipo de tratamiento y la segunda, si el tratamiento de macrófagos humanos estimulados con virus dengue con *L. origanoides* incrementa la producción de citoquinas de la respuesta antiviral innata. Las actividades se enfocaron en identificar la muestra de *L. origanoides* con el mayor potencial como fuente primaria para desarrollar un fitoterapéutico para el dengue. La figura 2 presenta el diagrama de actividades desarrolladas. Se incluyeron para estudio muestras (EXTs y AEs) de tres quimiotipos (felandreno, timol, carvacrol) de la planta. Inicialmente, las muestras se analizaron simultáneamente para efecto antiviral en célula Vero, las más activas se seleccionaron para otros análisis y las otras se excluyeron del estudio. Las muestras activas se analizaron simultáneamente en célula HepG-2 para evaluar el modo de acción antiviral. La muestra con mayor efecto antiviral en HepG-2 se seleccionó para evaluar el efecto sobre la producción de citoquinas por Mϕ humanos estimulados con DENV. Los componentes químicos de la muestra más activa se seleccionaron para análisis de predicción de la afinidad de cada uno con proteínas del DENV y proteínas de la célula con roles importantes en el ciclo viral y en la respuesta de citoquinas por el Mϕ.

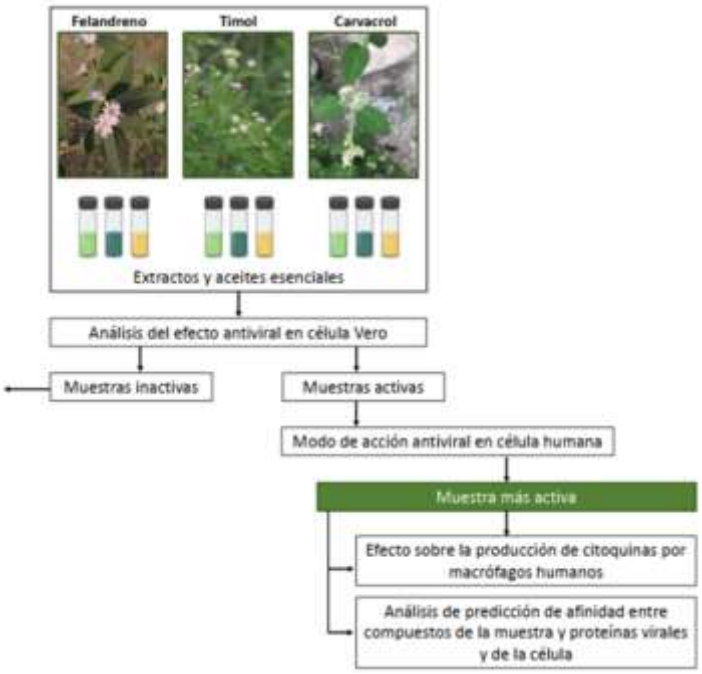


Figura 2. Diagrama de actividades realizadas durante el estudio

3.2 Muestras vegetales

Preparaciones crudas de EXTs y AEs (n=9) obtenidas de ejemplares de *L. origanoides* de cultivos experimentales controlados del complejo piloto en el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), Universidad Industrial de Santander, sede Bucaramanga. La tabla 1 presenta las muestras seleccionadas para análisis.

Tabla 1. Muestras de *Lippia origanoides* seleccionadas para análisis

Tipo	Identificador	Quimiotipo			Total
		Felandreno	Carvacrol	Timol	
Extracto hidroalcohólico	EXT-HD	1	1	1	3
Extracto supercrítico	EXT-FSC	1	1	1	3
Aceite esencial	AE	1	1	1	3
Total		3	3	3	9

Las muestras vegetales fueron obtenidas para análisis en proyectos del Programa Bio-Reto XXI 15:50 por el Centro de Investigación en Biomoléculas (CIBIMOL) de la UIS y bajo la dirección de la profesora Dra. Elena Stashenko. EXT hidroalcohólico (EXT-HD) se obtuvo mediante extracción asistida por ultrasonido, EXT supercrítico (EXT-FSC) se obtuvo por el método de fluido supercrítico y el AE por hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MVHD) y destilación a presión reducida. Detalles sobre los procedimientos para obtener las muestras se encuentran publicados (Arias *et al*., 2020; Stashenko *et al*., 2010).

De cada muestra se hizo una preparación concentrada ($1x10^5$ µg/mL) en dimetilsulfóxido (DMSO), se pasó a través de un filtro Millipore (0,2 µM) para eliminar microorganismos incluidos virus y alícuotas de cada preparación se almacenaron a -20°C. Una alícuota de la misma preparación se usó para cada experimento.

La composición química de cada muestra se realizó en nuestro laboratorio del Centro de Espectrometría y Cromatografía de Masas (CROM-MASS) en la UIS y bajo la dirección de la profesora Dra. Elena stashenko. El análisis se realizó por cromatografía de gases y líquida acoplada a espectrometría de masas (GC/MS y LC/MS). Detalles de los procedimientos técnicos y datos de los componentes químicos están publicados (Arias *et al*., 2020, Stashenko *et al*., 2013). Las tablas 1 a 3 suplementarias presentan la composición química de las muestras analizadas.

3.3 DENV

Se usó una cepa de referencia (C.D.C. EUA) del serotipo 1 del virus, DENV-1 Hawaii. El virus fue propagado en células *Aedes albopictus* (C6/36 HT) y el sobrenadante se sometió a ultra-centrifugación para concentrar las partículas virales siguiendo el protocolo descrito por Jensen *et al*., 2016. La preparación viral se almacenó en alícuotas a -80°C. El título viral [unidades

formadoras de placa (u.f.p) /mL] se determinó por plaqueo siguiendo el protocolo rutinario del laboratorio (Meneses *et al*., 2009.)

3.4 Células

Líneas celulares. HepG-2 (ATCC® CRL-997™), derivadas de hígado humano; las células se cultivaron en medio DMEM-High Glucose (Gibco, Co. USA), suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF, Gibco, Co, USA) y antibiótico (P/E: Penicilina/Estreptomicina (Invitrogen Carlsbad, CA). Vero (ATCC® CCL-81™), de riñón de mono verde africano. Las células se cultivaron en medio MEM (Gibco, CO, USA) suplementado con 10% de SBF y P/E.

Mϕ humanos. Se obtuvieron del contenido leucoplaquetar (buffy-coat) de sangre periférica donado por el Hemocentro de Santander de la E.S.E Hospital Universitario de Santander. El nombre del donante de cada preparado se desconoció. La preparación se diluyó con tampón fosfato salino (PBS) en una proporción 1:1, se adicionó cuidadosamente en tubos de centrífuga de 50 mL que contenían solución Lymphodex (Inno-train, Diagnostik GmbH, Alemania) para separación por gradiente de densidad. Los tubos se centrifugaron durante 30 min a 900 x g. y la fase intermedia que contenía las células se colectó, lavó dos veces con PBS y luego se centrifugó durante 15 min a 600 x g. El número de células recuperadas se determinó por el método de Neubauer y la viabilidad celular mediante el método de exclusión con azul de tripano. Las células se almacenaron en nitrógeno líquido en medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, Co, USA), suplementado con 90% de SBF y PE/E.

El cultivo de Mϕ se realizó siguiendo protocolos descritos (Jin & Kruth, 2016; Chen & Wang, 2002). Brevemente, células ($5x10^5$ por pozo) se sembraron en placa de 48 pozos en medio RPMI-1640, 10% SBF y se incubaron durante 3 h a 37°C; CO_2 5%. Luego se retiró el medio, se lavó las células y se agregó medio de cultivo que contenía 10% de glicoproteína GM-CSF (Factor

estimulante de colonia de granulocitos y macrófagos); 10% SBF y 1% P/E, y las células se incubaron 24 h a 37°C; CO_2 5%. Las células adherentes a la superficie del soporte de cultivo son en su mayoría macrófagos. Las células no-adherentes se retiraron reemplazando el medio de cultivo por medio fresco, el procedimiento se realizó cada dos días durante 1 semana. Las monocapas de Mϕ se usaron para el experimento descrito adelante.

3.5 Ensayos de citotoxicidad

Antes de realizar cada experimento se determinó la concentración máxima de la muestra que no afecta la viabilidad del cultivo celular (CMNT) y así controlar interferencia de daño celular inducido por la misma muestra.

Ensayo de cristal violeta (ECV). Se usó con cultivos de células Vero y HepG-2 debido a que son adherentes y la captura del colorante se puede cuantificar. Se siguió el protocolo descrito por Feoktistova *et al*., (2016). Las células se cultivaron 24 h en placas de 96 pozos a 37°C; 5% CO_2 hasta observar monocapa celular confluente (~24 h). Luego el medio se reemplazó por medio al 2% SBF que contenía la muestra y las placas se incubaron 72 h a 37°C; CO_2 5%. Células tratadas con DMSO (desde 1% a 10%) se incluyeron como control positivo de citotoxicidad y células sin tratamiento (con muestra o DMSO) se incluyeron como control no-tratado. De cada muestra se analizaron siete concentraciones (desde 8 µg/mL hasta 512 µg/mL), cada una por triplicado. La viabilidad celular se determinó por tinción con cristal violeta (0.5%) como sigue: a cada pozo se adicionó 50 µL del colorante por 20 min a temperatura ambiente, el exceso de colorante se retiró lavando con PBS cuatro veces y luego la placa se dejó secar por 2 h a temperatura ambiente. Luego, el colorante retenido por la célula se liberó adicionando a cada pozo 200 µL de metanol (100%) y la placa se incubó 20 min a temperatura ambiente. La intensidad de color se midió en un

espectrofotómetro de placa (Multiskan Go Thermo Fisher Scientific, USA) a longitud de onda de 570 nm. Cada muestra se analizó en tres ensayos independiente.

Ensayo de MTT. Se usó con cultivos de macrófagos debido a que no forman monocapa confluente. Se siguió el protocolo descrito (Velandia *et al*., 2016). Brevemente, las células se trataron como se describió arriba (ECV) excepto que se usaron siete concentraciones (entre 4 µg/mL y 300 µg/mL). Para determinar la viabilidad celular, se adicionó una solución (5mg/mL) de MTT (Promega, Madinson EE. UU) a cada pozo (20 µL), la placa se incubó a 4 h a 37°C y luego se adicionó DMSO (100 µL) para detener la reacción. La intensidad del color se midió a 580 nm en un espectrofotómetro de placa. Cada muestra se analizó en tres ensayos independientes.

3.6 Experimento I: eficacia antiviral en célula Vero

Las nueve muestras vegetales se analizaron en el ensayo de reducción del efecto citopático inducido por el virus (DENV-ECP). Se optimizó un protocolo usando como referencia lo descrito por Smee *et al*., 2002. DENV-1 (10.000 u.f.p) se absorbió por 1 h sobre células crecidas en placa de 96 pozos, luego se adicionó medio de cultivo (2% SBF) que contenía la muestra vegetal y al virus se le permitió replicar 5 días a 37°C; 5% CO_2. Al termino, se determinó la viabilidad celular por tinción con cristal violeta como se describió antes. Células tratadas con dextrán sulfato de sodio (DSS: 30 µg/mL) se incluyeron como control positivo de efecto antiviral y células infectadas no-tratadas con material vegetal se incluyeron como control infectado no-tratado. De cada muestra se analizaron seis concentraciones (desde 2.3 hasta 77.5 µg/mL) por triplicado y en tres ensayos independientes. El efecto antiviral de la muestra se expresó como el porcentaje de reducción DENV-ECP respecto al control infectado no-tratado, el cual se calculó con la siguiente fórmula: % R-DENV-ECP = (CT) x 100 / C, donde C es la media de los valores del control y T es la media de los valores de cada medida de tratamiento con la muestra de prueba.

3.7 Experimento II: modo de acción antiviral

Se usaron células hepáticas humanas (HepG-2) que son blanco de la infección natural del DENV y por lo mismo secretan proteína NS1 (Rabelo *et al*., 2017) crecidas en placas de 96 pozos por cerca de 18 h antes del experimento. De cada muestra se analizaron seis concentraciones desde 3.12 µg/mL a 100 µg/mL) por triplicado y en tres experimentos independientes. Se realizaron tres tratamientos que se diferenciaron en el momento que el virus fue expuesto a la muestra vegetal:

Tratamiento antes de la adsorción: Evaluó la capacidad de la muestra para inactivar directamente el virus (actividad virucida). Brevemente, DENV-1 (20.000 u.f.p.) se incubó con la muestra por 2 h a 37°C, la mezcla (inóculo) se adicionó a la célula por 1 h a 37°C; 5% CO_2, luego el inóculo se retiró, se adicionó medio fresco sin muestra y al virus se le permitió replicar 72 h. Virus no-tratado (incubado en medio de cultivo) y virus tratado con antiviral de referencia DSS se incluyeron como controles. El nivel de proteína NS1 en el medio de cultivo se determinó por ELISA con el estuche (PanBio Dengue Early Elisa-Alere™ Diagnostics).

Tratamiento durante la adsorción. Evaluó la capacidad de la muestra para bloquear la adsorción del virus a la célula. Brevemente, DENV-1 (20.000 u.f.p.) suspendido en medio de cultivo que contenía la muestra (inóculo) se adicionó a la célula, 1.5 h después se retiró el inóculo, se adicionó medio fresco sin muestra y al virus se le permitió replicar por 72 h a 37°C; 5% CO_2. Al termino, se colectó el medio de cultivo para determinar el nivel de proteína NS1 usando el estuche de ELISA.

Tratamiento después de la adsorción. Evaluó la capacidad de la muestra para bloquear la replicación intracelular del virus. Brevemente, DENV-1 (20.000 u.f.p.) se adicionó a la célula por 1.5 h para adsorción, después se retiró el inóculo, se adicionó medio freso que contenía la muestra

y al virus se le permitió replicar 72 h a 37°C; 5% CO_2. Al término, se colectó el medio de cultivo para determinar el nivel de proteína NS usando un estuche de ELISA.

3.8 Experimento III: efecto de la muestra sobre la producción de citoquinas

Mϕ (500.000 células/pozo) cultivados en placas de 48 pozos se expusieron a DENV-1 (7,142 u.f.p.) por 2,5 h; al término, el virus se retiró, las células se lavaron y se cultivaron en medio de cultivo con EXT (50 µg/mL y 100 µg/mL) por 72 h. Células no-expuestas al virus / no-tratadas; células expuestas al virus tratadas con fármaco dexametasona (100 µM); y células tratadas con lipopolisacárido bacteriano (LPS, *Escherichia coli*) se corrieron en paralelo. El nivel de TNF-α, IL-1β, IL-8 y RANTES en el medio de cultivo se colectó para determinar usando estuches comerciales de ELISA (Invitrogen KHC3011, 88-7261, EHRNTS y KAC13001). Cada concentración de la muestra se analizó por duplicado en tres experimentos independientes.

3.9 Análisis de acoplamiento molecular (*docking molecular*)

Compuestos químicos: Las estructuras tridimensionales de los compuestos presentados en la Tabla suplementaria 2 y 3 se descargaron de las bases de datos ZINC® (http://zinc.docking.org/: Irwin *et al.,* 2012) y PubChem (Kim *et al*., 2020). Se incluyeron compuestos de referencia, es decir, con afinidad con las proteínas del DENV y de la célula mencionadas adelante: galato de epigalocatequina (EGCG) y baicaleina como inhibidores de proteínas DENV (Raekiansyah *et al*., 2018; Zandi *et al*., 2013); celastrol (triterpeno) como inhibidor de la vía TLR2, MyD88 y NF-κB (Cascao *et al*., 2017; Yu *et al*., 2017), prednisolona (glucocorticoide) como fármaco inmunosupresor y modulador de citoquinas (Li *et al*., 2017). Los compuestos se prepararon asignándoles hidrógenos polares y cargas de Gasteiger a cada átomo siguiendo el protocolo recomendado por el programa AutoDock Tools. Las estructuras se guardaron en formato PDBQT.

Proteínas DENV: Cuatro proteínas se descargaron de la base de datos RSBC Protein Data Bank (código de acceso PDB): NS1 (4OIG), complejo NS2B/NS3 (3L6P), NS5 región MTasa (5IKM) y región RdRp (2J7U). Las proteínas E, prM y C se modelaron debido a que la estructura cristalizada no se encuentra disponible en RSBC Protein Data Bank. El modelamiento de E se hizo usando como molde la secuencia de aminoácidos de la misma proteína de DENV-2 (D6MQ38_9FLAV) y se realizó una modificación del archivo PDB utilizando el programa Swiss PDB Viewer con la función mutation and rotation (Guex & Peitsch, 1997). El modelamiento de las proteínas prM y C se hizo por homología utilizando las secuencia de aminoácidos Q8V1L5_9FLAV y G4XX71_9FLAV (base de datos de UniProtK) usando el portal web Swiss-Model (Waterhouse *et al*., 2018) y los moldes fueron las mismas proteínas cristalizadas de DENV-2 (prM, PDB3C5X; C, PDB1R6R) (Li *et al*., 2008; Ma *et al*., 2004). Los mejores modelos presentaron porcentaje de identidad mayor al 70%. La similaridad estructural entre la proteína modelada y el molde se determinó mediante superposición de estructuras utilizando el software libre PyMOL 1.7.0 (Schrodinger, LLC. 2010). Los modelos se evaluaron teniendo en cuenta el diagrama de Ramachandram, a través del servidor web MolProbity (Williams *et al*., 2018). Valores mayores a 90% de los residuos de aminoácidos bajo la región favorecida fueron considerados un buen modelo (Wiltgen, 2018). La calidad de los modelos fue evaluada en el programa ProSA. En ProSA, el puntaje Z indica la calidad general del modelo y mide la desviación de la energía total de la estructura con respecto a una distribución de energía derivada de conformaciones aleatorias reportadas en el PDB (Wiederstein & Sippl, 2007). Puntajes Z inferiores a 1 se consideraron como un modelo energéticamente estable.

Proteínas del Mϕ: Expuestas en la superficie de la célula y que virus DENV ocupa durante la adsorción: HSP90/70, (W6G-5AQZ); GRP78, (6EOC); DC-SIGN, (1K9I); RIG-1, (2YK6) y

MAVS, (2V6Q). Proteínas componentes de vías de transducción de señales que regulan la producción de citoquinas: TLR-2/1, (2Z7X); complejo MyD88-IRAK2-IRAK4, (3MOP); y NF-κB, (1NFI).

Optimización de las proteínas. Las proteínas fueron optimizadas eliminando moléculas de solvente y ligandos co-cristalizados a través del software PyMOL 1.7.0 seguido de minimización de energía hasta 1000 kJ/ mol / nm utilizando el campo de fuerza OPLS-AA incluido en el paquete de GROMACS 5.0 (Abraham *et al*., 2015). El sistema fue solvatado dentro de una caja cúbica, utilizando el modelo de agua SPC-216 (simple point charge). Las cargas de cada complejo fueron neutralizadas con 900 mM de NaCl. Se llevó a cabo una minimización de energía para obtener estructuras biológicamente más estables en condiciones homeostáticas en humanos, es decir, condiciones isotérmicas e isobáricas a temperatura constante de 310.15 K (NVT) y presión de 1 bar (NPT) para 1 ns de simulación. A cada proteína se le agregaron cargas de Kollman para cada átomo, y los átomos de hidrógenos no polares se fusionaron con la estructura de la proteína empleando Autodock Tools (Morris *et al*., 2009). Luego, las estructuras se guardaron en formato de archivo PDBQT para el análisis de acoplamiento. Las simulaciones de relajación se analizaron a través del cálculo de la desviación cuadrática media (RMSD). Valores de RMSD entre 0.1 nm y 0.3 nm fueron usados como límites para definir la estabilidad de las proteínas.

Acoplamiento molecular. El acoplamiento compuesto químico / proteína se realizó con el programa AutoDock Vina 1.5.6 (Trott & Olson, 2010). Se estableció una caja de simulación personalizada que cubre toda la estructura de la proteína y configuró una búsqueda exhaustiva igual a 100. Se realizaron diez corridas para cada ligando y para cada corrida la energía de interacción se guardó y se calculó la energía promedio de interacción para todas las mejores poses. La mejor conformación proteína-fitoquímico fue seleccionada con base en la menor energía libre

de interacción (ΔG). La visualización de las estructuras se realizó con el programa PyMOL 1.7.0. Las interacciones moleculares en 3D y 2D se realizaron utilizando el programa BIOVIA Discovery Studio v. 21.1.0.

3.10 Análisis de datos

Los análisis se realizaron usando el software GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com). Los datos de densidad óptica (D.O.). se normalizaron restando los valores de pozos sin células a pozos con células tratadas con la muestra y células no-tratadas y se presentan como promedios con la error estándar.

Datos de ensayos de citotoxicidad (ECV y MTT). El porcentaje de viabilidad de células tratadas con muestra respecto al de células no-tratadas se calculó usando la siguiente fórmula: %Viabilidad = [(D.O. en células tratadas) / (D.O en células no-tratadas) × 100]. Cuando el tratamiento redujo >50% la viabilidad se pudo calcular la concentración citotóxica 50 (CC_{50}) y cuando no se observó esta reducción, la concentración máxima del mayor porcentaje de reducción se adoptó como CC_{50} para efectos de calcular el índice de selectividad (IS).

Datos de experimentos I. Las datos de D.O. se usaron para calcular el porcentaje de reducción del efecto citopático inducido por DENV-1 usando la siguiente fórmula: % Reducción DENV-1-ECP = [(D. O. virus-tratado – D.O virus no-tratado) / (D.O. células no-infectadas/ no-tratadas) – D.O virus no-tratado) × 100]. Se calcularon los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) o la más baja que redujo 25% DENV-1-ECP. Muestras que redujeron < 25% se consideraron inactivas.

Datos de experimentos II. Los datos de D.O. se usaron para calcular el porcentaje de reducción del efecto citopático inducido por DENV-1 usando la siguiente fórmula: % Reducción DENV-1-NS1 = [(D. O. virus-tratado – D.O virus no-tratado) / (D.O. células no-infectadas/ no-

tratadas) – D.O virus no-tratado) × 100]. Se calculó la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) y el IS (CC_{50}/CI_{50}). Valores $CI_{50} \leq 50$ μg/mL con valores IS ≥ 3.0 indicaron efecto antiviral relevante (Butterweck & Nahrstedt, 2012; Cos *et al*., 2006)

Datos de experimentos III. ANOVA de una vía seguido de la prueba post- hoc de Tukey se usaron para comparar promedios de concentración de citoquinas (pg/ml) de macrófagos DENV estimulados y tratados con muestra vegetal con promedios de cultivos controles. La magnitud del cambio en el nivel de citoquina se expresó como índice de cambio (CT-CNT/CNT, donde CT es promedio en macrófagos y CNT promedio en no-tratados), valor 0 indicó ausencia de cambio y valor positivo y negativo indicó incremento y reducción, respectivamente.

3.11 Consideraciones éticas

El presente proyecto está anidado al Proyecto # 9 del Programa BIO-RETO con aval del Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander (Acta # 15 del 23 de junio de 2017; Acta # 22 del 6 de diciembre de 2019). Para las actividades anidadas del proyecto, no hubo repercusiones o afectaciones negativas al medio ambiente. Las muestras vegetales fueron proveídas por la Prof. Dra. Elena Stashenko, directora del Centro de Cromatografía y Espectrofotometría de Masas (CROM-MASS) de la UIS y directora del Programa BIO-RETO. El Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible otorgó permiso a la UIS para colecta de las plantas mediante Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y Productos Derivados (Resolución # 016 del 09 de enero de 2019 y acta de posesión # 07 del 22 de enero de 2019). La investigación en este proyecto se considera como de riesgo mínimo para los seres humanos, según normatividad en Colombia (Resolución #008430 de 1993, Decreto 2164 de 1992 y Ley 10 de 1990).

4. Resultados

4.1 Efecto antiviral de las muestras vegetales en célula Vero

Previamente al análisis de actividad antiviral se determinó la citotoxicidad de cada una de las 9 muestras de *L. origanoides.* A concentración tan alta como 512 µg/mL ninguna muestra redujo la viabilidad celular respecto a las células no-tratadas (Figura 3A). Las nueve muestras se analizaron en el ensayo antiviral DENV-1-ECP, el tratamiento se hizo durante la adsorción del virus a la célula. A la mayor concentración (75 µg/mL) de muestra evaluada, los EXTs y el AE del quimiotipo felandreno redujeron entre 31% y 28% el ECP inducido por el virus, mientras que las de carvacrol y timol entre 25% y 9% (Figura 3B, Tabla 2). EXTs y AEs del quimiotipo felandreno se seleccionaron para los siguientes análisis y las muestras de los otros quimiotipos permanecen almacenadas a -20ºC para análisis en el futuro. Dado que con ninguna muestra se observó reducción de DENV-1-ECP ≥ 50%, respecto al control no-tratado (Figura 3B), los valores de CI_{50} no se pudieron estimar.

Tabla 2. Efecto antiviral de muestras de quimiotipos de *Lippia origanoides* en célula Vero: porcentaje de reducción de DENV-1-ECP.

Muestra	Identificador	Felandreno	Carvacrol	Timol
Extracto hidroalcohólico	EXT-HD	31 ± 4.8	25 ± 6.2	16 ± 4.3
Extracto supercrítico	EXT-FSC	28 ± 4.5	10 ± 4.9	9 ± 5.8
Aceite esencial	AE	31 ± 11.8	9 ± 6.5	22 ± 2.5

Datos obtenidos de los gráficos dosis-respuesta presentados en la Figura 3B. Tratamiento con DSS (30 µg/mL) redujo 92% DENV-1-ECP.

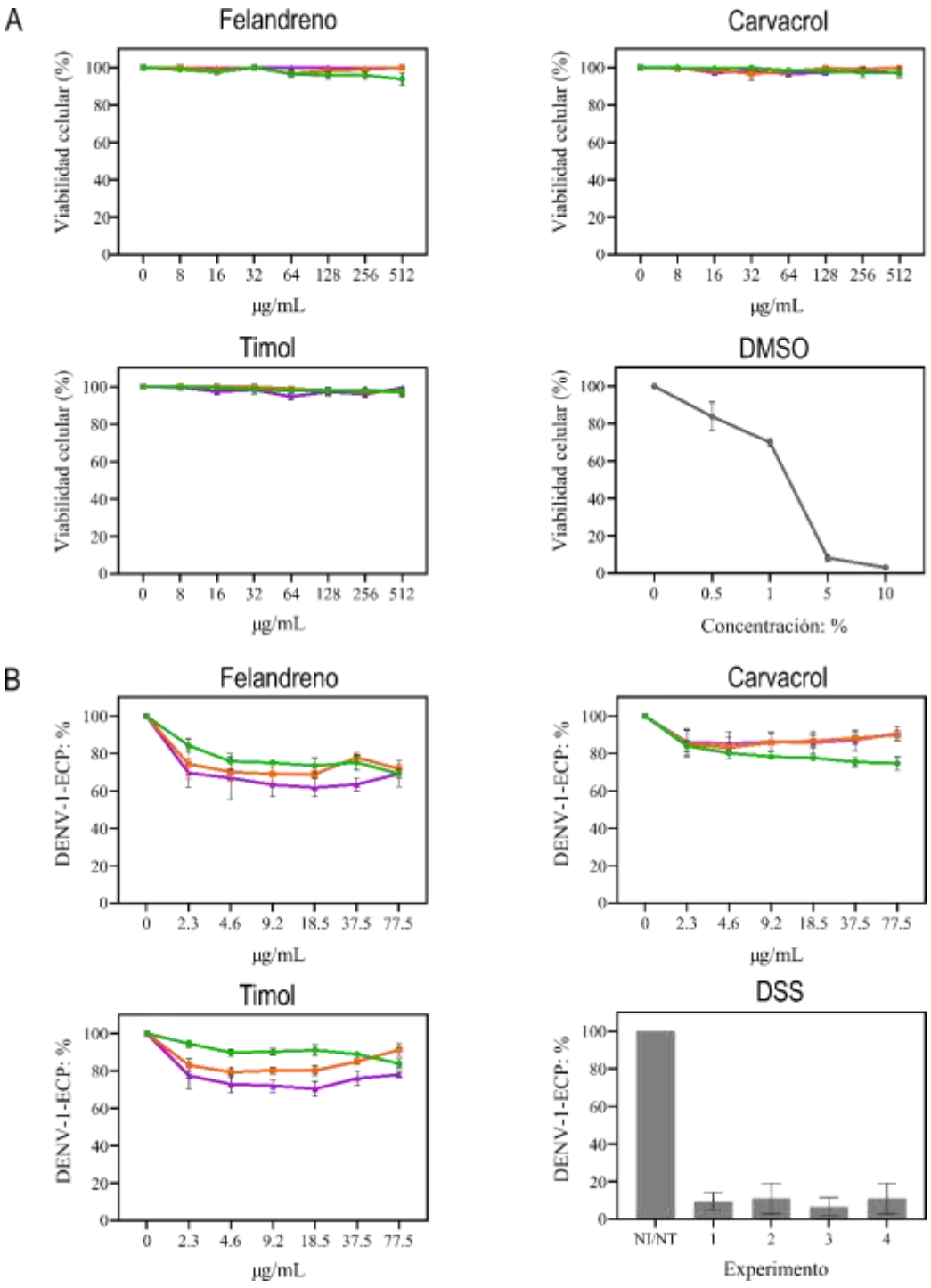


Figura 3. Efecto antiviral de las muestras de *Lippia origanoides* en el ensayo de reducción de DENV-1-ECP. Extracto hidroalcohólico (verde), extracto supercrítico (rojo) y aceite esencial (morado) **A.** Citotoxicidad: células Vero se incubaron por 3 días en medio de cultivo que contenía muestra vegetal a las concentraciones mostradas y la viabilidad celular se determinó en el ensayo de cristal violeta; dimetil-sulfóxido (DMSO) es el compuesto tóxico de referencia. **B**. Efecto antiviral: DENV-1 (10,000 PFU) disuelto en medio de cultivo con muestra vegetal a las concentraciones mostradas, se adicionó 1.5 h a la célula y luego se le permitió replicar en medio fresco libre de muestra por 5 dias cuando se determinó

porcentaje de reducción del efecto citopático inducido por el virus (DENV-1-ECP) respecto al control (células infectadas no-tratadas); dextran sulfato sódico (DSS: 30 µg/mL) es el antiviral de referencia (NI/NT, no-infectado / no-tratado). Datos son promedio ± SD de tres experimentos independientes por triplicado.

4.2 Modo de acción antiviral de muestras de *L. origanoides* quimiotipo felandreno

Previamente se determinó la citotoxicidad de las muestras para célula HepG-2 en el ensayo de cristal violeta. A concentración tan alta como 512 µg/mL, ninguna muestra redujo la viabilidad celular respecto a las células no-tratadas (Figura 4). En consecuencia, 512 µg/mL se consideró como el valor de CC_{50} de cada muestra para calcular el IS.

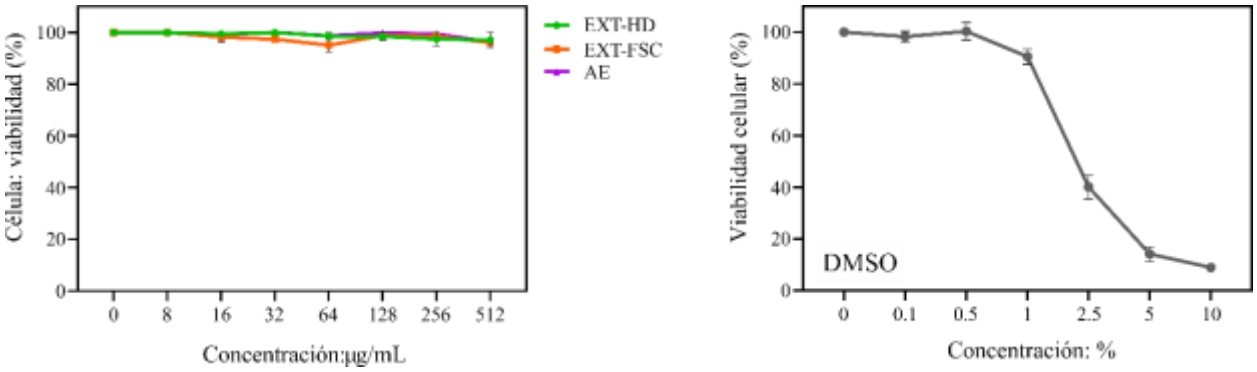


Figura 4. Efecto de muestras de *Lippia origanoides* quimiotipo felandreno sobre la viabilidad de células HepG-2. Células cultivadas en medio con muestra a las concentraciones mostradas por 72 h y viabilidad medida en el ensayo de cristal violeta. Promedios ± DS de tres experimentos por triplicado. Dimetil sulfato de sodio (DMSO) como tóxico de referencia.

DENV se replica fácilmente en células HepG-2 y esto se evidencia por la presencia de proteína NS1 en el medio de cultivo desde las 18 h post-infección (Thepparit *et al*., 2004). El efecto antiviral de las tres muestras del quimiotipo felandreno se analizaron en el ensayo de reducción de DENV-1-NS1. El virus se trató con muestra vegetal antes y durante la adsorción a la célula (Figura 5). A la máxima concentración de100 µg/mL, los resultados fueron como sigue: tratamiento antes, el EXT-HD redujo NS1 en 71% mientras que EXT-FSC en 27%; y con el AE no se observó

reducción; y tratamiento durante, el EXT-HD redujo NS1 en 75%, mientras que EXT-FSC y AE redujeron la proteína viral en 41% y 40%, respectivamente. La respuesta al tratamiento con EXT-HD fue la que semejó más la respuesta al agente virucida DSS (100 µg/mL) que redujo 78% y 85% proteína NS1 con tratamiento antes y durante adsorción, respectivamente.

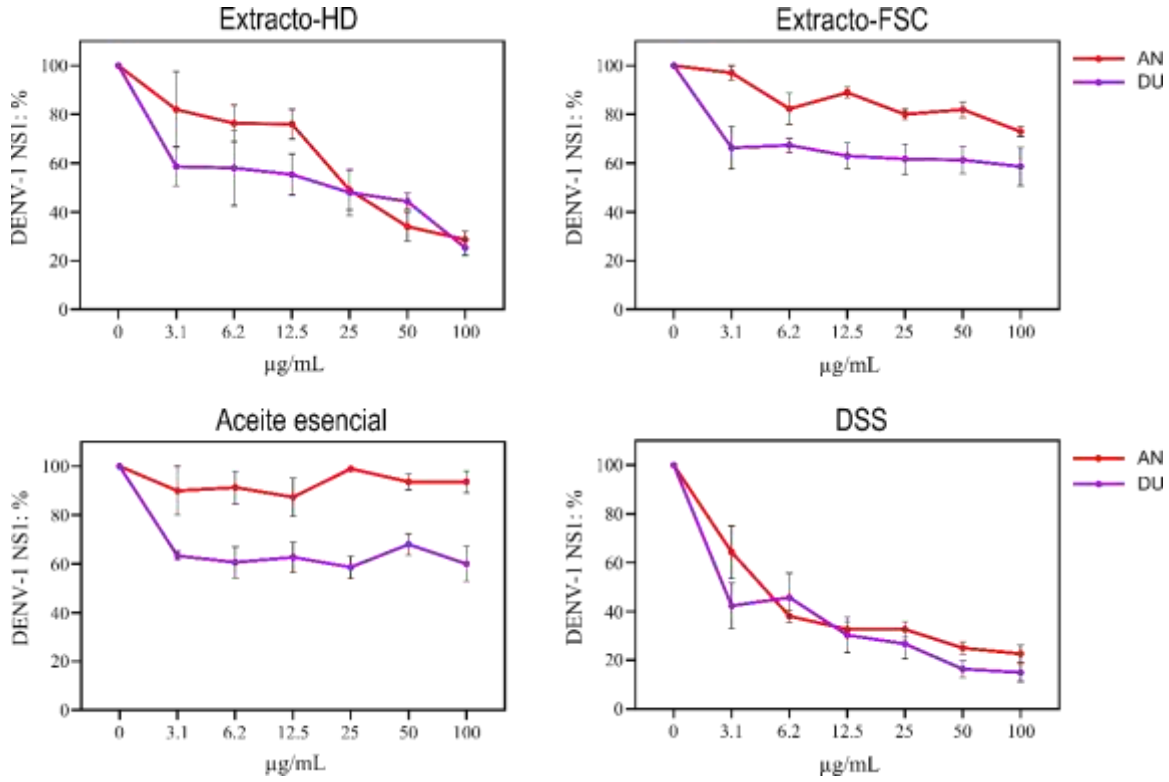


Figura 5. Efecto de muestras de *Lippia origanoides* quimiotipo felandreno sobre DENV-1 antes y durante la adsorción a célula HepG-2. Tratamiento Antes (AN), DENV-1 (10,000 PFU) en medio de cultivo que contenía muestra se incubó 2 h a 37ºC y la mezcla se adicionó a la célula para adsorción por 1.5 h. Tratamiento Durante (DU), lo mismo que AN excepto que la mezcla se adicionó directamente para adsorción del virus. Con ambos tratamientos, la mezcla se retiró y las células se lavaron con PBS, y luego se adicionó medio fresco sin muestra vegetal para replicación del virus 72 h. Dextran sulfato de sodio (DSS) como agente antiviral de referencia. Se presenta el porcentaje de reducción de proteína viral NS1 en tratados respecto a no tratados. Datos son promedios ± DS de tres experimentos independientes en triplicado.

Los resultados con tratamiento después de la adsorción del virus a la célula se presentan en la Figura 6. Cuando el virus se dejó adsorber 1.5 h, luego se retiró y las células se lavaron con PBS para eliminar virus no-adsorbido de manera estable, ninguna muestra de *L. origanoides* felandreno

redujo DENV-1-NS1 cerca de 50%; el porcentaje máximo (29%) se observó con EXT-HD a concentración de 100 µg/mL. Dado que las muestras vegetales mostraron efecto antiviral durante la adsorción del virus a la célula, se razonó que el efecto antiviral por tratamiento después de la adsorción se haría evidente en presencia de virus no-adsorbido. Para probar esto se hicieron tratamientos modificados. Tratamiento DE*, la preparación del virus se retiró después de 1.5 h de adsorción, pero las células no se lavaron y con esto se pretendió dejar virus no-adsorbido; y tratamiento DE**, la preparación del virus no se retiró y en consecuencia las células no se lavaron (exceso de virus no-adsorbido). Se observó efecto antiviral con los tratamientos DE* y DE**, los EXTs y el AE redujeron más que 50% DENV-1-NS1 a concentración < 30 µg/mL y la reducción fue mayor con DE* que DE** probablemente porque quedó menos virus debido a que las células se lavaron.

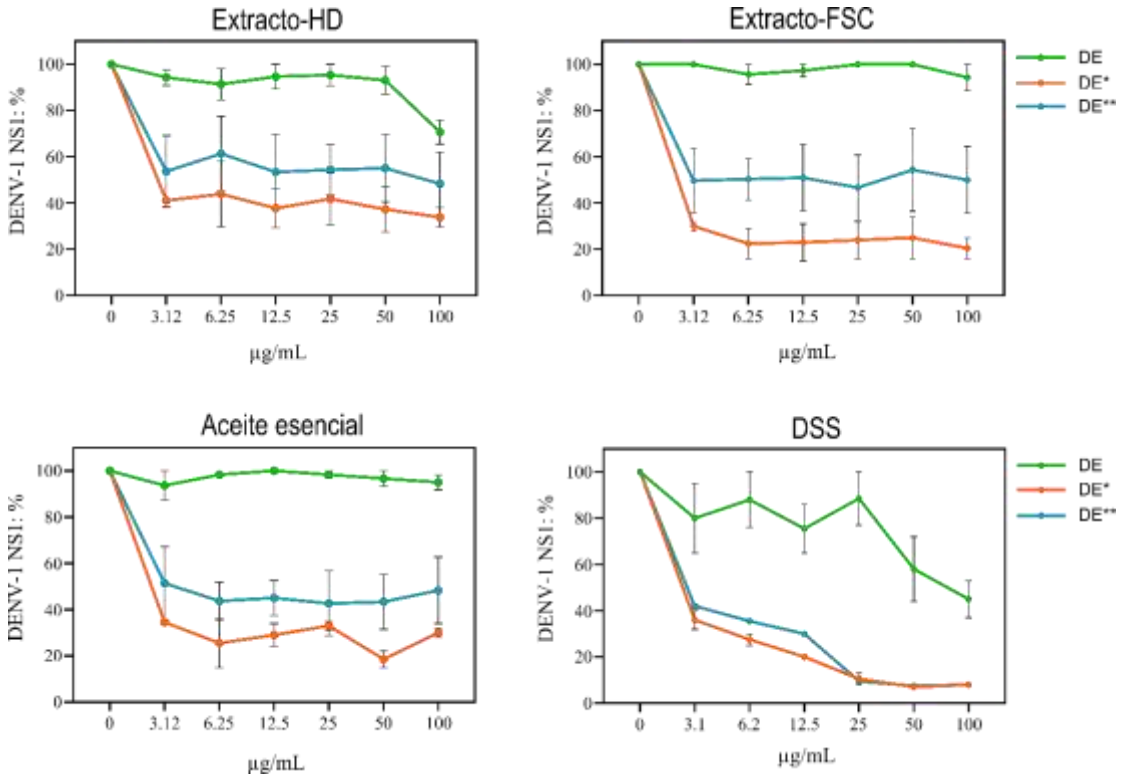


Figura 6. Efecto de muestras de *Lippia origanoides* quimiotipo felandreno sobre DENV-1 después de la adsorción a células HepG-2. Tratamiento DE, DENV-1 (10,000 PFU) en medio de cultivo libre de muestra se adicionó a las células para adsorción 1.5 h, el virus se retiró y las células se lavaron con PBS, y

luego se adicionó medio fresco con muestra vegetal para replicación del virus por 72 h. Tratamiento DE*, lo mismo que DE excepto lavar las células. Tratamiento DE**, lo mismo que DE excepto retirar el virus y lavar las células. Dextran sulfato de sodio (DSS) como agente antiviral de referencia. Se presenta el porcentaje de reducción de proteína viral NS1 de DENV-1 en tratados respecto a no tratados. Datos son promedios ± DS de tres experimentos independientes en triplicado

Los datos presentados en las Figura 5 y 6 se usaron para estimar la potencia antiviral de las muestras. La Tabla 3 compara valores CI_{50} y valores IS de las muestras en cada tratamiento. El EXT-HD mostró la mayor potencia, los valores de CI_{50} fueron < 25 µg/mL con IS >10 en cuatro de los cinco tratamientos. El EXT-SFC presentó más potencia antiviral en los tratamientos DE* y DE** (CI_{50} < 20 µg/mL; IS de 28) comparado con tratamiento DU (CI_{50} > 50 µg/mL; IS de 9) y fue inactivo con el tratamiento AN. El AE mostró potencia solo con los tratamientos DE* y DE** CI_{50} < 20 µg/mL; IS > 25) sugiriendo menor potencial antiviral que los EXTs. Un hallazgo merece resaltarse, el tratamiento después DE* (se retiró el virus y no se lavaron las células) con cada muestra a concentración de 3.12 µg/mL redujo > 50% DENV-1-NS1 y no se observó incremento dependiente de la concentración; además, la reducción de NS1 resultó mayor que con el tratamiento durante con muestra a la misma concentración. Este resultado sugiere potente efecto antiviral de las muestras vegetales para bloquear la adsorción y penetración del virus al interior de la célula. En general los resultados de los tratamientos sugieren: (i) las muestras vegetales podrán bloquear etapas muy tempranas del ciclo viral como la adsorción del virus a la célula y la penetración al citoplasma; (ii) las muestras serían menos activas una vez se haya iniciado el ciclo replicativo viral en el citoplasma; (iii) el EXT-HD mostró efecto virucida, algunos compuestos químicos presentes podrían inactivar directamente el virus. La diferencia de potencial antiviral de los EXT se puede deber a la composición química obtenida mediante diferentes técnicas de extracción y con diferente contenido de flavonoides.

Tabla 3. Potencia del efecto antiviral de muestras de *Lippia origanoides* quimiotipo felandreno de acuerdo con el tratamiento.

Muestra	Tratamiento				
	AN	DU	DE	DE*	DE**
EXT HD	22 ± 1.2 (23)	17 ± 1.2 (20)	Ausente	<3.12 (164)	26 ± 1.4 (20)
EXT SFC	Ausente	54 ± 1.3 (9)	Ausente	<3.12 (164)	18 ± 1.5 (28)
AE	Ausente	Ausente	Ausente	<3.12 (164)	18 ± 1.4 (28)

EXT, extracto hidroalcohólico (HD) y supercrítico (SFC); AE, aceite esencial. Tratamientos antes (AN), durante (DU) y después (DE) de la entrada del virus a la célula HepG-2; DE*, después de la entrada del virus, retirando el inóculo y sin lavado; DE**, sin retirar el inoculo y sin lavado. Datos son promedios ± DS de valores de CI_{50} calculado con base en gráficos de las Figuras 5 y 6.

4.3 Efecto del EXT-HD sobre citoquinas

El EXT-HD se seleccionó para investigar su efecto sobre la producción de citoquinas, debido a que fue la muestra que mostró el mayor potencial antiviral. Antes de evaluar el efecto sobre las citoquinas se determinó la citotoxicidad del EXT y el antiinflamatorio de referencia (dexametasona, DXM) en el ensayo del MTT. Con base en la curva dosis-respuesta, se seleccionaron concentraciones de 50 µg/mL y 100 µg/mL de EXT-HD que redujeron la viabilidad celular en 36% y 28%, respectivamente; y con dexametasona se escogió 100 µM que redujo la viabilidad en 45% (Figura 7A).

Se espera que una muestra de *L. origanoides* quimiotipo felandreno con potente eficacia antiviral *in vitro* sobre DENV afecte la producción de citoquinas en cultivo de macrófagos humanos estimulados con el virus. Para probar esto, los macrófagos se expusieron (2.5 h) al DENV-1, se mantuvieron 72 h en medio con EXT-HD y al término se midieron los niveles de TNF-α, IL-1β, IL-8 y RANTES. Como se mencionó en el marco teórico, estas citoquinas / quimioquinas tienen roles importantes en la activación temprana (primeras horas después de la introducción del virus en la piel del infectado) de la respuesta inmune innata de defensa contra la invasión del DENV. El efecto de los tratamientos con EXT-HD sobre la producción de citoquinas

se presenta en la Figura 7B y Tabla 4. La magnitud del efecto se expresó como el índice de cambio (IC). Valor de cero, indicó ausencia del cambio, valor positivo y negativo de IC indicó incremento y reducción de citoquinas, respectivamente (Figura 8).

Efecto del tratamiento con EXT-HD de macrófagos expuestos al DENV. Valores del índice de cambio (IC) y del test de ANOVA (*p*) entre paréntesis. Sobre TNF-α, aunque el tratamiento redujo levemente la secreción de citoquina con EXT a concentración de 50 µg/mL (IC = -0.27; $p = 0.353$) y 100 µg/mL (IC = -0.38; $p = 0.172$) respecto a macrófagos virus-expuestos no-tratados, la diferencia no fue significante. Sobre IL-1β se evidenció incremento significante con 50 µg/mL (IC = 1.71; $p = 0.002$) pero no con 100 µg/mL (IC = 0.67; $p = 0.068$). Sobre IL-8 se observó incremento (IC = 0.75; $p < 0.0001$) significante que no varió con la concentración de EXT-HD. Sobre RANTES se evidenció incremento con 50 µg/mL (IC= 0.62; $p = 0.241$) y 100 µg/mL (IC = 0.02; $p = 0.998$) pero en ningún caso fue significante. Como se esperaba, el tratamiento con dexametasona redujo (valores de IC entre -0.05 y -0.67; $p < 0.05$) la producción de las cuatro citoquinas. Los resultados sugieren tendencia del EXT-HD a modular la respuesta de citoquinas en el macrófago estimulado con DENV-1, se requieren más experimentos para concluir el potencial del EXT-HD para reducir TNF-α e IL-1β, dos citoquinas con roles importantes en el progreso a dengue severo como se mencionó.

Efecto del tratamiento con EXT-HD de macrófagos no-expuestos al DENV. Se observó incremento no-significante de TNF-α con el EXT-HD a 50 µg/mL (IC = 2.64; $p = 0.995$) y a 100 µg/mL (IC = 3.03; $p = 0.994$). Sobre IL-1β no hubo cambio significativo (IC = 0.05; $p = 0, 997$) a con las dos concentraciones evaluadas. Con IL-8, se observó incremento significativo con 50 µg/mL (IC = 3.77; $p = 0.005$) que no con 100 µg/mL (IC = 2.32; $p = 0.024$). Con RANTES, se observó mayor incremento de la citoquina comparada con las demás, aunque tampoco fue

significante con 50 µg/mL (IC = 5.04; $p = 0.432$) y con 100 µg/mL (IC = 8.34; $p = 0.241$) respecto a macrófagos no-infectados no-tratados.

Tabla 4. Niveles de citoquinas de macrófagos humanos expuestos o no a DENV-1 y tratados con EXT-HD de *Lippia origanoides* / felandreno

Tratamiento	TNF-α	IL-1β	IL-8	RANTES
DENV + EXT (50 µg/mL)	683 ± 52.6	135 ± 8.1	32199 ± 271.7	2426 ± 156.9
DENV + EXT (100 µg/mL)	575 ± 141.7	83 ± 8.8	32036 ± 132.5	1561 ± 439.1
DENV-1	954 ± 64.2	50 ± 3.7	18684 ± 700.8	1495 ± 238.6
EXT (50 µg/mL)	153 ± 30.2	11 ± 6.1	13470 ± 109.6	313 ± 138.4
EXT (100 µg/mL)	162 ± 22.6	11 ± 2.9	9842 ± 1191.3	409 ± 132.5
Ninguno	70 ± 49.2	10 ± 2.0	3345 ± 1332.9	47 ± 9.4
DENV + DXM (100 µM)	359 ± 117.8	23 ± 0.6	17643 ± 74.6	505 ± 307.7
LPS (50 ng/mL)	1354 ± 526.1	67 ± 8.2	30305 ± 380.0	525 ± 108.9

Los datos se expresan en pg/mL para cada citoquina. Dexametasona (DXM) se incluyó como fármaco antiinflamatorio de referencia; y lipopolisacárido bacteriano (LPS) como inductor de citoquina en el macrófago. Datos son el promedio ± EE de dos experimentos independientes por duplicado.

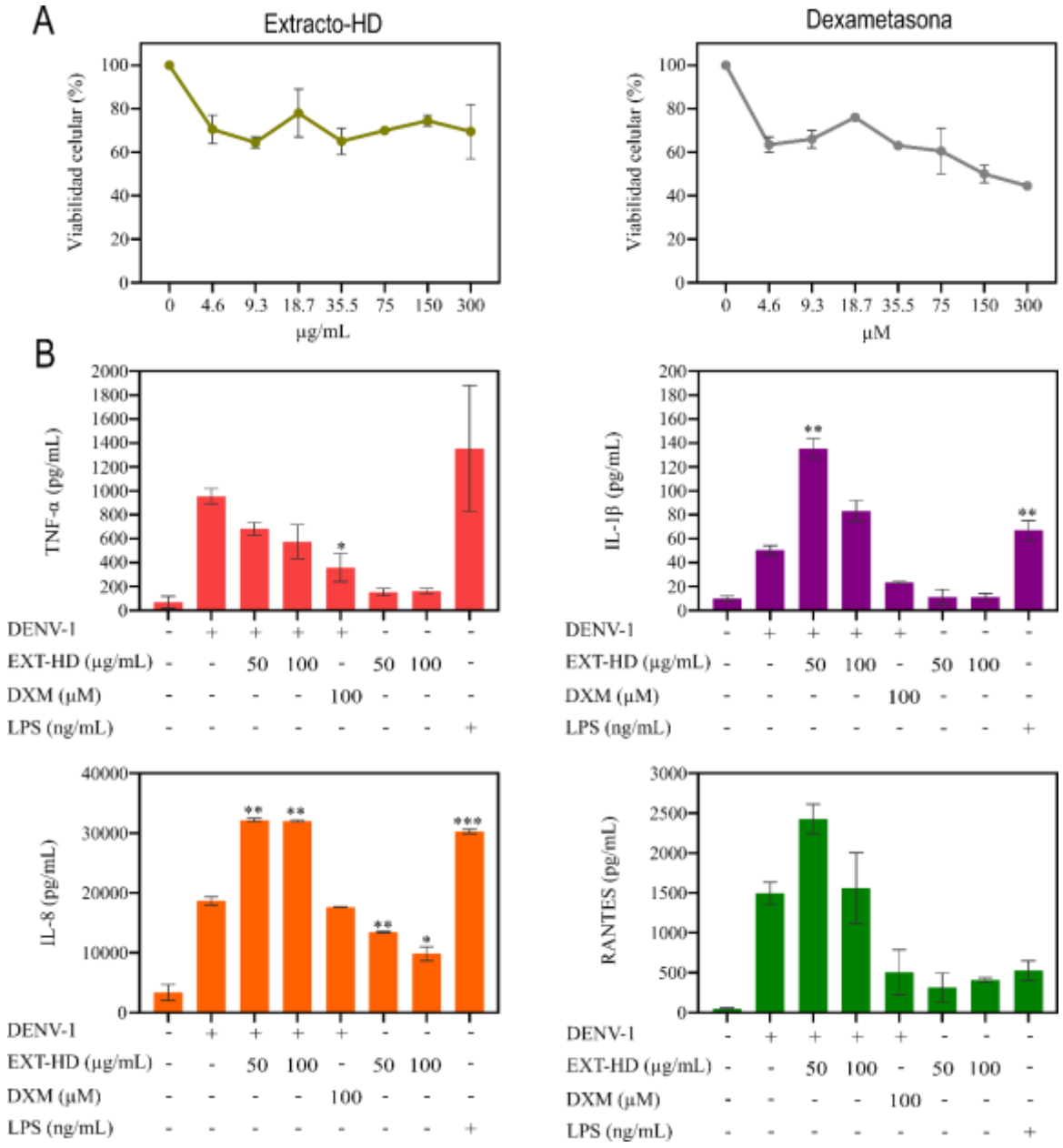


Figura 7. Efecto del tratamiento con EXT-HD de *Lippia origanoides* /felandreno sobre la respuesta de citoquinas por macrófagos humanos. A. Efecto de la muestra vegetal y dexametasona sobre la viabilidad celular examinada en el ensayo con MTT. **B.** Macrófagos fueron expuestos o no a DENV-1durante 2,5 h, el virus se retiró, se adicionó medio de cultivo con EXT-HD a las concentraciones mostradas y las citoquinas se midieron 72 h después. Tratamiento con lipopolisacárido bacteriano (LPS) se incluyó como inductor de citoquinas y dexametasona (DMX) como fármaco antinflamatorio. Los datos son promedios ± DS de dos experimentos independientes por duplicado.

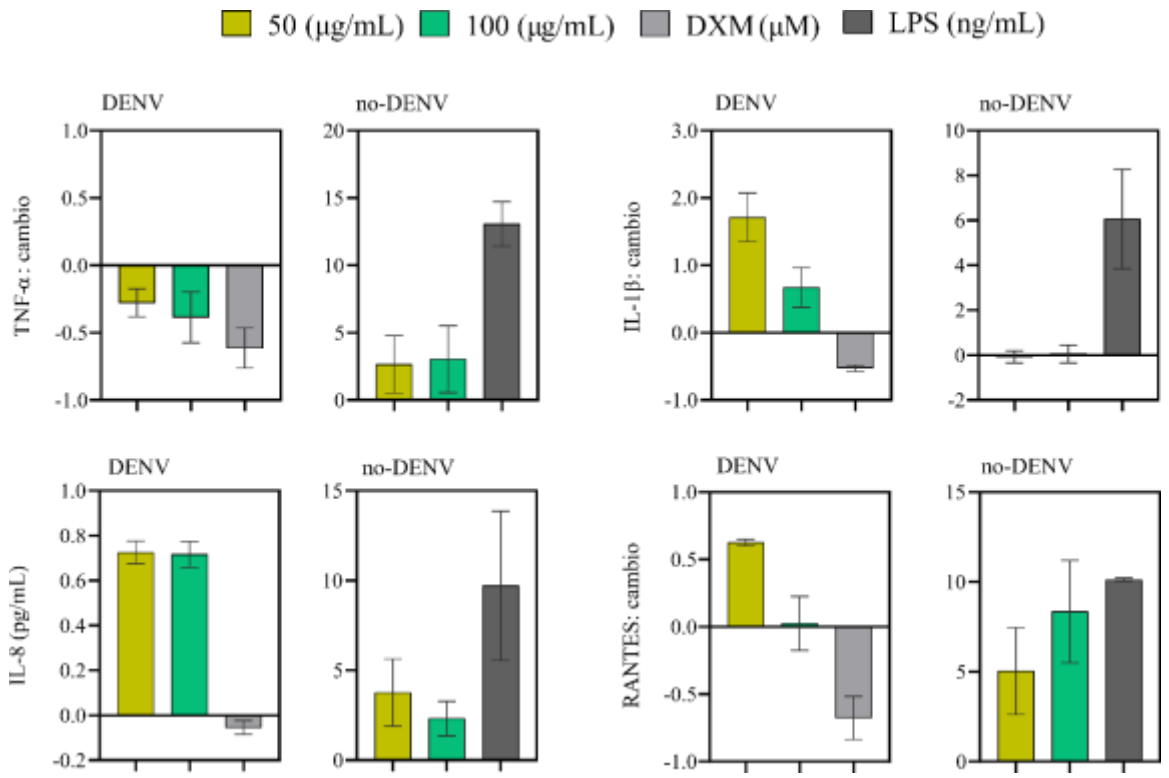


Figura 8. Efecto del tratamiento con EXT-HD de *Lippia origanoides* /felandreno sobre la producción de citoquinas por macrófagos humanos. Se presenta la magnitud del cambio en tratados respecto al control no-tratado con la muestra vegetal.

4.4 Análisis de acoplamiento molecular

Como se mencionó en metodología, las proteínas prM y C del DENV-1 se modelaron debido a que la estructura 3D no se encuentra disponible en la base de datos PDB. Las proteínas modeladas presentaron atributos con valores cercanos al promedio de las estructuras 3D de las mismas proteínas del DENV-2 depositadas en PDB (Figura 9 A): proteína C, 68.9% identidad, Z = -4.42, RSMD = 0.044 nm; y proteína prM, 76.8% identidad, Z = -4.53, RSMD = 0.2 nm. Trayectorias obtenidas de las simulaciones de relajación se presentan en la Figura 9B. Proteínas virales: prM, C y NS5MTasa con RMSD = 0.10 ± 0.01nm; E, NS1, complejo NS2B/NS3 y

NS5RdRp con RMSD entre 0.20 y 0.22 nm. Proteínas celulares: mostraron valores RMSD entre 0.22 y 0.12 nm, excepto NF-κB que presentó un comportamiento ascendente con RMSD = 0.27 ± 0.09 nm. Rango de valores RMSD indicaron que cada proteína mantiene su equilibrio durante la trayectoria en el tiempo y puede concluirse que los modelos son estables con mínima fluctuaciones. En un intento de explicar el modo de acción antiviral de las muestras vegetales, se realizaron análisis de acoplamiento entre 61 compuestos químicos de la planta (11 flavonoides encontrados 17 sesquiterpenos, 30 monoterpenos, 3 de otro tipo) y 16 componentes proteicos (7 del DENV-1 y 9 del macrófago).

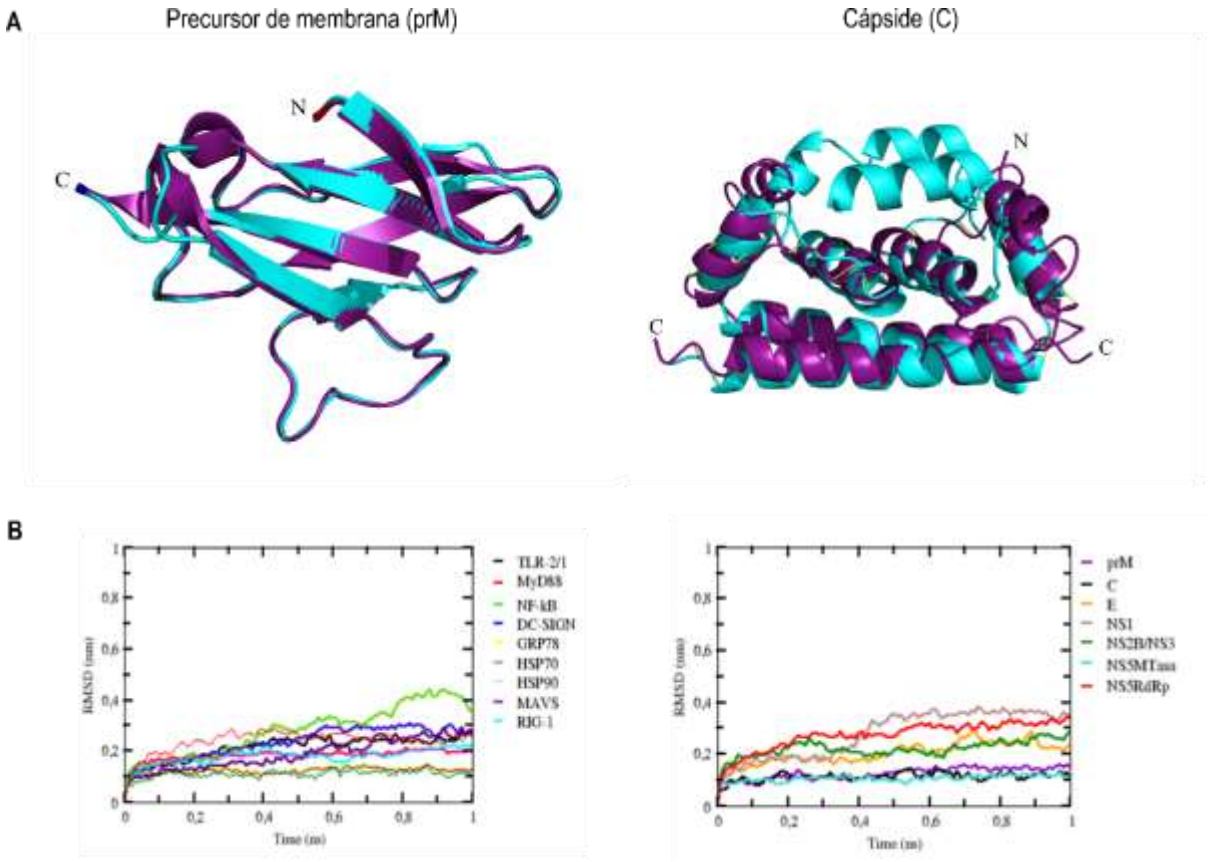


Figura 9. Alineamiento estructural y trayectorias de simulaciones de relajación de las proteínas. A. Proteínas prM y C modeladas, se muestra la superposición de estructuras 3D de modeladas (azul cian) con las estructuras de proteínas homólogas del DENV-2 (morado). **B.** Estabilidad de los modelos de las proteínas, se muestra la trayectoria de valores RMSD para proteínas del DENV-1 (izquierda) y proteínas del macrófago (derecha).

Los valores de energías de interacción se presentan en las Tablas 4 y 5 suplementarias (final del presente documento). valores negativos > -7.5 kcal/mol predijeron acoplamiento. La Figura 10 compara las energías de interacción entre flavonoides y proteínas de DENV-1 y del macrófago.

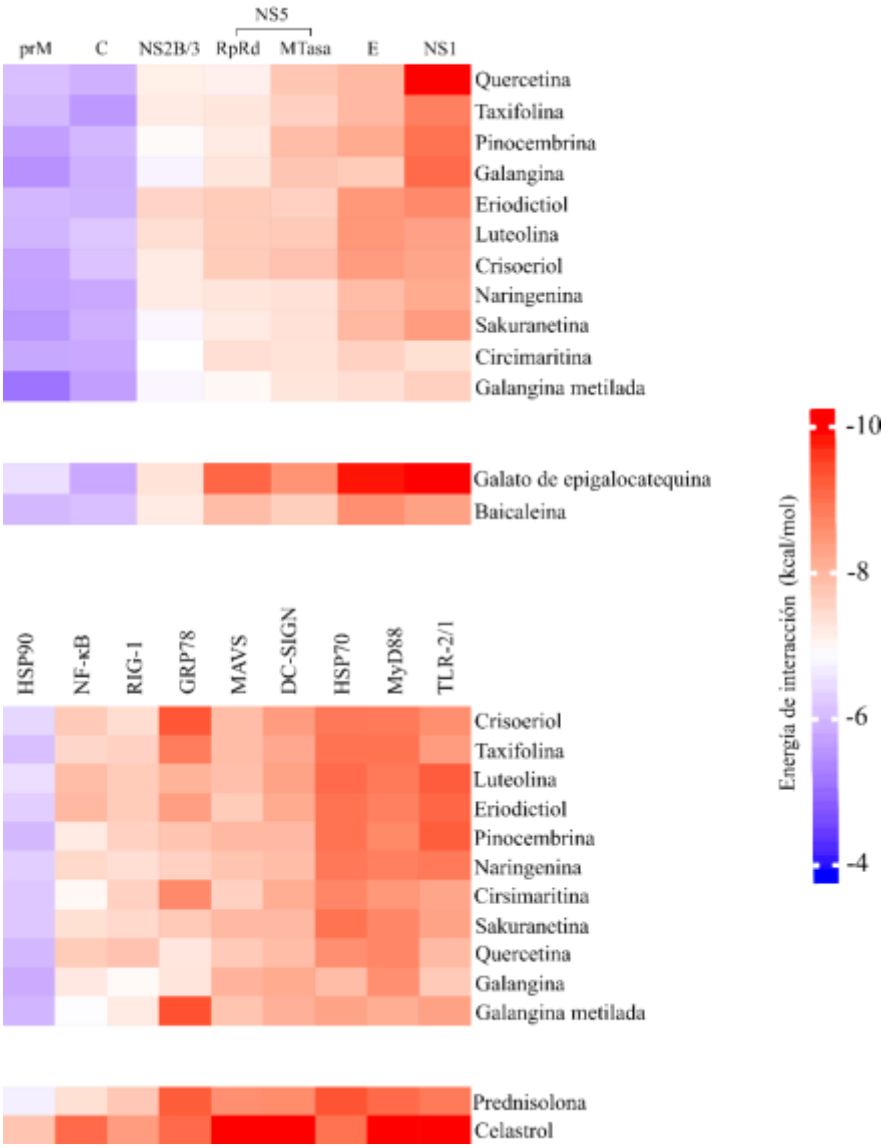


Figura 10. Mapa de calor de energías de interacción entre flavonoides del EXT-HD de *Lippia origanoides* y proteínas diana. Se presentan las energías con proteínas (prM, C, E, NS1, NS2B/NS3, NS5Mtasa y NS5RpRd) de DENV-1 (arriba) y proteínas (HSP90, HSP70, DC-SIGN, GRP78, RIG-, MAVS, TLR2/1, MyD88 y NF-κB) del macrófago (abajo). Valores de energía negativa ≥ -7.5 kcal/mol indicaron acoplamiento molecular. Galato de epigalocatequina y baicaleina son flavonoides con actividad antiviral reportada; prednisolona y celastrol son fármacos con actividad inmunomoduladora reportada.

Flavonoides y proteínas del DENV

Proteína E. Los 11 flavonoides se acoplaron con la proteína E, eriodictiol, luteolina y crisoeriol presentaron energías negativas (> - 8.5 kcal/mol) similares al flavonoide de referencia baicaleina y los restantes ocho flavonoides energías menores (entre -8.3 y -7.5 kcal/mol). Eriodictiol interactuó con aminoácidos del sitio donde se une la molécula detergente n-octyl-d-glucoside conocido como bolsillo βOG, el cual se ubica entre dominios I y II en la región de bisagra. Moléculas que llenan el βOG interfieren con los cambios conformacionales en E necesarios para la fusión entre la envoltura del virus y la membrana citoplasmática que permite la penetración del virión (partícula viral) al interior de la célula huésped (Zhang *et al*., 2017). La luteolina interactuó en el DII entre la cadena A y B formando puentes de hidrogeno con Lys247 y Glu249 en la cadena A y con Gln271 y Glu269 en la cadena B. Moléculas que se unen a esta región pueden interferir con la unión del virus al receptor DC-SIGN bloqueando el reordenamiento conformacional de la proteína E (Mir *et al*., 2016; Shah *et al*., 2013).

Proteína NS1. Todos los flavonoides, excepto, cirsimaritina se acoplaron con la proteína NS1con energías entre -10.2 y -7.7 kcal/mol, siete con las energías mayores similares a los flavonoides de referencia. Interactuaron en la región carboxilo-terminal del dominio β-ladder de la cadena A con los residuos Glu289, Gly292, Arg294, y Arg314. Moléculas que se unen al dominio β-ladder pueden bloquear la replicación viral, la secreción de NS1 y la inducción de anticuerpos, debido a que es una región altamente conservada y contiene epítopos reconocidos por anticuerpos específicos de NS1(Songprakhon *et al*., 2020; Plaszczyca *et al*., 2019).

Proteína NS5. Siete flavonoides se acoplaron con el dominio metiltransferasa (MTasa) de la proteína NS5 con energías (entre > -7.7 y – 8.1 kcal/mol) en el rango de la baicaleina; y tres de ellos también se acoplaron con el dominio de polimerasa (RdRp) de NS5, aunque con energía de

-7.8 kcal/mol mayor que la de los flavonoides de referencia (-9.2 y -8.0 kcal/mol). Los flavonoides que se acoplaron con el dominio MTasa interactuaron con aminoácidos Gly83, Glu111, Asp146, Gly148 y Lys180. Estos aminoácidos hacen parte del sitio activo del bolsillo de unión a GTP; moléculas que se unen a esta región pueden interferir con reacciones de metilación requeridas para la formación del CAP de ARN (Klema *et al*., 2016; Zhao *et al*., 2015). El dominio RdRp de la proteína DENV-NS5 es una enzima esencial para el proceso de replicación del virus (Nasar *et al*., 2020). Tiene subdominios de dedos y el pulgar que forman túneles para la entrada del ARN en el sitio activo (Picarazzi *et al*., 2020; Khan *et al*., 2018). Eriodictiol, luteolina y crisoeriol se acoplaron al dominio RdRp en el subdominio de dedos formando puentes de hidrógeno con Asp538 y Arp598 e interacciones hidrofóbicas con Trp302, Lys357, Val353, Val358, Thr539, Lys575, Val577 Gly599, Ser600.

Complejo NS2B/NS3. Solo eriodictiol (-7.6 kcal/mol) y luteolina (-7.5 kcal/mol) se acoplaron al complejo con energía similar a los flavonoides de referencia. Luteolina se acopló a la región NS3 con actividad proteasa formando puentes de hidrógeno con Leu31, Gln160, Glu193 mientras que eriodictiol se acopló a la región NS3 con actividad helicasa formando puente de hidrógeno con Gln602. El complejo NS2B/NS3 son proteínas DENV con funciones importantes en la patogénesis y el procesamiento de poliproteínas, respectivamente (Phoo *et al*., 2016). Por tanto, representan un importante objetivo terapéutico para el dengue (Low *et al*., 2017).

Proteínas C y prM. Los 11 flavonoides presentaron energías de interacción entre -6.1 y -5.2 kcal/mol, similares a los flavonoides de referencia (entre -6.6 y -5.2 kcal/mol). En consecuencia, no se predijo acoplamiento molecular con ninguna de las dos proteínas. La Figura 11 presenta resultados representativos de la interacción entre flavonoides con proteínas del DENV-

1. La Tabla 5 presenta los flavonoides con mayor afinidad (energía negativa mayor) por proteínas del DENV-1.

Los resultados sugieren que flavonoides del EXT-HD podrían ejercer efecto inhibitorio sobre la replicación del DENV-1 interactuando principalmente con las proteínas E, NS1 y NS5; en consecuencia, pueden afectar la unión y entrada del virus a la célula y su replicación.

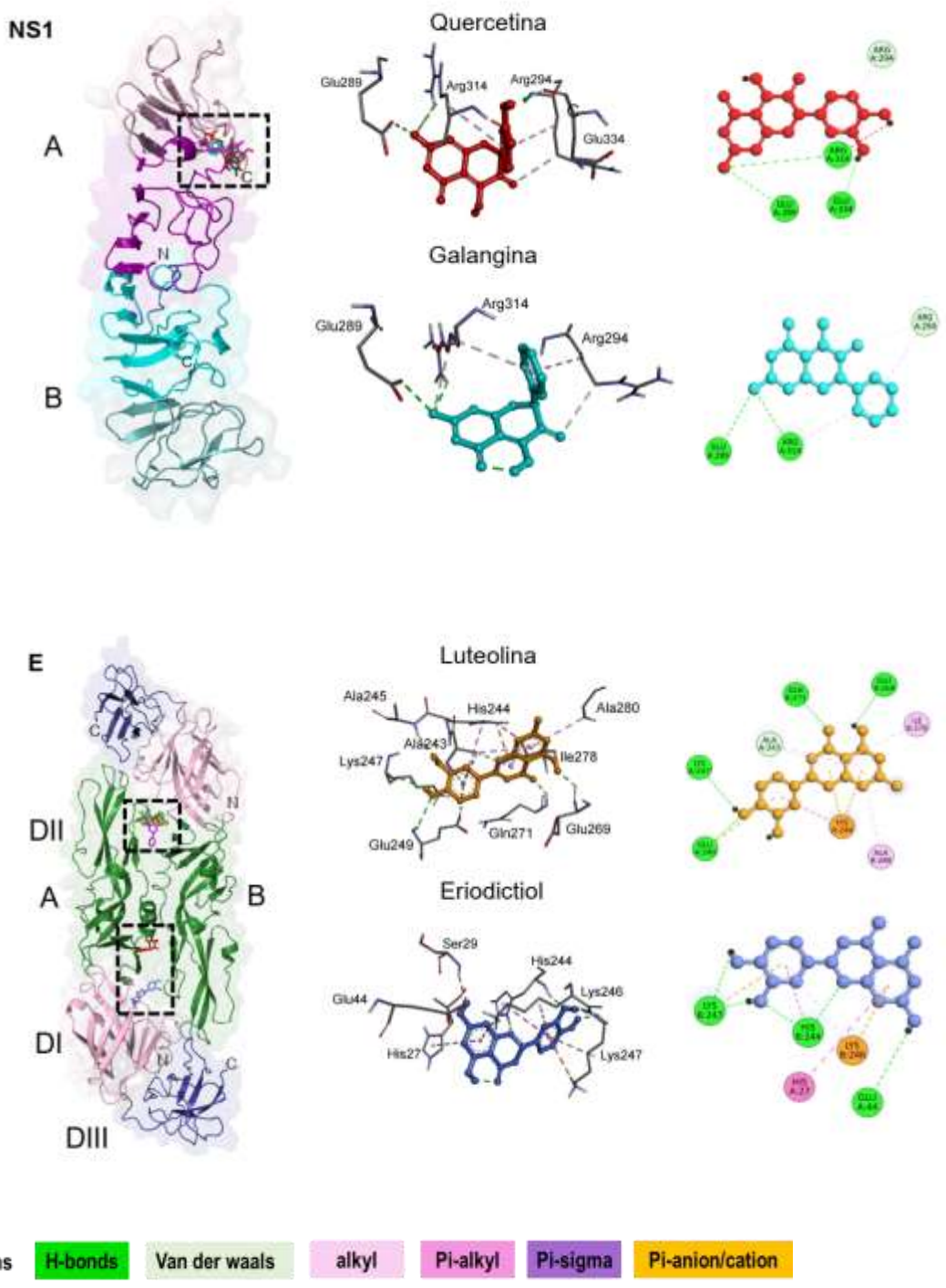


Figura 11. Visualización tridimensional de la interacción entre flavonoides del extracto de *Lippia origanoides* y proteínas del DENV-1. Proteína NS1 con quercetina (-10.28 kcal/mol) y galangina (-9.20 kcal/mol). Proteína de envoltura (E) con eriodictiol (-8.60 kcal/mol) y luteolina (-8.59 kcal/mol).

Flavonoides y receptores celulares del DENV-1

Proteína HSP70. Los 11 flavonoides se acoplaron con la proteína HSP70; luteolina, pinocembrina, eriodictiol, sakuranetina y taxifolina presentaron las energías más negativas (> - 9.0 kcal/mol) similares los compuestos de referencia. Todos los flavonoides interactuaron con aminoácidos del dominio NBD (dominio de unión de nucleótidos) entre los lóbulos AI y AII, e interactuaron por puentes de hidrógeno con residuos comunes como Asp10, Thr13, Thr14 y Tyr15. Moléculas que se unen a la hendidura donde se realiza la hidrólisis de ATP, pueden interrumpir la entrada del DENV a la célula huésped. (Howe *et al*., 2016).

Proteína HSP90. Los 11 flavonoides presentaron energías de interacción entre -6.1 y -5.9 kcal/mol, similares a la prednisolona utilizado como compuesto de referencia (-6.8 kcal/mol). En consecuencia, no se predijo acoplamiento molecular con ninguna la proteína HSP90.

Proteína GRP78. Nueve flavonoides se acoplaron en el mismo sitio de unión en el dominio NBD de la proteína GRP78 donde se realiza la hidrólisis del ATP. Galangina metilada (-9.50 kcal/mol) y crisoeriol (-9.45 kcal/mol) presentaron las energías más negativas e interactuaron con aminoácidos Asp34, Thr37, Tyr39, Ile61 y Asp224. Por otra parte, cirsimaritina (-8.76 kcal/mol) y quercetina (-7.36 kcal/mol) interactuaron entre el dominio NBD y SBD (dominio de unión al sustrato); moléculas que interactúan en esta región pueden inducir cambios conformacionales de la proteína, lo que puede inhibir la capacidad de unión al receptor e internalización del DENV a la célula (Ibrahim *et al*., 2019; Wati *et al*., 2009).

Proteína DC-SIGN. Todos los flavonoides se acoplaron a la proteína DC-SIGN con energías entre -8.0 y -8.5 kcal/mol, similar a la prednisolona (-8.75 kcal/mol) utilizado como compuesto de referencia. Interactuaron en el dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) con aminoácidos Asn266, Gln274, Ser296, Glu298, Glu299, Leu336, Ser338 y Lys378. Moléculas

que interactúan en la región CRD pueden inhibir la interacción del receptor DC-SIGN con DENV-E evitando el reconocimiento de la partícula viral (Shah *et al*., 2013; Alen *et al*., 2011).

La Figura 12 presenta resultados representativos de la interacción entre flavonoides con proteínas receptoras en el macrófago. La Tabla 5 presenta los flavonoides con mayor afinidad (energía negativa mayor) por las proteínas. Los resultados sugieren que flavonoides del EXT-HD podrían ejercer efecto inhibitorio sobre la replicación del DENV-1 interactuando con receptores como HSP70, GRP7 y DC-SIGN y, en consecuencia, inhibir la etapa de unión entre el DENV y la célula, al interrumpir la asociación del receptor con la partícula viral.

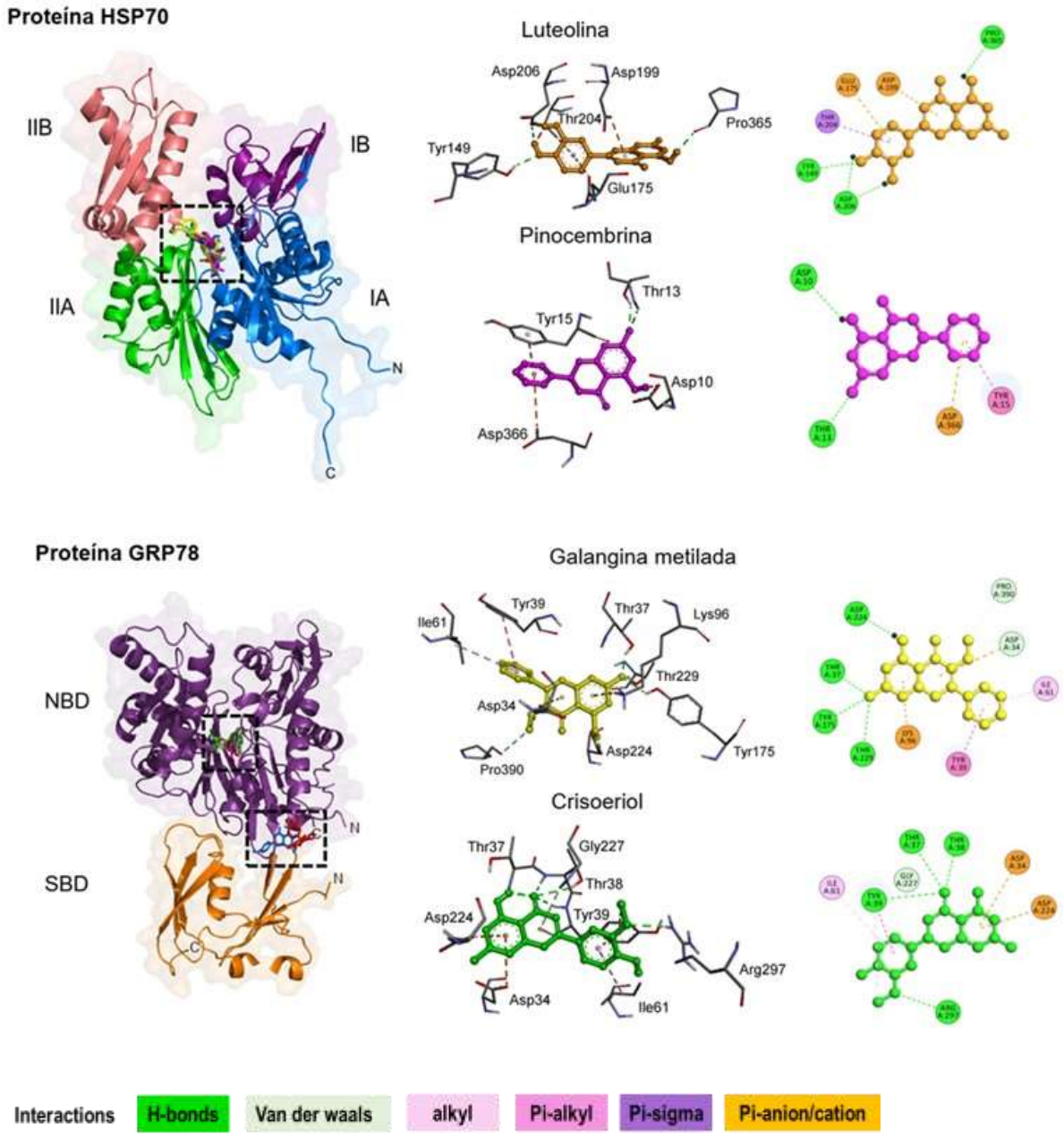


Figura 12. Visualización tridimensional de la interacción entre flavonoides del extracto de *Lippia origanoides* y proteínas del macrófago que actuan como receptores del DENV-1. Proteína de choque térmico (HSP70) con luteolina (-9.20 kcal/mol) y pinocembrina (-9.09 kcal/mol). Proteína regulada por glucosa (GRP78) con galagina metilada (-9.50 kcal/mol) y crisoeriol (-9.45 kcal/mol).

Flavonoides y proteínas celulares con roles en la producción de citoquinas

Dímero TLR-2/1. Los 11 flavonoides se acoplaron con el complejo TLR-2/1, luteolina, pinocembrina, eriodictiol y naringenina presentaron energías negativas (> - 9.0 kcal/mol) similares a los compuestos de referencia, los restantes siete flavonoides energías menores entre (-8.7 y -7.5 kcal/mol). Diez flavonoides, excepto pinocembrina, se acoplaron con TLR-1 (cadena B) e interactuaron con aminoácidos Gly313, Ile319, Phe323, Arg337, Met338, Phe349. Pinocembrina (-9.35 kcal/mol) interactuó en la región intermedia de heterodimerización en el sitio donde se une la molécula Pam_3CSK_4 en un bolsillo de TLR-2 y un canal hidrofóbico de TLR-1 por puentes de hidrógeno con aminoácidos ser309, Arg337 y Tyr276, y con aminoácidos hidrofóbicos con Ile304, Val307, Ile319 y Met338. La heterodimerización del complejo es indispensable en la respuesta inmune innata para el reconocimiento de lipoproteínas como la envoltura del DENV que promueve el inicio de la señalización para la producción de citoquinas (Jin *et al*., 2007). Moléculas que se unen a esta región actúan como potentes activadores de la transcripción de citoquinas por la vía NF-κB (Zhong *et al*., 2015), y podría explicar el resultado de la alta producción de citoquinas en los experimentos sobre macrófagos anteriormente presentados.

Complejo Myddsoma. De los 11 flavonoides que se acoplaron al complejo MyD88, tres de ellos (crisoeriol, taxifolina y luteolina) se unieron a una región del complejo ternario DD-MyD88 específicamente a la quinasa IRAK4 cerca de los residuos Asp24, Asp27 Ala55 y Ala58 con energías negativas (> - 9.00 kcal/mol). Moléculas que interactúan con la quinasa pueden intervenir en la formación del complejo y su actividad para la activación del factor de transcripción NF-κB (De Nardo *et al*., 2018). Otros flavonoides como quercetina (-8.80 kcal/mol) y galangina (-8.70 kcal/mol) interactuaron solo con el dominio MyD88 que participa en la vía de señalización para la respuesta de citoquinas pro-inflamatorias (Lin *et al*., 2010).

Proteína NF-κB. Seis flavonoides se acoplaron con la proteína NF-κB con energías entre -7.6 y -8.1 kcal/mol. Interactuaron con la subunidad p50 y el inhibidor IκBα con los residuos Lys28, Arg50, Thr52, Glu49, Glu222, Gly259, Pro261, Gln266. Moléculas que se unen al inhibidor IκBα pueden inhibir su degradación y reducir los niveles de citoquinas como TNF-α (Choy *et al*., 2019), además, flavonoides pueden bloquear la translocación nuclear de la subunidad p50 de NF-κB y reprimir la expresión de genes asociados a citoquinas pro-inflamatorias (Yahfouf *et al*.,2018).

Proteínas RIG-1 y MAVS. Todos los flavonoides, excepto, galangina y galangina metilada se acoplaron con las proteínas RIG-1 y MAVS con energías entre -7.5 y -8.1 kcal/mol. Interactuaron en el dominio CARD 1/2 de RIG-1 que interactúa con el domino CARD de MAVS con residuos Glu111, Gly326, Glu330, Thr359 y Ser854. Cuando RIG-1 se encuentra en el citoplasma está en una conformación fosforilada e inactiva, la fosforilación está mediada en el N-terminal de los dominios CARD que permiten la activación e interacción con ARN viral (Brisse & Ly, 2019). La Figura 13 presenta resultados representativos de la interacción entre flavonoides con proteínas de la vía de producción de citoquinas. La Tabla 5 presenta los flavonoides con mayor afinidad (energía negativa mayor) por las proteínas.

Los resultados sugieren que flavonoides del EXT-HD podrían ejercer efecto sobre la producción de citoquinas en macrófagos estimulados con DENV-1, interactuando con TLR-2/1, MyD88 y NF-κB y, en consecuencia, podrían tener efectos inmunomoduladores sobre la secreción de citoquinas mediante la activación o interrupción de vías de señalización que conducen a la expresión de genes de citoquinas.

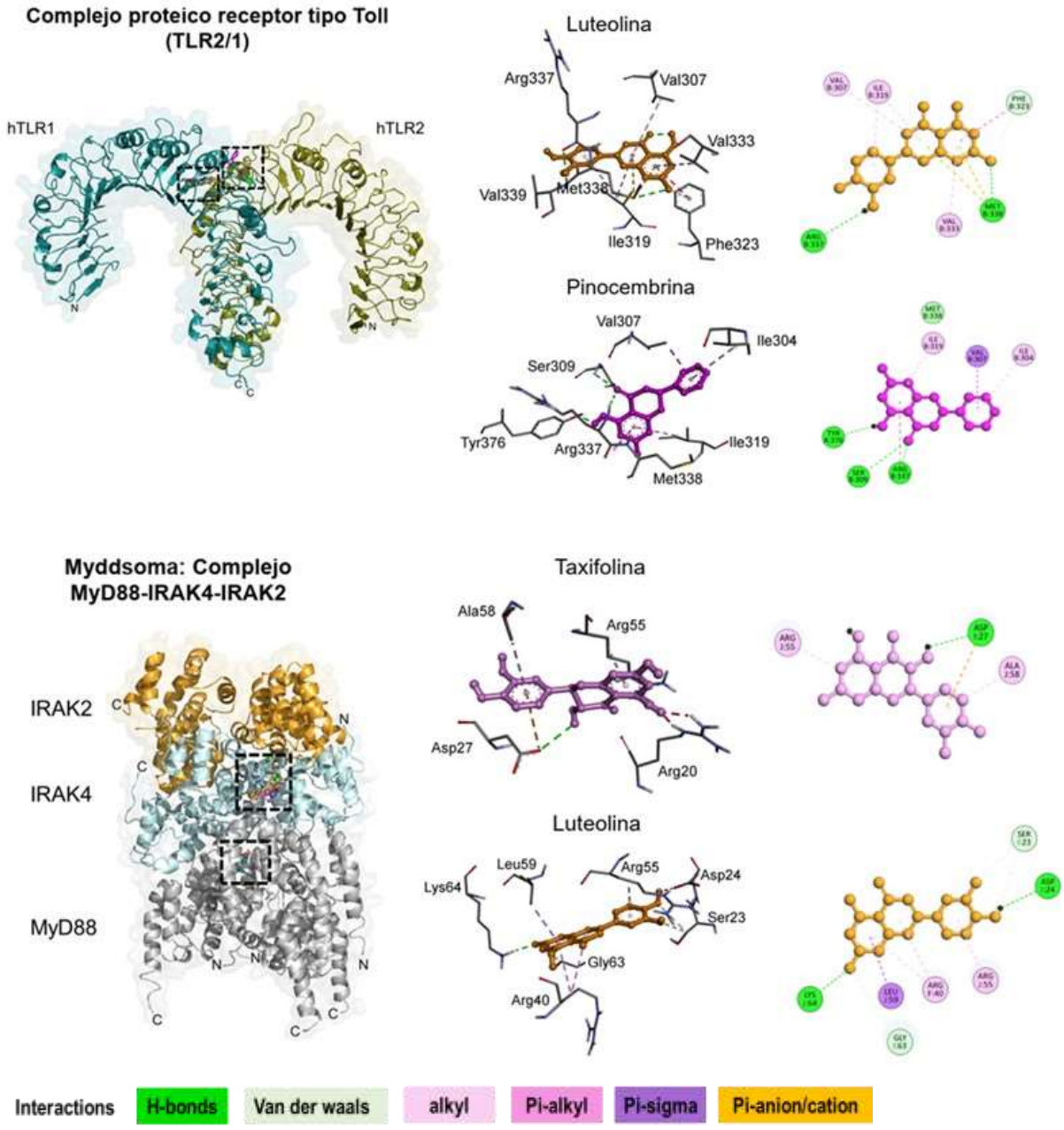


Figura 13. Visualización tridimensional de la interacción entre flavonoides del extracto de *Lippia origanoides* y proteínas de la vía de señalización TLR-2/1 del macrófago. Proteína TLR-2/1 con luteolina (-9.36 kcal/mol) y pinocembrina (-9.35 kcal/mol). Myddsoma (MyD88-IRAK4-IRAK2) con taxifolina (-9.10 kcal/mol) y crisoeriol (-9.00 kcal/mol).

Tabla 5. Flavonoides encontrados en el extracto de *Lippia origanoides* con la mejor energía de enlace en el análisis de acoplamiento molecular para proteínas virales y celulares.

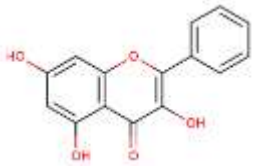
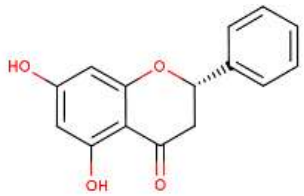
Flavonoides	Formula estructural y química	Proteínas diana	kcal/mol	Aminoácidos de interacción / Tipo de enlace	
				Puente de H^+	Hidrofóbicos
Quercetina	 $C_{15}H_{10}O_7$	DENV-NS1	-10.28 ± 0.70	Glu289, Arg314, Glu334.	Arg294.
		DENV-E	-8.09 ± 0.03	Lys204, Ser205, His261, Ile270.	Trp206, Lys241.
		TLR-2/1	-8.06 ± 0.08	Gln316, Phe325, Tyr326.	Leu350, Pro352.
		DD- MyD88	-8.80 ± 0.00	Asn38, Arg40, Trp47, Gln63, Asp69.	Thr66, Ala68.
		HSP70	-8.70 ±0.00	Lys56, Lys271, Ser340, Gly339, Arg342.	Tyr15, Gly202, Arg272, Asp366.
		DC-SIGN	-8.00 ± 0.00	Glu259, Gln274, Arg275, Ser338.	Ser296, Glu298, Leu336.
Galangina	 $C_{15}H_{10}O_5$	DENV-NS1	-9.20 ± 0.00	Glu289, Arg314.	Arg294.
		DD- MyD88	-8.70 ± 0.17	Asn38, Arg40, Trp47, Gln63.	Thr66, Ala68.
		HSP70	-8.00 ± 0.00	Lys56, Lys271, Gly339, Ser340.	Tyr15, Gly202, Arg272, Asp366.
		DC-SIGN	-8.30 ± 0.00	Asn266, Arg275, Ser296, Lys378.	Asp279, Glu299.
		MAVS	-8.15 ± 0.05	Glu111.	Asp14, Lys15, Trp62, Ala63, Trp230.
Pinocembrina	 $C_{15}H_{12}O_4$	DENV-NS1	-9.10 ± 0.00	-	Arg294, Arg314.
		DENV-E	-8.31 ± 0.03	Ala243, His244.	Lys204, Lys241, Val251.
		NS5MTasa	-8.01 ± 0.03	Gly148.	Gly83, Lys105, Val132, Ile147.
		TLR-2/1	-9.35 ± 0.13	Ser309, Arg337, Tyr276.	Ile304, Val307, Ile319, Met338.
		DD- MyD88	-8.78 ±0.04	Arg20, Gln42, Arg55.	Asp27, Pro28, Arg54, Ala58.
		HSP70	-9.09 ± 0.03	Asp10, Thr13.	Tyr15, Asp366.
		DC-SIGN	-8.07 ± 0.21	Trp343, Asn362.	Trp342.
		MAVS	-8.10 ± 0.00	-	Lys15, Trp62, Ala63, Asp65, Glu111. Trp340.

Tabla 5. continuación

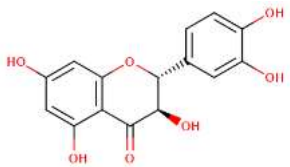
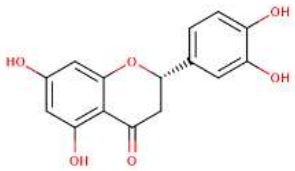
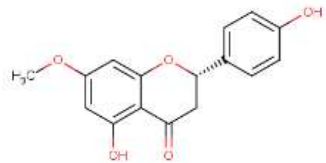
Flavonoides	Formula estructural y química	Proteínas diana	kcal/mol	Aminoácidos de interacción / Tipo de enlace	
				Puente de H^+	Hidrofóbicos
Taxifolina	 $C_{15}H_{12}O_7$	DENV-NS1	-8.90 ± 0.00	Gly292, Asn293.	Arg294, Arg314, Ser315, Gly334.
		DENV-E	-8.10 ± 0.00	Ala243, Glu269.	Glu249, Lys247, Ile278.
		TLR-2/1	-8.50 ± 0.00	Arg337.	Ile319, Phe323, Val333, Met338.
		DD- MyD88	-9.10 ± 0.00	Asp27.	Arg55, Ala58.
		HSP70	-9.08 ± 0.04	Thr13, Thr14, Asp199.	Asp10.
		GRP78	-8.94 ± 0.19	Thr37, Glu201, Asp224.	Asp34, Ile61, Gly364.
		DC-SIGN	-8.32 ± 0.04	Phe262, Ser273, Gln274.	Cys256, Thr261, Arg275, Ala297, Glu298.
		MAVS	-8.00 ± 0.00	Asn12, Ala63, Trp340.	Trp62, Asp65, Glu111.
Eriodictiol	 $C_{15}H_{12}O_6$	DENV-NS1	-8.76 ± 0.13	Gly292, Asn293.	Arg294, Arg314.
		DENV-E	-8.60 ± 0.00	Glu44, His244, Lys247.	His27, Ser29, Lys246.
		TLR-2/1	-9.27 ± 0.28	Tyr376.	Val307, Ile319, Phe323.
		DD- MyD88	-8.90 ± 0.00	Gln52, Arg55.	Asp27, Pro28, Arg54, Ala58.
		NF-κB	-8.10 ± 0.00	Pro261, Gln266.	Arg50.
		HSP70	-9.09 ± 0.03	Thr13, Thr14, Tyr15.	Lys71, Asp199.
		GRP78	-8.48 ± 0.32	Thr37, Thr38, Lys96, Asp224.	Asp34, Gly36, Tyr39, Ile61, Gly363.
		DC-SIGN	-8.30 ± 0.00	Phe262, Ser273, Gln274.	Cys256, Thr261, Arg275, Ala297, Glu298.
Sakuranetina	 $C_{16}H_{14}O_5$	DENV-NS1	-8.50 ± 0.00	Arg314.	Arg294, Cys313, Cys316.
		DENV-E	-8.09 ± 0.03	Ala243, Glu269.	His244, Lys246, Lys247, Glu249, Ile278.
		TLR-2/1	-8.41 ± 0.20	-	Phe323, Val333, Arg337, Met338, Val339, Phe349, Tyr376.
		DD- MyD88	-8.80 ± 0.00	Asp27.	Pro28, Arg40, Arg54, Arg55, Ala58.,
		HSP70	-9.09 ± 0.03	Arg261.	Pro63, Lys257, Arg268.

Tabla 5. continuación

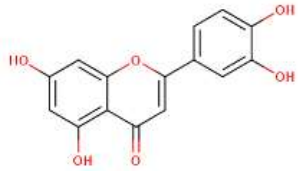
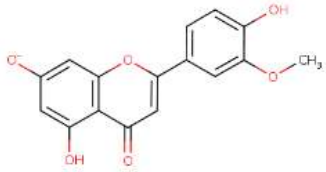
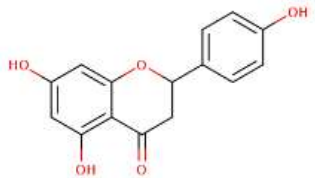
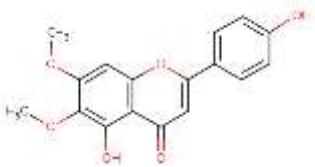
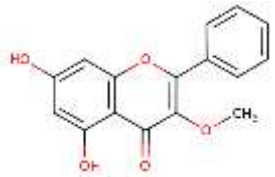
Flavonoides	Formula estructural y química	Proteínas diana	kcal/mol	Aminoácidos de interacción / Tipo de enlace	
				Puente de H^+	Hidrofóbicos
		MAVS	-8.10 ± 0.00	Met336.	Lys15, Phe61, Trp62, Ala63, Asp65, Glu111, Leu262, Met330.
Luteolina	 $C_{15}H_{10}O_6$	DENV-NS1	-8.42 ± 0.19	Arg314, Glu334.	Arg294.
		DENV-E	-8.59 ± 0.03	Lys247, Glu249, Glu269, Gln271.	Ala243, His244, Ala245, Ile278, Ala280.
		TLR-2/1	-9.36 ± 0.08	Arg337, Met338	Val307, Ile319, Phe323, Val333.
		DD- MyD88	-9.00 ± 0.00	Asp24, Lys64.	Ser23, Arg40, Arg55, Leu59, Gly63.
		NF-κB	-8.00 ± 0.00	Pro262, Gln266.	Arg50, Thr52.
		HSP70	-9.20 ± 0.00	Tyr149, Asp206, Pro265.	Glu175, Asp199, Thr204.
		GRP78	-8.18 ± 0.04	Lys125, Ala179, Gln530.	Ala183, Arg532, Asp529.
		DC-SIGN	-8.40 ± 0.00	Try268, Arg275.	Glu298.
Crisoeriol	 $C_{16}H_{12}O_6$	DENV-NS1	-8.37 ± 0.07	-	Phe261.
		DENV-E	-8.51 ± 0.09	Glu269, Thr280.	Thr280.
		TLR-2/1	-8.72 ± 0.08	Gln316.	Tyr323, Phe325, Val248, Phe349, Pro352.
		DD- MyD88	-9.00 ± 0.00	Asp24, Gly63.	Ser23, Asp27, Pro28, Trp32, Arg54, Arg55, Ala58, Leu60.
		HSP70	-9.01 ± 0.03	Thr13, Thr14, Glu268, Lys271, Gly339, Ser340.	Tyr15, Gly230, Arg272.
		GRP78	-9.45 ± 0.13	Thr37, Thr38, Tyr39, Arg297.	Asp34, Ile61, Asp224, Gly227.
		DC-SIGN	-8.52 ± 0.04	Phe262, Gln274, Gln306, Ser338.	Ala297, Leu336, Phe339.
		MAVS	-8.00 ± 0.00	Asn12, Trp340.	Ala63, Trp62, Glu111, Met330, Ser337.

Tabla 5. continuación

Flavonoides	Formula estructural y química	Proteínas diana	kcal/mol	Aminoácidos de interacción / Tipo de enlace	
				Puente de H^+	Hidrofóbicos
Naringenina	 $C_{15}H_{12}O_5$	DENV-NS1	-8.30 ± 0.00	-	Phe261, Arg294.
		DENV-E	-8.01 ±0.03	Lys128, Lys204.	Pro53.
		TLR-2/1	-9.00 ± 0.00	Ser309, Gln316.	Ile304, Val307, Phe323, Val333, Met338, Arg337.
		DD- MyD88	-8.90 ± 0.00	Arg20.	Asp27, Pro28, Arg54, Arg55, Ala58.
		HSP70	-9.01 ± 0.03	Thr13, Thr14, Glu175.	Asp10, Asp199, Arg271.
		DC-SIGN	-8.00 ± 0.00	Phe262, Gln274, Ser338, Tyr342.	Ala297, Leu336, Phe339.
Cirsimaritina	 $C_{17}H_{14}O_6$	TLR-2/1	-8.38 ± 0.04	-	Leu317, Ile319, Phe322, Val323, Lys347, Val348, Phe349, Leu350, Pro352.
		DD- MyD88	-8.60 ± 0.00	Asp24, Gln61.	Asp27, Pro28, Gln52, Arg54, Ala58, Glu59.
		HSP70	-8.80 ± 0.00	Thr14, Lys71.	Asp10, Tyr15, Val337, Val369.
		GRP78	-8.76 ± 0.49	Gly403.	Phe45.
		DC-SIGN	-8.24 ± 0.10	Phe262, Thr282.	Arg275, Ala283, Ala297, Glu298, Ser338, Phe339.
Galangina metilada	 $C_{16}H_{12}O_5$	TLR-2/1	-8.45 ± 0.31	-	Leu266, Phe284, Leu289, Leu312, Leu317.
		DD- MyD88	-8.25 ± 0.05	Arg20, Ser68.	Asp27, Ser65, Arg55, Ala58.
		HSP70	-8.40 ± 0.00	Thr13, Gly202, Gly339.	Gly201.
		GRP78	-9.50 ± 0.60	Thr37, Asp224, Tyr175, Thr229.	Asp34, Try39, Ile61, Lys96, Pro390.
		DC-SIGN	-8.20 ± 0.00	Gln264, Tyr268.	Glu298.

DENV-1 NS1, proteína no estructural; DENV-1 E, proteína de la envoltura; DENV-1 NS5MTasa, dominio metiltransferasa; TLR2/ TLR1, receptor tipo Toll 2 /1 proteína de diferenciación mieloide 2; Myddsoma: complejo MyD88-IRAK4-IRAK2; NF-κB; factor nuclear kappa B; HSP70, proteína de choque térmico 70; GRP78, proteína regulada por glucosa 78; DC-SIGN, molécula de adhesión intracelular 3 no asociada a integrina; MAVS, proteína de señalización antiviral mitocondrial

5. Discusión

En este estudio se pretendió identificar la muestra de *L. origanoides* con potencial como fuente primaria para investigación y desarrollo de fitoterapeúticos para tratamiento del dengue. Se analizaron EXTs y AEs de tres quimiotipos (felandreno, timol, carvacrol) de la planta. La primera etapa consistió en determinar el efecto inhibitorio de las muestras sobre la replicación del DENV-1 en célula Vero, el ECP fue el indicador de replicación del virus. Las muestras redujeron ECP < que 50%, esta baja eficacia antiviral pudo deberse a: (i) exceso de virus, se usó una proporción virus – célula (MOI) de 1.0 (12,000 u.f.p x 12,000 células) en contraste con MOI ≤ 0.5 que es suficiente para replicación productiva del virus (Stein *et al*., 2011); y (ii) la manera de cuantificar el efecto antiviral, la cantidad de colorante retenido por células no-infectadas es el indicador indirecto del efecto (protección contra la infección) y estas células se pueden desprender de la placa durante los lavados más fácilmente comparado con el control no-infectado. Aun con estas desventajas del ensayo, se puedo evidenciar que las muestras del quimiotipo felandreno de la planta redujeron en mayor porcentaje el ECP inducido por DENV-1 comparado con las muestras de los otros quimiotipos.

La presencia de la proteína viral NS1 en el medio de cultivo de células infectadas con DENV a las 72 h post-infección coincide con presencia de viriones infecciosos en el medio de cultivo (Mello *et al*., 2017; Ludert *et al*., 2008). El efecto antiviral de las muestras del quimiotipo felandreno se confirmó en el ensayo de reducción de proteína NS1, se observó reducción a CI_{50} entre 3.12 y 54 µg/mL e IS > 4.0. Parámetros de actividad antiviral relevante de muestras vegetales no han sido aún establecidos. Sood y Col. (2015) propusieron valores CI_{50} < 30 µg/mL como indicador de actividad anti-DENV *in vitro* de extractos vegetales; Butterweck & Nahrstedt (2012) propusieron este mismo valor de CI_{50} para actividades biológicas de muestras vegetales; y Cos y

Col. (2006) propusieron 100 µg/mL como el máximo valor. Valores de IS > 4.0 reflejan la selectividad mínima aceptable de las muestras según Cos y Col. (2006). Con base en estos indicadores de actividad, se puede concluir que las muestras de *L.origanoides* quimiotipo felandreno presentan potencial antiviral sobre el DENV.

Los cinco distintos tratamientos del DENV-1 pretendieron inferir el modo de acción antiviral de las muestras del quimiotipo felandreno. Los tratamientos antes y durante la adsorción del virus a la célula mostraron eficacia antiviral. Eficacia antiviral no se observó con el tratamiento después de la adsorción cuando el inóculo (virus + muestra) se retiró y se lavó la monocapa de células varias veces con PBS, esto es, se eliminó completamente el virus no-adsorbido. Sin embargo, se dejó el virus (tratamiento DE* y DE**) se observó eficacia antiviral (CI_{50} < 3.12 µg/ml). Los resultados de los experimentos soportan la hipótesis que las muestras de *L. origanoides* ejercen su efecto antiviral durante la entrada y penetración del virus al interior de la célula y este efecto se reduce notoriamente cuando no hay virus sobre la superficie celular. En varios estudios (Kuo *et al*., 2020; Ali *et al*., 2020; Hernández-Castro *et al*., 2015; Zandi *et al*., 2013; Lee *et al*., 2013) se reporta que la eficacia antiviral de extractos vegetales fue mayor antes y durante que después de la adsorción del virus.

Es conocido que la actividad antiviral del extracto vegetal está determinada por la acción de sus componentes químicos sobre proteínas con roles importantes en el ciclo replicativo del virus (Rosmalena *et al*., 2019; Flores-Ocelotl *et al*., 2018; Abdul Ahmad *et al*., 2017; Tang *et al*., 2012). El análisis de acoplamiento entre componentes químicos del EXT de *L. origanoides* – felandreno y proteínas del DENV-1 predijo que los flavonoides se unen al sitio βOG de la proteína E; en consecuencia, pudieron bloquear la fusión entre envoltura del virus y membrana celular durante la entrada del virus a la célula. Análisis similares realizados por otros autores demuestran que

pinocembrina, luteolina naringenina y quercetina poseen alta afinidad con la proteína E del DENV (Lee *et al*., 2019; Frabasile *et al*., 2017; Powers & Serzer, 2016). Flavonoides que se acoplan al bolsillo βOG de E se han sugerido como plantillas para desarrollo de antivirales inhibidores de entrada del virus a la célula (Nasar *et al*., 2019; Aarthy & Singh, 2018).

Los flavonoides del EXT también se acoplaron con la proteína NS1, esta proteína está implicada en la patogénesis de la enfermedad ya que contribuye al deterioro del endotelio vascular incrementando la permeabilidad que lleva a fuga plasmática (Chen *et al*., 2018; Akey *et al*., 2015). Se ha reportado que flavonoides pueden bloquear la glicosilación de aminoácidos de la proteína NS1, lo cual es indispensable para actuar como co-factor durante la replicación del virus (Mishra *et al*., 2019). Por lo tanto, es probable que el EXT de *L. origanoides* ejerza su efecto antiviral a través de flavonoides que podrían afectar las funciones de la proteína NS1 y E interfiriendo simultáneamente con la adsorción del virus en la célula en etapas tempranas del ciclo viral y la NS1 secretada al medio extracelular. Los flavonoides también se acoplaron a la proteína NS5; en consecuencia, podrían bloquear la replicación del ARN viral. Afinidad de flavonoides por NS5 está documentada (Khan *et al*., 2018; Klema *et al*., 2016).

El análisis de acoplamiento entre los componentes químicos de los EXTs de *L. origanoides* – felandreno y proteínas de membrana, usadas por DENV-1 para adherirse y entrar a la célula, sugiere que flavonoides podrían actuar como inhibidores de la actividad ATPasa de HSP70 necesaria la hidrólisis de ATP y el intercambio de ADP / ATP eventos que son clave para la unión con proteínas hidrófobas expuestas y la liberación de HSP70 durante el plegamiento de polipéptidos nacientes (Yang *et al*., 2020; Radons, 2016); en consecuencia, podrían bloquear no solo la entrada del virus a la célula sino etapas posteriores como la replicación del ARN y la

formación de las nuevas partículas virales como ha sido reportado (Howe *et al*., 2016; Taguwa *et al*., 2015).

Los flavonoides también se acoplaron con la proteína DC-SIGN por el dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD); se ha reportado que moléculas pueden bloquear dos sitios de glicosilación en Asn67 y otros residuos conservados presentes en la interfaz del complejo DC-SIGN-DENV-E lo cual sugiere que puede bloquear la unión del virus al receptor (Liu *et al*., 2017; Shah *et al*., 2013). Por lo tanto, es probable que flavonoides del EXT de *L. origanoides* pueden afectar no solo la unión de la partícula al receptor sino también su internalización.

Diferentes estudios sugieren que los AE y sus componentes actúan principalmente sobre partículas virales libres y pueden bloquear las primeras etapas del ciclo viral (Ma & Yao., 2020). El AE analizado en el presente estudio, fue la muestra con menor actividad antiviral comparado con los EXTs, se observó efecto antiviral con los tratamientos DE* (después de la adsorción retirando el virus sin lavar las células) y DE** (después de la adsorción sin retirar el virus ni lavar las células). La diferencia podría explicarse por la composición química, ya que los componentes mayoritarios del AE son monoterpenos. Análisis de acoplamiento molecular revelan que estos compuestos químicos presentan energías de interacción menores comparadas con los flavonoides (Powers & Setzer, 2016; Pájaro-Castro *et al*., 2015). Es probable que el AE de *L. origanoides* ejerza su efecto a través de sesquiterpenos, estos compuestos tienen mayor tamaño y muestran energías de interacción menores con proteína E del DENV comparados con los monoterpenos (Ali *et al*., 2020; Pájaro-Castro *et al*., 2015). En un estudio previo del grupo se reportó reducción de la replicación *in vitro* de los cuatro serotipos del DENV debido a tratamiento con trans-β-cariofileno y citral (Flechas *et al*., 2018). Se ha propuesto que los sesquiterpenos podrán interferir con la

adsorción del virus a la célula y, por lo tanto, bloquear la entrada al citoplasma (Reichling, 2021; Ma & Yao, 2020).

La respuesta inmune es determinante de la forma clínica del dengue (King *et al*., 2020; Uno & Ross, 2018). El Mϕ tiene roles importantes en la respuesta inmune innata de defensa contra el DENV, es una célula que invade el virus para replicarse y producir progenie. Los Mϕ responden a la presencia del virus secretando diversas citoquinas que activan otros Mϕ infectados y otras células del sistema inmune para robustecer la respuesta inmune que cuando es exacerbada contribuye a la severidad del dengue (Castillo *et al*., 2019; Wu *et al*., 2013). En el presente estudio se realizó un experimento exploratorio para evaluar el efecto del EXT-HD del quimiotipo felandreno sobre la producción de citoquinas por Mϕ humanos. En Mϕ expuestos al DENV-1, el tratamiento con EXT-HD afectó de manera distinta la producción de las citoquinas, cabe mencionar que, la diferencia no fue significante (p >0.05) en dos de las cuatro citoquinas evaluadas. En Mϕ DENV-estimulados se observó reducción de TNF-α como con el anti-inflamatorio dexametasona, y esto podría ser relevante ya que TNF-α es una citoquina implicada en el progreso a dengue grave (Gonçalves- Pereira *et al*., 2020; Malavige & Ogg, 2017).

Los Mϕ usados en este estudio se obtuvieron de monocitos expuestos al factor estimulante de colonias (GM-CSF), se ha propuesto (Hamilton, 2008) que este factor incrementa la susceptibilidad del Mϕ al DENV induciendo la producción de altos niveles TNF-α y activando proteínas del inflamosoma lo que conduce a secreción de altos niveles IL-1β. El tratamiento con GM-CSF podría explicar en parte el incremento de IL-1β y la leve reducción de TNF-α que se observó en Mϕ DENV-estimulados tratados con el EXT-HD. El tratamiento con EXT-HD de Mϕ no-expuestos a DENV incrementó RANTES y en menor proporción IL-8 y TNF-α. Cabe resaltar que el tratamiento no incrementó IL-1β y esta citoquina tiene un rol importante en los eventos que

llevan a incremento de la permeabilidad vascular que conduce al choque hipovolémico en dengue (Malagive & Ogg, 2017).

Los resultados de los tratamientos del Mϕ sugieren que el EXT-HD podría actuar como agente profiláctico en individuos a riesgo de infección con DENV, podría estimular la respuesta antiviral innata dado que se observó tendencia a incrementar citoquinas. Mayores niveles de estas citoquinas se detectaron en niños con dengue leve antes de ser infectados y al contrario los que desarrollaron dengue severo (Friberg *et al*., 2018). Niveles elevados de TNF-α y RANTES en infectados con DENV respecto a no infectados, se han propuesto como componentes del perfil inmune protector de respuesta antiviral innata, así como la activación de células T específicas de DENV (Friberg *et al*. 2018).

La traducción de señal a través de receptores tipo Toll (TLR-2/1) juega un papel importante en el proceso de producción de citoquinas en Mϕ estimulados con DENV, el DENV desencadena la homodimerización del receptor TLR-2/1 (Aguilar-Briseño *et al*., 2020). El análisis de acoplamiento molecular reveló, que los flavonoides del EXT de *L. origanoides* se unen al complejo TLR-2/1 con interacciones por puente de hidrógeno cerca de los residuos del canal hidrofóbico entre los dos receptores. Esta interacción podría tener efectos en el proceso de dimerización potenciando su activación como ha sido descrito por Pérez-Regidor *et al* (2016) con otras moléculas. El análisis también reveló que los flavonoides se acoplan al Myddsoma, en la proteína MyD88y en una región ubicada en la interacción IRAK2 / IRAK4, lo que podría interferir con la formación del complejo y, por lo tanto, la traducción de la señal. Las moléculas que interrumpen la formación del Myddosoma son fármacos candidatos como inhibidores de la vía TLR2/1 (Wang *et al*., 2020; Li *et al*., 2018). Algunos estudios han demostrado que el extracto de *L. origanoides* inhibe la señalización asociada a activación del factor nuclear NF-κB (Raman *et*

al., 2017), esta proteína es un traductor de señal a través del receptor dimérico TLR1/2 (Liu *et al*., 2017).

Los análisis de acoplamiento sugieren que los flavonoides presentes en el EXT de *L. origanoides* podrían actuar como moduladores en la vía de TLR2/1. Por lo tanto, el EXT podría facilitar el descubrimiento de fitomedicinas con efectos moduladores sobre la respuesta inmune exacerbada evitando la progresión a dengue severo. Los efectos inmunomoduladores de flavonoides de EXT de plantas medicinales sobre la secreción de citoquinas mediante la regulación de la vía de señalización de TLR2/1 están documentadas (Bai *et al*., 2020; Yoshida *et al*., 2013), así como la activación o interrupción de vías de señalización que conducen a la activación de NF-κB que regulan la expresión de genes de citoquinas (Das *et al*., 2021; Raman *et al*., 2017).

Finalmente, se reconocen limitaciones de este trabajo. Es necesario confirmar el efecto antiviral sobre los cuatro serotipos del virus en ensayos de progenie viral. Además, se debe proporcionar una explicación del efecto sobre modulación de citoquinas, evaluando interferones tipo I que hacen parte de la respuesta inmune innata antiviral. El experimento con Mϕ tiene limitaciones por variabilidad respecto a la célula, estas fueron obtenidas de individuos sanos que varían en su perfil genético, lo que explica la magnitud de dispersión de los datos; además, es necesario evaluar un rango amplio de concentraciones del EXT dado que la respuesta de citoquinas es afectada por el número de ligandos que interactúan con los receptores de membrana.

6. Conclusiones

Los resultados del presente trabajo sugieren que el EXT de *Lippia origanoides* quimiotipo felandreno tiene efecto inhibitorio *in vitro* sobre la replicación del DENV y potencial efecto inmunomodulador sobre citoquinas implicadas en la patogénesis del dengue tales como TNF-α,

IL-8, IL-1β y RANTES. Modular la respuesta de citoquinas hacia un perfil de respuesta inmune más de tipo antiviral que inflamatorio, es una propiedad de un medicamento para tratamiento del dengue.

Los efectos del EXT-HD antiviral y sobre la respuesta de citoquinas por el macrófago inducida por el DENV, se podrían explicar por las diversas interacciones entre flavonoides y proteínas del virus y la célula- Estas proteínas tienen roles importantes en el ciclo replicativo del virus y en las vías de señalización que conducen a la expresión de genes de citoquinas. Las proteínas del DENV diana de los flavonoides de mayor relevancia identificadas en el presente estudio son NS1, E y NS5; y las proteínas del macrófago son HSP70, DC-SIGN, TLR-2/1 y MyD88.

Un fitoterapéutico que aminore las afectaciones de la infección con DENV podría servir para control del dengue ya que podría reducir hospitalizaciones por riesgo de dengue severo. El EXT-HD de *Lippia origanoides* podría servir como punto de partida de investigaciones de farmacognosia enfocadas al descubrimiento de medicamentos para tratamiento holístico del dengue.

Este estudio aportó nuevo conocimiento sobre el potencial de plantas de la medicina tradicional colombiana como fuente primaria para el descubrimiento de medicamentos para el dengue. Se requiere profundizar en este conocimiento realizando más investigación sobre el potencial farmacológico de *Lippia origanoides* y otras plantas de la medicina tradicional de Colombia. Esta investigación es indispensable ya que, ante la carencia de fármacos sintéticos eficaces, los

pobladores de países endémicos como Colombia recurren con frecuencia a preparaciones herbales para aliviar el dengue.

Referencias Bibliográficas

Aarthy, M & Singh, SK. (2018). Discovery of Potent Inhibitors for the Inhibition of Dengue Envelope Protein: An In Silico Approach. *Curr Top Med Chem. 18*(18):1585-1602. doi: 10.2174/1568026618666181025100736.

Abdul Ahmad, S. A., Palanisamy, U. D., Tejo, B. A., Chew, M. F., Tham, H. W., & Syed Hassan, S. (2017). Geraniin extracted from the rind of *Nephelium lappaceum* binds to dengue virus type-2 envelope protein and inhibits early stage of virus replication. *Virology Journal*, *14*(1), 1–13. doi.org/10.1186/s12985-017-0895-1.

Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindah, E. (2015). Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, *1–2*, 19–25. doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001.

Aguilar-Briseño, J. A., Upasani, V., Ellen, B. M. te., Moser, J., Pauzuolis, M., Ruiz-Silva, M., Heng, S., Laurent, D., Choeung, R., Dussart, P., Cantaert, T., Smit, J. M., & Rodenhuis-Zybert, I. A. (2020). TLR2 on blood monocytes senses dengue virus infection and its expression correlates with disease pathogenesis. *Nature Communications*, *11*(1). doi.org/10.1038/s41467-020-16849-7.

Ahammad, F., Abd Rashid, T. R. T., Mohamed, M., Tanbin, S., & Fuad, F. A. A. (2019). Contemporary strategies and current trends in designing antiviral drugs against dengue fever via targeting host-based approaches. *Microorganisms*, *7*(9). doi.org/10.3390/microorganisms7090296

Akey, D. L., Brown, W. C., Jose, J., Kuhn, R. J., & Smith, J. L. (2015). Structure-guided insights on the role of NS1 in flavivirus infection. *BioEssays*, *37*(5), 489–494. doi.org/10.1002/bies.201400182.

Alen, M. M. F., de Burghgraeve, T., Kaptein, S. J. F., Balzarini, J., Neyts, J., & Schols, D. (2011). Broad Antiviral activity of Carbohydrate-binding agents against the four serotypes of dengue virus in monocyte-derived dendritic cells. *PLoS ONE*, *6*(6).

doi.org/10.1371/journal.pone.0021658.

Ali, B., Al-Wabel, N. A., Shams, S., Ahamad, A., Khan, S. A., & Anwar, F. (2015). Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *5*(8), 601–611. doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.007.

Ali, F., Chorsiya, A., Anjum, V., Khasimbi, S., & Ali, A. (2020). A systematic review on phytochemicals for the treatment of dengue. *Phytotherapy Research*, *35*(4), 1782–1816. doi.org/10.1002/ptr.6917.

Aoe, M., Ueno-Iio, T., Shibakura, M., Shinohata, R., Usui, S., Arao, Y., Ikeda, S., Miyahara, N., Tanimoto, M., & Kataoka, M. (2017). Lavender essential oil and its main constituents inhibit the expression of TNF-α-induced cell adhesion molecules in endothelial cells. *Acta Medica Okayama*, *71*(6), 493–503. doi.org/10.18926/AMO/55586.

Arias, J., Mejía, J., Córdoba, Y., Martínez, J. R., Stashenko, E., & del Valle, J. M. (2020). Optimization of flavonoids extraction from *Lippia graveolens* and *Lippia origanoides* chemotypes with ethanol-modified supercritical CO2 after steam distillation. *Industrial Crops and Products*, *146*(July 2019), 112170. doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112170.

Asif, M., Saleem, M., Saadullah, M., Yaseen, H. S., & Al Zarzour, R. (2020). COVID-19 and therapy with essential oils having antiviral, anti-inflammatory, and immunomodulatory properties. *Inflammopharmacology*, *28*(5), 1153–1161. doi.org/10.1007/s10787-020-00744-0.

Aziz, Z. A. A., Ahmad, A., Setapar, S. H. M., Karakucuk, A., Azim, M. M., Lokhat, D., Rafatullah, M., Ganash, M., Kamal, M. A. & Ashraf, G. M. (2018). Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical and Therapeutic Potential - A Review. *Current Drug Metabolism*, *19*(13), 1100–1110. doi.org/10.2174/1389200219666180723144850

Bai, L., Bai, Y., Yang, Y., Zhang, W., Huang, L., Ma, R., Wang, L., Duan, H., & Wan, Q. (2020). Baicalin alleviates collagen induced arthritis and suppresses TLR2/MYD88/NF-κB p65 signaling in rats and HFLS.RAs. *Molecular Medicine Reports*, *22*(4), 2833–2841. doi.org/10.3892/mmr.2020.11369.

Barbalat, R., Lau, L., Locksley, RM., & Barton, GM. (2009). Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nat Immunol. 10*(11):1200-1207. doi: 10.1038/ni.1792.

Basílio-de-Oliveira, C. A., Aguiar, G. R., Baldanza, M. S., Barth, O. M., Eyer-Silva, W. A., & Paes, M. V. (2005). Pathologic study of a fatal case of dengue-3 virus infection in Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *9*(4), 341–347. doi.org/10.1590/S1413-86702005000400012.

Bhatt, P., Sabeena, SP., Varma, M., Arunkumar, G. (2021). Current Understanding of the Pathogenesis of Dengue Virus Infection. *Curr Microbiol. 78*(1),17–32. doi: 10.1007/s00284-020-02284-w.

Becquart, P., Wauquier, N., Nkoghe, D., Ndjoyi-Mbiguino, A., Padilla, C., Souris, M., & Leroy, E. M. (2010). Acute dengue virus 2 infection in Gabonese patients is associated with an early innate immune response, including strong interferon alpha production. *BMC Infectious Diseases*, *10*. doi.org/10.1186/1471-2334-10-356.

Bedoya, O.A., Hurtado, A.M., Pantoja, D & Santacruz, L. (2015). Actividad inhibitoria del aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans*. *Acta agronómica, 64*(2), 116-124. doi.org/10.15446/acag.v64n2.42964.

Begum, F., Das, S., Mukherjee, D., Mal, S., & Ray, U. (2019a). Insight into the tropism of dengue virus in humans. *Viruses*, *11*(12). doi.org/10.3390/v11121136.

Begum F, Das., S, Mukherjee D., & Ray, U. (2019b). Hijacking the Host Immune Cells by Dengue Virus: Molecular Interplay of Receptors and Dengue Virus Envelope. *Microorganisms 7*(9):323. doi: 10.3390/microorganisms7090323.

Brisse, M., & Ly, H. (2019). Comparative structure and function analysis of the RIG-I-like receptors: RIG-I and MDA5. *Frontiers in Immunology*, *10*(JULY). doi.org/10.3389/fimmu.2019.01586.

Butterweck, V.& Nahrstedt, A. (2012). What is the best strategy for preclinical testing of botanicals? A critical perspective. *Planta Medica*, *78*(8), 747–754. doi.org/10.1055/s-0031-

1298434.

Byk, L., & Gamarnik, A. (2016). Properties and functions of the Dengue Virus Capsid protein. *Annu Rev Virol.*, *3*(1), 263–281. doi.org/doi:10.1146/annurev-virology-110615-042334.

Carreño, M. F., Jiménez-Silva, C. L., Rey-Caro, L. A., Conde-Ocazionez, S. A., Flechas-Alarcón, M. C., Velandia, S. A., & Ocazionez, R. E. (2019). Dengue in Santander State, Colombia: fluctuations in the prevalence of virus serotypes are linked to dengue incidence and genetic diversity of the circulating viruses. *Tropical Medicine and International Health*, *24*(12), 1400–1410. doi.org/10.1111/tmi.13311.

Cascão, R., Fonseca, J. E., & Moita, L. F. (2017). Celastrol: A spectrum of treatment opportunities in chronic diseases. *Frontiers in Medicine*, *4*(JUN). doi.org/10.3389/fmed.2017.00069

Castillo, J. A., Naranjo, J. S., Rojas, M., Castaño, D., & Velilla, P. A. (2019). Role of Monocytes in the Pathogenesis of Dengue. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, *67*(1), 27–40. doi.org/10.1007/s00005-018-0525-7.

Cerny, D., Haniffa, M., Shin, A., Bigliardi, P., Tan, BK., Lee, B., Poidinger, M., Tan, EY., Ginhoux, F., & Fink, K. (2014). Selective susceptibility of human skin antigen presenting cells to productive dengue virus infection. *PLoS Pathog. 10*(12), e1004548. doi: 10.1371/journal.ppat.1004548.

Chen, H. R., Lai, Y. C., & Yeh, T. M. (2018). Dengue virus non-structural protein 1: A pathogenic factor, therapeutic target, and vaccine candidate. *Journal of Biomedical Science*, *25*(1), 1–11. doi.org/10.1186/s12929-018-0462-0.

Chen, Y.C., & Wang, S.Y. (2002). Activation of Terminally Differentiated Human Monocytes/Macrophages by Dengue Virus: Productive Infection, Hierarchical Production of Innate Cytokines and Chemokines, and the Synergistic Effect of Lipopolysaccharide. *Journal of Virology*, *76*(19), 9877–9887. doi.org/10.1128/jvi.76.19.9877-9887.2002.

Chiow, K., Phoon, M., Putti, T., Tan, B & Chow, V. (2016). Evaluation of antiviral activities of *Houttuynia cordata* Thunb. extract, quercetin, quercetin and cinanserin on murine

coronavirus and dengue virus infection. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *9*(1), 1–7. doi.org/10.1016/j.apjtm.2015.12.002.

Cho K., Lim Y. R., Lee, K., Lee, J., Lee, J. H & Lee, I.M. (2017). Terpenes from forests and human health. *Toxicological Research*, *33*(2), 97–106. doi.org/10.5487/TR.2017.33.2.097.

Choy, K. W., Murugan, D., Leong, X. F., Abas, R., Alias, A., & Mustafa, M. R. (2019). Flavonoids as natural anti-inflammatory agents targeting nuclear factor-kappa B (NFκB) signaling in cardiovascular diseases: A mini review. *Frontiers in Pharmacology*, *10*(OCT), 1–8. doi.org/10.3389/fphar.2019.01295.

Coldbeck-Shackley, RC., Eyre, NS., & Beard, MR. (2020). The Molecular Interactions of ZIKV and DENV with the Type-I IFN Response. *Vaccines (Basel) 8*(3), 530. doi: 10.3390/vaccines8030530.

Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. Vanden, & 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. doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.003.

Cruz-Oliveira, C., Freire, J. M., Conceição, T. M., Higa, L. M., Castanho, M. A. R. B., & Da Poian, A. T. (2015). Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology Reviews*, *39*(2), 155–170. doi.org/10.1093/femsre/fuu004.

Das, C., Bose, A., & Das, D. (2021). Ayurvedic Balarista ameliorate anti-arthritic activity in adjuvant induced arthritic rats by inhibiting pro-inflammatory cytokines and oxidative stress. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, *11*(3), 228–237. doi.org/10.1016/j.jtcme.2020.04.006.

De Lavor, É. M., Cavalcante Fernandes, A. W., de Andrade Teles, R. B., Pereira Leal, A. E. B., de Oliveira, R. G., Gama e Silva, M., de Oliveira, A. P., Silva, J. C., de Moura Fontes Araújo, M. T., Melo Coutinho, H. D., de Menezes, I. R. A., Picot, L., & da Silva Almeida, J. R. G. (2018). Essential oils and their major compounds in the treatment of chronic inflammation: A review of antioxidant potential in preclinical studies and molecular mechanisms. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2018*. doi.org/10.1155/2018/6468593.

De Nardo, D., Balka, K. R., Gloria, Y. C., Rao, V. R., Latz, E., & Masters, S. L. (2018). Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4) plays a dual role in myddosome formation and Toll-like receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(39), 15195–15207. doi.org/10.1074/jbc.RA118.003314.

De Sousa, L. R. F., Wu, H., Nebo, L., Fernandes, J. B., Da Silva, M. F. D. G. F., Kiefer, W., Kanitz, M., Bodem, J., Diederich, W. E., Schirmeister, T., & Vieira, P. C. (2015). Flavonoids as noncompetitive inhibitors of Dengue virus NS2B-NS3 protease: Inhibition kinetics and docking studies. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *23*(3), 466–470. doi.org/10.1016/j.bmc.2014.12.015.

Efferth, T., & Koch, E. (2011). Complex Interactions between Phytochemicals. The Multi-Target Therapeutic Concept of Phytotherapy. *Current Drug Targets*, *12*(1), 122–132. doi.org/10.2174/138945011793591626.

Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2018). Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. In *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. doi.org/10.1101/pdb.prot087379.

Flechas, M. C., Ocazionez, R. E., & Stashenko, E. E. (2018). Evaluation of *in vitro* Antiviral Activity of Essential Oil Compounds Against Dengue Virus. *Pharmacognosy Journal*, *10*(1), 55–59. doi.org/10.5530/pj.2018.1.11.

Flores-Ocelotl, M. R., Rosas-Murrieta, N. H., Moreno, D. A., Vallejo-Ruiz, V., Reyes-Leyva, J., Domínguez, F., & Santos-López, G. (2018). *Taraxacum officinale* and *Urtica dioica* extracts inhibit dengue virus serotype 2 replication in vitro. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *18*(1), 1–10. doi.org/10.1186/s12906-018-2163-3.

Frabasile, S., Koishi, A., Kuczera, D., Silveira, G., Verri, W. A., Dos Santos, C. N. y, & Bordignon, J. (2017). The citrus flavanone naringenin impairs dengue virus replication in human cells. *Scientific Reports*, *7*, 1–10. doi.org/10.1038/srep41864.

Friberg, H., Beaumier, C. M., Park, S., Pazoles, P., Endy, T. P., Mathew, A., Currier, J. R., Jarman, R. G., Anderson, K. B., Hatch, S., Thomas, S. J., & Rothman, A. L. (2018). Protective versus

pathologic pre-exposure cytokine profiles in dengue virus infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *12*(12), 1–15. doi.org/10.1371/journal.pntd.0006975.

García, C. C., Acosta, E. G., Carro, A. C., Bomben, R., Duschatzky, C. B., Perotti, M., Schuff, C. & Damonte, E. B. (2010). Virucidal Activity and Chemical Composition of Essential Oils from Aromatic Plants of Central West Argentina. *Natural Product Communications*, *5*(8), 1307–1310. doi.org/10.1177/1934578x1000500834.

García, M., Wehbe, M., Leveque, N., & Bodet, C. (2017). Skin innate immune response to flaviviral infection. *Eur. Cytokine Netw*, *28*(2), 41–51. doi:10.1684/ecn.2017.0394.

Ghildiyal, R., Prakash, V., Chaudhary, V., Gupta, V. & Gabrani, R. (2020). Phytochemicals as Antiviral Agents: Recent Updates. *Plant-Derived Bioactives: Production, Properties and Therapeutic Applications*, 1–619. doi.org/10.1007/978-981-15-1761-7.

Ghosh, D. (2016). Seed to Patient in Clinically Proven Natural Medicines. In *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity* (Issue 2014). Elsevier Inc. doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00064-4.

Gómez-Calderón, C., Mesa-Castro, C., Robledo, S., Gómez, S., Bolivar-Avila, S., Diaz-Castillo, F., & Martínez-Gutiérrez, 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*(1), 1–12. doi.org/10.1186/s12906-017-1562-1.

Gómez, L. A., Stashenko, E. & Ocazionez, R. E. (2013). Comparative Study on In Vitro Activities of Citral, Limonene and Essential Oils from *Lippia citriodora* and *L. alba* on Yellow Fever Virus. *Natural Product Communications*, *8*(2), 249–252. doi.org/10.1177/1934578x1300800230.

Gonçalves Pereira, M. H., Figueiredo, M. M., Queiroz, C. P., Magalhães, T. V. B., Mafra, A., Diniz, L. M. O., da Costa, Ú. L., Gollob, K. J., Antonelli, L. R. do V., & Santiago, H. da C. (2020). T-cells producing multiple combinations of IFNγ, TNF and IL10 are associated with mild forms of dengue infection. *Immunology*, *160*(1), 90–102. doi.org/10.1111/imm.13185.

Gopala Reddy, S. B., Chin, W. X., & Shivananju, N. S. (2018). Dengue virus NS2 and NS4: Minor proteins, mammoth roles. *Biochemical Pharmacology*, *154*, 54–63. doi.org/10.1016/j.bcp.2018.04.008.

Guex, N., & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, *18*(15), 2714–2723. doi.org/10.1002/elps.1150181505.

Gutierrez-Barbosa, H., Medina-Moreno, S., Zapata, J. C., & Chua, J. V. (2020). Dengue infections in Colombia: Epidemiological trends of a hyperendemic country. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, *5*(4). doi.org/10.3390/tropicalmed5040156.

Hamilton, J. A. (2008). Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nature Reviews Immunology*, *8*(7), 533–544. doi.org/10.1038/nri2356.

Harapan, H., Michie, A., Sasmono, R. T., & Imrie, A. (2020). Dengue: A minireview. *Viruses*, *12*(8), 1–35. doi.org/10.3390/v12080829.

Heinz, FX., Stiasny, K. (2017). The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. *Microbiol Mol Biol Rev. 81*(1):e00055-16. doi: 10.1128/MMBR.00055-16.

Hernandes, C., Pina, E.S., Taleb-Contini, S.H., Bertoni, B.W., Cestari, I.M., Espanha, L.G., Varanda, E.A., Camilo, K.F.B., Martinez, E.Z., Franca, S.C & Pereira, A. M. S. (2017). *Lippia origanoides* essential oil: an efficient and safe alternative to preserve food, cometic and pharmaceutical products. *Journal of Applied Microbiology*, *122*(4), 900–910. doi.org/10.1111/jam.13398.

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. doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60635-6.

Horng, T., Barton, G. M., Flavell, R. A., & Medzhitov, R. (2002). The adaptor molecule TIRAP

provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature*, *420*(6913), 329–333. doi.org/10.1038/nature01180.

Hottz, ED., Medeiros-de-Moraes, IM., Vieira-de-Abreu, A., de Assis, EF., Vals-de-Souza, R., Castro-Faria-Neto, HC., Weyrich, AS., Zimmerman, GA., Bozza, FA., Bozza, PT. (2014). Platelet activation and apoptosis modulate monocyte inflammatory responses in dengue. *J Immunol. 193*(4):1864-1872. doi: 10.4049/jimmunol.1400091.

Howe, M.K., Speer, B.L., Hughes, P.F., Loiselle, D.R., Vasudevan, S. & Haystead, T. A. J. (2017). An Inducible Heat Shock Protein 70 Small Molecule Inhibitor Demonstrates Anti-Dengue Virus Activity, Validating Hsp70 as a Host Antiviral Target. *Antiviral Research*, *176*(12), 139–148. doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.03.017.

Ibrahim, I. M., Abdelmalek, D. H., & Elfiky, A. A. (2019). GRP78: A cell's response to stress. *Life Sciences*, *226*(March), 156–163. doi.org/10.1016/j.lfs.2019.04.022.

Irwin, J.J., Sterling, T., Mysinger, M. M., Bolstad, E.S., Coleman, R. G. (2012). ZINC: A free tool to discover chemistry for biology. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *52*(7), 1757–1768. doi.org/10.1021/ci3001277.

Jhan, MK., Tsai, TT., Chen, CL., Tsai, CC., Cheng, YL., Lee, YC., Ko, CY., Lin, YS., Chang, CP., Lin, LT., & Lin, CF. (2017). Dengue virus infection increases microglial cell migration. *Sci Rep. 7*(1), 91. doi: 10.1038/s41598-017-00182-z.

Jensen, S., Nguyen, C. T., & Jewett, J. (2016). A gradient-free method for the purification of infective dengue virus for protein-level investigations. In *Journal of Virological Methods* (235), 125-130.doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.05.017.

Jessie, K., Fong, M. Y., Devi, S., Lam, S. K., & Wong, K. T. (2004). Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Journal of Infectious Diseases*, *189*(8), 1411–1418. doi.org/10.1086/383043.

Jin, M. S., Kim, S. E., Heo, J. Y., Lee, M. E., Kim, H. M., Paik, S. G., Lee, H., & Lee, J. O. (2007). Crystal Structure of the TLR1-TLR2 Heterodimer Induced by Binding of a Tri-Acylated

Lipopeptide. *Cell*, *130*(6), 1071–1082. doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.008.

Jin, X., & Kruth, H. S. (2016). Culture of macrophage colony-stimulating factor differentiated human monocyte-derived macrophages. *Journal of Visualized Experiments*, *2016*(112), 6–11. doi.org/10.3791/54244.

Kamaladasa, A., Gomes, L., Jeewandara, C., Shyamali, NL., Ogg, GS., Malavige, GN. (2016). Lipopolysaccharide acts synergistically with the dengue virus to induce monocyte production of platelet activating factor and other inflammatory mediators. *Antiviral Res.* Sep;133, 183–190. doi: 10.1016/j.antiviral.2016.07.016.

Khan, F., Ahmad, A., Ali, A., Rehman, T., & Ali Shah, S. (2018). Conformational hotspots of Dengue Virus NS5 RdRp. *Current Bioinformatics*, *12*(999), 1–1. doi.org/10.2174/1574893612666161214124827.

Kieser, KJ., & Kagan, JC. (2017). Multi-receptor detection of individual bacterial products by the innate immune system. *Nat Rev Immunol. 17*(6), 376-390. doi: 10.1038/nri.2017.25.

Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E. E. (2021). PubChem in 2021: New data content and improved web interfaces. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1), 1388–1395. doi.org/10.1093/nar/gkaa971.

King, C. A., Wegman, A. D., & Endy, T. P. (2020). Mobilization and Activation of the Innate Immune Response to Dengue Virus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*(November), 1–16. doi.org/10.3389/fcimb.2020.574417.

Klema, V. J., Ye, M., Hindupur, A., Teramoto, T., Gottipati, K., Padmanabhan, R., & Choi, K. H. (2016). Dengue Virus Nonstructural Protein 5 (NS5) Assembles into a Dimer with a Unique Methyltransferase and Polymerase Interface. *PLoS Pathogens*, *12*(2), 1–21. doi.org/10.1371/journal.ppat.1005451.

Kuo, Y. T., Liu, C. H., Li, J. W., Lin, C. J., Jassey, A., Wu, H. N., Perng, G. C., Yen, M. H., & Lin, L. T. (2020). Identification of the phytobioactive *Polygonum cuspidatum* as an antiviral

source for restricting dengue virus entry. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–15. doi.org/10.1038/s41598-020-71849-3.

Lai, J., Lin, Y., & Hsieh, S. (2017). Pharmacological intervention for dengue virus infection. *Biochemical Pharmacology*, *129*(January), 14–25. doi.org/10.1016/j.bcp.2017.01.005.

Lazear, H. M., Schoggins, J. W., & Diamond, M. S. (2019). Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity*, *50*(4), 907–923. doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.025.

Lee, J. K., Chui, J. L. M., Lee, R. C. H., Kong, H. Y., Chin, W. X., & Chu, J. J. H. (2019). Antiviral activity of ST081006 against the dengue virus. *Antiviral Research*, *171*(February), 104589. doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104589.

Lee, S. H., Tang, Y. Q., Rathkrishnan, A., Wang, S. M., Ong, K. C., Manikam, R., Payne, B. J., Jaganath, I. B., & Sekaran, S. D. (2013). Effects of cocktail of four local Malaysian medicinal plants (*Phyllanthus spp*.) against dengue virus 2. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *13*. doi.org/10.1186/1472-6882-13-192.

Li, J., Saruta, K., Dumouchel, J. P., Magat, J. M., Joanna, L., Ajami, D., Rebek, M., Jr, J. R., & Bigby, T. D. (2018). Small molecule mimetics of α-helical domain of IRAK2 attenuate the pro-inflammatory effects of IL-33 in asthma-like mouse models. *Journa Immunology*, *200*(12), 4036–4043. doi.org/10.4049/jimmunol.1700693.

Li, L., Lok, S. M., Yu, I. M., Zhang, Y., Kuhn, R. J., Chen, J., & Rossmann, M. G. (2008). The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: Structure and maturation. *Science*, *319*(5871), 1830–1834. doi.org/10.1126/science.1153263.

Li, P., Zheng, Y., & Chen, X. (2017). Drugs for autoimmune inflammatory diseases: From small molecule compounds to anti-TNF biologics. *Frontiers in Pharmacology*, *8*(JUL), 1–12. doi.org/10.3389/fphar.2017.00460

Liao, H., Ye, J., Gao, L., & Liu, Y. (2021). The main bioactive compounds of *Scutellaria baicalensis* Georgi. for alleviation of inflammatory cytokines: A comprehensive review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *133*(September 2020), 110917.

doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110917.

Lim, S. P., Noble, C., & Shi, P.Y. (2015). The dengue virus NS5 protein as a target for drug discovery. *Antiviral Research, 118*(A), 39–45. doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.04.010.

Lin, S. C., Lo, Y. C., & Wu, H. (2010). Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature, 465*(7300), 885–890. doi.org/10.1038/nature09121.

Liu, P., Ridilla, M., Patel, P., Betts, L., Gallichotte, E., Shahidi, L., Thompson, N. L., & Jacobson, K. (2017). Beyond attachment: Roles of DC-SIGN in dengue virus infection. *Traffic (Copenhagen, Denmark), 18*(4), 218–231. https://doi.org/10.1111/tra.12469

Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy, 2*(March). doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23.

Loo, Y.M., Fornek, J., Crochet, N., Bajwa, G., Perwitasari, O., Martinez-Sobrido, L., Akira, S., Gill, M. A., García-Sastre, A., Katze, M. G., & Gale, M. (2008). Distinct RIG-I and MDA5 Signaling by RNA Viruses in Innate Immunity. *Journal of Virology*, *82*(1), 335–345. doi.org/10.1128/jvi.01080-07.

Low, J.G.H., Ooi, E.E & Vasudevan, S. (2017). Current status of dengue therapeutics research and development. *Journal of Infectious Diseases*, *215*(Suppl 2), S96–S102. doi.org/10.1093/infdis/jiw423.

Ludert, J. E., Mosso, C., Ceballos-Olvera, I., & Del Angel, R. M. (2008). Use of a commercial enzyme immunoassay to monitor dengue virus replication in cultured cells. *Virology Journal*, *5*, 1–8. doi.org/10.1186/1743-422X-5-51.

Ma, Li., & Yao, L. (2020). Antiviral effects of plant-derived essential oils and their components: An updated review. *Molecules, 25*(11), 1–13. doi.org/10.3390/molecules25112627.

Ma, L., Jones, C. T., Groesch, T. D., Kuhn, R. J., & Post, C. B. (2004). Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101*(10), 3414–3419. doi.org/10.1073/pnas.0305892101.

Malavige, G. N., & Ogg, G. S. (2017). Pathogenesis of vascular leak in dengue virus infection. *Immunology*, *151*(3), 261–269. doi.org/10.1111/imm.12748.

Maleki, S. J., Crespo, J. F., & Cabanillas, B. (2019). Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chemistry*, *299*(July). doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125124.

Mello, C., Valente, L. M. M., Wolff, T., Lima-Junior, R. S., Fialho, L. G., Marinho, C. F., Azeredo, E. L., Oliveira-Pinto, L. M., De Cássia Alves Pereira, R., Siani, A. C., & Kubelka, C. F. (2017). Decrease in dengue virus-2 infection and reduction of cytokine/chemokine production by *Uncaria Guianensis* in human hepatocyte cell line huh-7. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *112*(6), 458–468. doi.org/10.1590/0074-02760160323.

Meneses, R., Ocazionez, R. E., Martínez, J. R., & Stashenko, E. E. (2009). 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*, 1–6. doi.org/10.1186/1476-0711-8-8.

Marovich, M., Grouard-Vogel, G., Louder, M., Eller, M., Sun, W., Wu, SJ., Putvatana, R., Murphy, G., Tassaneetrithep, B., Burgess, T., Birx, D., Hayes, C., Schlesinger-Frankel, S., & Mascola, J. (2001). Human dendritic cells as targets of dengue virus infection. *J Investig Dermatol Symp Proc. 6*(3), 219–224. doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.00037.x.

Mir, A., Ismatullah, H., Rauf, S., & Niazi, U. H. K. (2016). Identification of bioflavonoid as fusion inhibitor of dengue virus using molecular docking approach. *Informatics in Medicine Unlocked*, *3*, 1–6. doi.org/10.1016/j.imu.2016.06.001.

Mishra, B., Raghuraman, R., Agarwal, A., & Aduri, R. (2019). Finding small molecules with pan-serotype activity to target Dengue non-structural protein 1. *VirusDisease*, *30*(4), 477–489. doi.org/10.1007/s13337-019-00561-2.

Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., & Harrison, S. C. (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, *427*(6972), 313–319. doi.org/10.1038/nature02165.

Mohd Abd Razar, M.R., Misnan, N.M., Jelas, N., Norahmad, N., Muhammad, A., Ho, T., Jusoh, B., Sastu, U., Zainol, M., Wasiman, M., Muhammad, H., Thayan, R & Mohamed, A. (2018). The effect of freeze-dried Carica papaya leaf juice treatment on NS1 and viremia levels in dengue fever mice model. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *18*(1), 1–13. doi.org/10.1186/s12906-018-2390-7.

Morris, G.M., Huye, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S y Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, *30*(16), 2785–2791. doi.org/10.1002/jcc.21256.

Muller, D. & Young, P. (2013). The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Research*, *98*(2), 192–208. doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.03.008.

Nasar, S., Rashid, N., & Iftikhar, S. (2020). Dengue proteins with their role in pathogenesis, and strategies for developing an effective anti-dengue treatment: A review. *Journal of Medical Virology*, *92*(8), 941–955. doi.org/10.1002/jmv.25646.

Ngono, A.E & Shresta, S. (2018). Immune Response to Dengue and Zika. *Annual Review of Immunology*, *118*(36), 279–308. doi.org/10.1002/cncr.27633.

Nguyen, N. M., Tran, C. N. B., Phung, L. K., Duong, K. T. H., Huynh, H. L. A., Farrar, J., Nguyen, Q. T. H., Tran, H. T., Nguyen, C. V. V., Merson, L., Hoang, L. T., Hibberd, M. L., Aw, P. P. K., Wilm, A., Nagarajan, N., Nguyen, D. T., Pham, M. P., Nguyen, T. T., Javanbakht, H., … Simmons, C. P. (2013). A randomized, double-blind placebo-controlled trial of balapiravir, a polymerase inhibitor, in adult dengue patients. *Journal of Infectious Diseases*, *207*(9), 1442–1450. doi.org/10.1093/infdis/jis470.

Norahmad, N.A., Mohb Abd Razar, M., Misnan, N., Jelas, N., Sastu, U., Muhammad, A., Ho, T., Jusoh, B., Zolkifti, N., Thayan, R., Ripen, A., Zainol, M y Mohamed, A. (2019). Effect of freeze-dried *Carica papaya* leaf juice on inflammatory cytokines production during dengue virus infection in AG129 mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *19*(1), 1–10.

doi.org/10.1186/s12906-019-2438-3.

Ocazionez, R., Meneses, R., Torres, F & 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. doi: 10.1590/s0074-02762010000300010.

Ojha, A., Nandi, D., Batra, H., Singhal, R., Annarapu, G. K., Bhattacharyya, S., Seth, T., Dar, L., Medigeshi, G. R., Vrati, S., Vikram, N. K., & Guchhait, P. (2017). Platelet activation determines the severity of thrombocytopenia in dengue infection. *Scientific Reports*, *7*(August 2016), 1–10. doi.org/10.1038/srep41697.

Oliveira-Nascimento, L., Massari, P., & Wetzler, L. M. (2012). The role of TLR2 ininfection and immunity. *Frontiers in Immunology*, *3*(APR), 1–17. doi.org/10.3389/fimmu.2012.00079.

Oliveira, D. R., Leitão, G. G., Bizzo, H. R., Lopes, D., Alviano, D. S., Alviano, C. S., & Leitão, S. G. (2007). Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. *Food Chemistry*, *101*(1), 236–240. doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.022.

Onomoto, K., Onoguchi, K., & Yoneyama, M. (2021). Regulation of RIG-I-like receptor-mediated signaling: interaction between host and viral factors. *Cellular and Molecular Immunology*, *18*(3), 539–555. doi.org/10.1038/s41423-020-00602-7.

Pájaro-Castro, N., Flechas, M.C., Ocazionez, R., Stashenko, E. & Olivero-Verbel, J. (2015). Potential interaction of components from essential oils with dengue virus proteins. *Boletin Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, *14*(3), 141–155.

Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, *5*(E47), 1-15. doi.org/10.1017/jns.2016.41.

Pascual, M. E., Slowing, K., Carretero, E., Y, S. M. D., & Villar, A. (2001). *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, *76*(3), 201–214. doi: 10.1016/s0378-8741(01)00234-3.

Plaszczyca, A., Scaturro, P., Neufeldt, CJ., Cortese, M., Cerikan, B., Ferla, S., Brancale, A., Pichlmair, A., & Bartenschlager, R. (2019). A novel interaction between dengue virus

nonstructural protein 1 and the NS4A-2K-4B precursor is required for viral RNA replication but not for formation of the membranous replication organelle. *PLoS Pathog*. *15*(5): e1007736. doi: 10.1371/journal.ppat.1007736.

Pérez-Regidor, L., Zarioh, M., Ortega, L., & Martín-Santamaría, S. (2016). Virtual screening approaches towards the discovery of toll-like receptor modulators. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(9). doi.org/10.3390/ijms17091508.

Phoo, W. W., Li, Y., Zhang, Z., Lee, M. Y., Loh, Y. R., Tan, Y. B., Ng, E. Y., Lescar, J., Kang, C., & Luo, D. (2016). Structure of the NS2B-NS3 protease from Zika virus after self-cleavage. *Nature Communications*, *7*, 1–8. doi.org/10.1038/ncomms13410.

Picarazzi, F., Vicenti, I., Saladini, F., Zazzi, M., & Mori, M. (2020). Targeting the RdRp of emerging RNA viruses: The structure-based drug design challenge. *Molecules*, *25*(23). doi.org/10.3390/molecules25235695.

Pokidysheva, E., Zhang, Y., Battisti, AJ., Bator-Kelly, CM., Chipman, PR., Xiao, C., Gregorio, GG., Hendrickson, WA., Kuhn, RJ., Rossmann, MG. (2006). Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. *Cell. 124*(3), 485– 493. doi: 10.1016/j.cell.2005.11.042.

Powers, C.N. & Setzer, W. (2016). An *In-Silico* Investigation of Phytochemicals as Antiviral Agents Against Dengue Fever. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, *19*(7), 516–536. doi.org/10.2174/1386207319666160506123715.

Rabelo, K., Trugilho, M. R. O., Costa, S. M., Pereira, B. A. S., Moreira, O. C., Ferreira, A. T. S., Carvalho, P. C., Perales, J., & Alves, A. M. B. (2016). The effect of the dengue non-structural 1 protein expression over the HepG2 cell proteins in a proteomic approach. *Journal of Proteomics*, *152*, 339–354. doi.org/10.1016/j.jprot.2016.11.001.

Radons, J. (2016). The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress Chaperones*. *21(*3), 379-404. doi: 10.1007/s12192-016-0676-6.

Raekiansyah, M., Buerano, C. C., Luz, M. A. D., & Morita, K. (2018). Inhibitory effect of the

green tea molecule EGCG against dengue virus infection. *Archives of Virology*, *163*(6), 1649–1655. doi.org/10.1007/s00705-018-3769-y.

Rajapakse, S., De Silva, N. L., Weeratunga, P., Rodrigo, C., Sigera, C., & Fernando, S. D. (2019). *Carica papaya* extract in dengue: A systematic review and meta-analysis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *19*(1), 1–8. doi.org/10.1186/s12906-019-2678-2.

Raman, V., Lorenzo, J. L. F., Stashenko, E. E., Levy, M., Levy, M. M., & Camarillo, I. G. (2017). *Lippia origanoides* extract induces cell cycle arrest and apoptosis and suppresses NF-κB signaling in triple-negative breast cancer cells. *International Journal of Oncology*, *51*(6), 1801–1808. doi.org/10.3892/ijo.2017.4169.

Reichling J. (2021). Antiviral and Virucidal Properties of Essential Oils and Isolated Compounds - A Scientific Approach. *Planta Med.* 2021 Jun 18. doi: 10.1055/a-1382-2898.

Reyes-Del Valle, J., Chávez-Salinas, S., Medina, F., & Del Angel, RM. (2005). Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol. 79*(8):4557-4567. doi: 10.1128/JVI.79.8.4557-4567.2005.

Rehwinkel, J., & Gack, M.U. (2020). RIG-1-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nat Rev Immunol. 20*,537-551. doi.org/10.1038/s41577-020-0288-3.

Rodenhuis-Zybert, I., Wilschut, J y Smit, J. (2010). Dengue Virus Life Cycle: Viral and Host Factors Modulating Infectivity. *Cellular and Molecular Life Sciencies*, *67*, 2773–2786. doi.org/10.1007/s00018-010-0357-z.

Rosmalena, R., Elya, B., Dewi, B. E., Fithriyah, F., Desti, H., Angelina, M., Hanafi, M., Lotulung, P. D., Prasasty, V. D., & Seto, D. (2019). The Antiviral Effect of Indonesian Medicinal Plant Extracts Against Dengue Virus *In Vitro* and *In Silico*. *Pathogens*. *8*(2) 1-11. doi.org/10.3390/pathogens8020085.

Royle, J., Ramírez-Santana, C., Akpunarlieva, S., Donald, CL., Gestuveo, RJ., Anaya, JM., Merits, A., Burchmore, R., Kohl, A., & Varjak, M. (2020). Glucose-Regulated Protein 78 Interacts with Zika Virus Envelope Protein and Contributes to a Productive Infection. *Viruses. 12*(5), 524. doi: 10.3390/v12050524.

Sathyapalan, D. T., Padmanabhan, A., Moni, M., P-prabhu, B., Prasanna, P., Balachandran, S., Trikkur, S. P., Jose, S., Edathadathil, F., Anilkumar, J. O., Jayaprasad, R., Koramparambil, G., Kamath, R. C., Id, V. M., & Id, V. M. (2020). Efficacy & safety of *Carica papaya* leaf extract (CPLE) in severe thrombocytopenia (≤ 30.000/μ adult dengue – Results of a pilot study. *PLoS One. 15*(2): e0228699. doi: 10.1371/journal.pone.0228699.

Scaturro, P., Cortese, M., Chatel-Chaix, L., Fischl, W., & Bartenschlager, R. (2015). Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. *PLoS Pathogens*, *11*(11), 1–32. doi.org/10.1371/journal.ppat.1005277.

Schneemann, A. (2006). The structural and functional role of RNA in icosahedral virus assembly. *Annual Review of Microbiology*, *60*, 51–67. doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142304.

Schoggins, J. W. (2019). Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annual Review of Virology*, *6*, 567–584. doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015756.

Screaton, G., Mongkolsapaya, J., Yacoub, S & Roberts, C. (2015). New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nature Reviews Immunology. 15*(12)745–759. doi: 10.1038/nri3916.

Shah, M., Wadood, A., Rahman, Z., & Husnain, T. (2013). Interaction and Inhibition of Dengue Envelope Glycoprotein with Mammalian Receptor DC-Sign, an In-Silico Approach. *PLoS ONE*, *8*(3), 1–10. doi.org/10.1371/journal.pone.0059211.

Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G. C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., Tundis, R., Sharifi-Rad, M., Loizzo, M. R., Oluwaseun Ademiluyi, A., Sharifi-Rad, R., Ayatollahi, S. A., & Iriti, M. (2017). Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. In *Molecules 22*(1). 70. doi.org/10.3390/molecules22010070.

Singh, A., Bisht, P., Bhattacharya, S., & Guchhait, P. (2020). Role of Platelet Cytokines in Dengue Virus Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*(September), 1–9. doi.org/10.3389/fcimb.2020.561366.

Singh, P. & Rawat, P. (2017). Evolving herbal formulations in management of dengue fever. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, *8*(3), 207–210. doi.org/10.1016/j.jaim.2017.06.005.

Sinha, M., Bandyopadhyay, S., Banerjee, S., Chakraborty, U., Chattcharjee, A., Nayak, D., Khurana, A., Manchanda, R., Srkar, D. & Das, S. (2018). Quercetin alters pro-inflammatory cytokine changes in wild dengue virus callenged HepG2 cell line. *World Journal of Pharmaceutical Research*, *7*(15), 1137–1149. doi.org/10.20959/wjpr201815-13083.

Slon Campos, J., Poggianella, M., Marchese, S., Mossenta, M., Rana, J., Arnoldi, F., Bestagno, M & Burrone, O. (2017). DNA-immunisation with dengue virus E protein domains I/II, but not domain III, enhances Zika, West Nile and Yellow Fever virus infection. *PLoS ONE*. *12*(7): e0181734. doi: 10.1371/journal.pone.0181734.

Smee, D. F., Morrison, A. C., Barnard, D. L., & Sidwell, R. W. (2002). Comparison of colorimetric, fluorometric, and visual methods for determining anti-influenza (H1N1 and H3N2) virus activities and toxicities of compounds. *Journal of Virological Methods*, *106*(1), 71–79. doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00137-4.

Songprakhon, P., Thaingtamtanha, T., Limjindaporn, T., Puttikhunt, C., Srisawat, C., Luangaram, P., Dechtawewat, T., Uthaipibull, C., Thongsima, S., Yenchitsomanus, P. thai, Malasit, P., & Noisakran, S. (2020). Peptides targeting dengue viral nonstructural protein 1 inhibit dengue virus production. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–16. doi.org/10.1038/s41598-020-69515-9.

Sood, R., Raut, R., Tyagi, P., & Kumar, P., Barman, T.K., Singhal, S., Shirumalla, R.K., Kanoje, V., Subbarayan, R., Rajerethinam, R., Sharma, N., Kanaujia, A., Shukla, G., Gupta, Y. K. et al. (2015). *Cissampelos pareira* Linn: Natural Source of Potent Antiviral Activity against All Four Dengue Virus Serotypes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *9*(12), 1–20. doi.org/10.1371/journal.pntd.0004255.

Souza, MT; Almeida, J; Araujo, A; Duarte, M, Gelain, D; Moreira, J; dos Santos, M & Quintans-Júnior, L. (2014). Structure-activity relationship of terpenes with anti-inflammatory profile - A systematic review. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, *115*(3), 244–256.

doi.org/10.1111/bcpt.12221.

Sprokholt, J., Helgers, L. C., & Geijtenbeek, T. B. H. (2017). Innate immune receptors drive dengue virus immune activation and disease. *Future Virology*, *13*(4), 287–305. doi.org/10.2217/fvl-2017-0146.

Srisutthisamphan, K., Jirakanwisal, K., Ramphan, S., Tongluan, N., Kuadkitkan, A., & Smith, DR. (2018). Hsp90 interacts with multiple dengue virus 2 proteins. *Sci Rep. 8*(1):4308. doi: 10.1038/s41598-018-22639-5.

Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Durán, C., Córdoba, Y., & Caballero, D. (2014). Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género *Lippia* (Verbenaceae) cultivadas en Colombia. *Rev. Acad. Colomb. Cienc*, *33*(Supl.), 89–105. doi.org/10.18257/raccefyn.156.

Stashenko, E., Martínez, J., Cala, M., Durán, D & Caballero, D. (2013). Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. *Journal of Separation Science*, *36*(1), 192–202. doi.org/10.1002/jssc.201200877.

Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Ruíz, C. a, Arias, G., Durán, C., Salgar, W., & Cala, M. (2010). *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *Journal of Separation Science*, *33*(1), 93–103. doi: 10.1002/jssc.200900452.

Stashenko, E. E., Ruiz, C., Muñoz, A., Castañeda, M & Martínez, J. R. (2008). Composition and Antioxidant activity of Essential Oils of *Lippia origanoides* H.B.K grown in Colombia. *Natural Product Communications*, *3*(4), 563–566. doi.org/10.1177/1934578X0800300417.

Stein, D. A., Perry, S. T., Buck, M. D., Oehmen, C. S., Fischer, M. A., Poore, E., Smith, J. L., Lancaster, A. M., Hirsch, A. J., Slifka, M. K., Nelson, J. A., Shresta, S., & Fruh, K. (2011). Inhibition of Dengue Virus Infections in Cell Cultures and in AG129 Mice by a Small Interfering RNA Targeting a Highly Conserved Sequence. *Journal of Virology*, *85*(19), 10154–10166. doi.org/10.1128/jvi.05298-11.

Sun, P., García, J., Comach, G., Vahey, M. T., Wang, Z., Forshey, B. M., Morrison, A. C., Sierra, G., Bazan, I., Rocha, C., Vilcarromero, S., Blair, P. J., Scott, T. W., Camacho, D. E., Ockenhouse, C. F., Halsey, E. S., & Kochel, T. J. (2013). Sequential Waves of Gene Expression in Patients with Clinically Defined Dengue Illnesses Reveal Subtle Disease Phases and Predict Disease Severity. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *7*(7). doi.org/10.1371/journal.pntd.0002298.

Taguwa, S., Maringer, K., Li, X., Bernal-Rubio, D., Rauch, J. N., Gestwicki, J. E., Andino, R., Fernandez-Sesma, A., & Frydman, J. (2015). Defining Hsp70 Subnetworks in Dengue Virus Replication Reveals Key Vulnerability in Flavivirus Infection. *Cell, 163*(5), 1108–1123. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.046.

Tambunan, U. S. F., Zahroh, H., Parikesit, A. A., Idrus, S., & Kerami, D. (2015). Screening analogs of β-OG pocket binder as fusion inhibitor of dengue virus 2. *Drug Target Insights*, *9*, 33–49. doi.org/10.4137/DTI.S31566.

Tang, L., Ling, A., Koh, R., Chye, S & Voon, K. (2012). Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *12*(1), 3. doi.org/10.1186/1472-6882-12-3.

Tang, Y., Liu, J., Zhang, D., Xu, Z., Ji, J., & Wen, C. (2020) Cytokine Storm in COVID-19: The Current Evidence and Treatment Strategies. *Front Immunol.* 11:1708. doi: 10.3389/fimmu.2020.01708.

Tarkang, P. A., Appiah-Opong, R., Ofori, M. F., Ayong, L. S., & Nyarko, A. K. (2016). Application of multi-target phytotherapeutic concept in malaria drug discovery: A systems biology approach in biomarker identification. *Biomarker Research*, *4*(1), 1–16. doi.org/10.1186/s40364-016-0077-0.

Tassaneetrithep, B., Burgess, TH., Granelli-Piperno, A., Trumpfheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, MA., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Birx, DL., Steinman, RM., Schlesinger, S., & Marovich, MA. (2003). DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med. 197*(7), 823–829. doi: 10.1084/jem.20021840.

Thepparit, C., Phoolcharoen, W., Suksanpaisan, L. y, & Smith, D. (2004). Internalization and propagation of the dengue virus in Human Hepatoma (HepG2) cells. *Intervirology*, *47*(2), 78–86. doi.org/10.1159/000077830.

Ti, H., Zhuang, Z., Yu, Q., & Wang, S. (2021). Progress of plant medicine derived extracts and alkaloids on modulating viral infections and inflammation. *Drug Design, Development and Therapy*, *15*, 1385–1408. doi.org/10.2147/DDDT.S299120.

Tian, Y., Grifoni, A., Sette, A., & Weiskopf, D. (2019). Human T Cell Response to Dengue Virus Infection. *Frontiers in Immunology*, *10*(September), 1–9. doi.org/10.3389/fimmu.2019.02125.

Tian, Y., Sette, A., & Weiskopf, D. (2016). Cytotoxic CD4 T cells: Differentiation, function, and application to dengue virus infection. *Frontiers in Immunology*, *7*(DEC), 1–9. doi.org/10.3389/fimmu.2016.00531.

Tolfvenstam, T., Lindblom, A., Schreiber, M. J., Ling, L., Chow, A., Ooi, E. E., & Hibberd, M. L. (2011). Characterization of early host responses in adults with dengue disease. *BMC Infectious Diseases*, *11*(1), 209. doi.org/10.1186/1471-2334-11-209.

Tomar, S., Mudgal, R., & Fatma, B. (2017). Flavivirus protease: An antiviral target. *In Viral Proteases and Their Inhibitors*. (6). 137-161. doi.org/10.1016/B978-0-12-809712-0.00006-X

Troost, B., & Smit, J. M. (2020). Recent advances in antiviral drug development towards dengue virus. *Current Opinion in Virology*, *43*(Table 1), 9–21. doi.org/10.1016/j.coviro.2020.07.009.

Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, *31*(2). doi.org/10.1002/jcc.21334.

Trujillo-Correa, A. I., Quintero-Gil, D. C., Diaz-Castillo, F., Quiñones, W., Robledo, S. M., & Martinez-Gutierrez, M. (2019). In vitro and in silico anti-dengue activity of compounds obtained from *Psidium guajava* through bioprospecting. *BMC Complementary and*

Alternative Medicine, *19*(1), 1–16. doi.org/10.1186/s12906-019-2695-1.

Ullah, A., Munir, S., Badshah, S. L., Khan, N., Ghani, L., Poulson, B. G., Emwas, A., & Jaremko, M. (2020). Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. Molecules. 25(22):5243. doi: 10.3390/molecules25225243.

Uno, N., & Ross, T. M. (2018). Dengue virus and the host innate immune response. *Emerging Microbes and Infections*, *7*(1). doi.org/10.1038/s41426-018-0168-0

Valdivieso-Ugarte, M., Gomez-Llorente, C., Plaza-Díaz, J., & Gil, Á. (2019). Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: A systematic review. *Nutrients*, *11*(11), 1–29. doi.org/10.3390/nu11112786.

Velandia, S. A., Flechas, M. C., Stashenko, E. E., & Ocazionez, R. E. (2016). Propuesta para seleccionar aceites esenciales de plantas de colombia para investigación con base en su citotoxicidad. *Vitae*, *23*(1), 18–29. doi.org/10.17533/udea.vitae.v23n1a03

Villar L.A., Rojas, D. P., Besada-Lombana, S., & Sarti, E. (2015). Epidemiological Trends of Dengue Disease in Colombia (2000-2011): A Systematic Review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *9*(3), 1–16. doi.org/10.1371/journal.pntd.0003499

Wahala, W. M. P. B., & de Silva, A. M. (2011). The human antibody response to dengue virus infection. *Viruses*, *3*(12), 2374–2395. doi.org/10.3390/v3122374

Wang, L., Song, J., Liu, A., Xiao, B., Li, S., Wen, Z., Lu, Y., & Du, G. (2020). Research Progress of the Antiviral Bioactivities of Natural Flavonoids. *Natural Products and Bioprospecting*, *10*(5), 271–283. doi.org/10.1007/s13659-020-00257-x

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W296–W303. doi.org/10.1093/nar/gky427.

Wati, S., Soo, M.L., Zilm, P., Li, P., Paton, A. W., Burrell, C. J., Beard, M., & Carr, J. M. (2009). Dengue Virus Infection Induces Upregulation of GRP78, Which Acts To Chaperone Viral

Antigen Production. *Journal of Virology*, *83*(24), 12871–12880. doi.org/10.1128/jvi.01419-09.

Whitehorn, J., Van, V. C. N., & Simmons, C. P. (2014). Dengue human infection models supporting drug development. *Journal of Infectious Diseases*, *209*(Suppl 2), 66-70. doi: 10.1093/infdis/jiu062.

Wiederstein, M., & Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, *35*(SUPPL.2), 407–410. doi.org/10.1093/nar/gkm290.

Wies, E., Wnag, M., Maharaj, N., Chen, K., Zhou, S., Finberg, R. & Gack, M. (2013). Dephosphorylation of the RNA sensors RIG-I and MDA5 by the phosphatase PP1 is essential for innate immune signaling. *Immunity*, *38*(3), 437–449. doi: 10.1016/j.immuni.2012.11.018.

Williams, C. J., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Prisant, M. G., Videau, L. L., Deis, L. N., Verma, V., Keedy, D. A., Hintze, B. J., Chen, V. B., Jain, S., Lewis, S. M., Arendall, W. B., Snoeyink, J., Adams, P. D., Lovell, S. C., Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2018). MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Science*, *27*(1), 293–315. doi.org/10.1002/pro.3330.

Wiltgen, M. (2018). Algorithms for structure comparison and analysis: Homology modelling of proteins. In *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics* (1–3). doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20484-6.

Wu, M. F., Chen, S. T., & Hsieh, S. L. (2013). Distinct regulation of dengue virus-induced inflammasome activation in human macrophage subsets. *Journal of Biomedical Science*, *20*(1), 1–9. doi.org/10.1186/1423-0127-20-36.

Wu, Y. H., Tseng, C. K., Wu, H. C., Wei, C. K., Lin, C. K., Chen, I. S., Chang, H. S., & Lee, J. C. (2019). Avocado (*Persea americana*) fruit extract (2R,4R)-1,2,4-trihydroxyheptadec-16-yne inhibits dengue virus replication via upregulation of NF-κB–dependent induction of antiviral interferon responses. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–10. doi.org/10.1038/s41598-018-36714-4.

World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition. Geneva: World Health Organization; 2020. PMID: 23762963.

Yang, J., Xu, Y., Yan, Y., Li, W., Zhao, L., Dai, Q., Li, Y., Li, S., Zhong, J., Cao, R., & Zhong, W (2020). Small Molecule Inhibitor of ATPase Activity of HSP70 as a Broad-Spectrum Inhibitor against Flavivirus Infections. *ACS Infect Dis.6*(5), 832-843. doi: 10.1021/acsinfecdis.9b00376.

Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M., & Matar, C. (2018). The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*, *10*(11), 1–23. doi.org/10.3390/nu10111618.

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, YM., Gale, M Jr., Akira, S., Yonehara, S., Kato, A., & Fujita, T. (2005). Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol. 175*(5):2851-2858. doi: 10.4049/jimmunol.175.5.2851.

Yoshida, H., Watanabe, W., Oomagari, H., Tsuruta, E., Shida, M., & Kurokawa, M. (2013). Citrus flavonoid naringenin inhibits TLR2 expression in adipocytes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *24*(7), 1276–1284. doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.10.003.

Yu, J., Tseng, C., Lin, C., & Hsu, Y. (2017). Celastrol inhibits dengue virus replication via up-regulation type I interferon and downstream interferon-stimulated responses. *Antiviral*, *137*, 49–57. doi: 10.1016/j.antiviral.2016.11.010.

Zandi, K., Lim, T. H., Rahim, N. A., Shu, M. H., Teoh, B. T., Sam, S. S., Danlami, M. B., Tan, K. K., & Abubakar, S. (2013). Extract of *Scutellaria baicalensis* inhibits dengue virus replication. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *13*. doi.org/10.1186/1472-6882-13-91.

Zhang, Q., Hunke, C., Yau, Y. H., Seow, V., Lee, S., Tanner, L. B., Guan, X. L., Wenk, M. R., Fibriansah, G., Chew, P. L., Kukkaro, P., Biuković, G., Shi, P. Y., Shochat, S. G., Grüber, G., & Lok, S. M. (2012). The stem region of premembrane protein plays an important role in the virus surface protein rearrangement during dengue maturation. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(48), 40525–40534. doi.org/10.1074/jbc.M112.384446.

Zhang, X., Jia, R., Shen, H., Wang, M., Yin, Z., & Cheng, A. (2017). Structures and functions of the envelope glycoprotein in flavivirus infections. *Viruses*, *9*(11), 1–14. doi.org/10.3390/v9110338.

Zhao, Y., Soh, T. S., Zheng, J., Chan, K. W. K., Phoo, W. W., Lee, C. C., Tay, M. Y. F., Swaminathan, K., Cornvik, T. C., Lim, S. P., Shi, P. Y., Lescar, J., Vasudevan, S. G., & Luo, D. (2015). A Crystal Structure of the Dengue Virus NS5 Protein Reveals a Novel Inter-domain Interface Essential for Protein Flexibility and Virus Replication. *PLoS Pathogens*, *11*(3), 1–27. doi.org/10.1371/journal.ppat.1004682.

Zhong, Z., Liu, L. J., Dong, Z. Q., Lu, L., Wang, M., Leung, C. H., Ma, D. L., & Wang, Y. (2015). Structure-based discovery of an immunomodulatory inhibitor of TLR1-TLR2 heterodimerization from a natural product-like database. *Chemical Communications*, *51*(56), 11178–11181. doi.org/10.1039/c5cc02728d.

Apéndices

Apéndice A. Identificación y cuantificación por UHPLC-ESI (+)-Orbitrap-MS de compuestos fenólicos presentes en extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de biomasa residual de *Lippia origanoides* quimiotipo felandreno.

Fitoquímico	Fórmula	Δ ppm	(mg/g ± s; n=3)
Taxifolina	$C_{15}H_{12}O_7$	0.30	0.73 ± 0.01
Eriodictiol	$C_{15}H_{12}O_6$	0.57	2.2 ± 0.1
Quercetina	$C_{15}H_{10}O_7$	0.12	1.08 ± 0.03
Luteolina	$C_{15}H_{10}O_6$	0.92	0.93 ± 0.04
Naringenina	$C_{15}H_{12}O_5$	0.28	0.11 ± 0.01
Galangina metilada	$C_{16}H_{12}O_5$	0.42	0.10 ± 0.01
Crisoeriol	$C_{16}H_{12}O_6$	0.99	0.07 ± 0.01
Cirsimaritina	$C_{17}H_{14}O_6$	0.83	0.07 ± 0.01
Sakuranetina	$C_{16}H_{14}O_5$	0.28	0.01 ± 0.01
Pinocembrina	$C_{15}H_{12}O_4$	0.20	0.47 ± 0.04
Galangina	$C_{15}H_{10}O_5$	0.49	0.40 ± 0.04

Apéndice B. Identificación y cuantificación por UHPLC-ESI (+)-Orbitrap-MS de compuestos fenólicos presentes en extractos obtenidos con CO_2 supercrítico a partir de biomasa residual de *Lippia origanoides* quimiotipo felandreno.

Fitoquímico	Fórmula	Δ ppm	(mg/g ± s; n =3)
Eridictiol	$C_{15}H_{12}O_6$	0.57	0.44 ± 0.1
Naringenina	$C_{15}H_{12}O_5$	0.28	1.06 ± 0.05
Chrisoeriol	$C_{16}H_{12}O_6$	0.99	0.04 ± 0.01
Cirsimaritina	$C_{17}H_{14}O_6$	0.83	0.05 ± 0.01
Sakuranetina	$C_{16}H_{14}O_5$	0.28	1.42 ± 0.08
Pinocembrina	$C_{15}H_{12}O_4$	0.20	48.3 ± 1.0
Galangina	$C_{15}H_{10}O_5$	0.49	7.2 ± 0.2

Apéndice C. Composición química cualitativa y cuantitativa de los aceites esenciales *Lippia origanoides*.

Fitoquímico	$RI_{calc.}$	$RI_{lit.}$	%,
α-Thujene	931	931	0.9
α-Pineno	937	939	0.9
Canfeno	953	953	0.1
Sabineno	976	976	0.4
β-Mirceno	992	991	1.8
α-Felandreno	1006	1005	0.2
δ-3-Careno	1012	1011	0.1
α-Terpineno	1019	1018	1.1
p-Cimeno	1028	1026	10.3
Limoneno	1034	1200	1.2
trans-β Ocimeno	1040	1040	0.1
y-Terpineno	1062	1062	4.1
Cis-Hidrato de sabineno	1075	1450	5.0
trans-Hidrato de sabineno	1106	1160	0.1
Terpinoleno	1090	1088	0.3
Linalool	1101	1098	2.5
Borneol	1168	1165	0.2
Terpinen-4-ol	1180	1177	0.9
Timol metíl éter	1237	1235	2.2
Timol	1289	1290	18.5
Carvacrol	1303	1298	38.6
Acetato de timilo	1350	1858	4.8
Eugenol	1358	2080	0.2
1-Octen-3-ol	981	978	0.4
1.8-cineol	1040	1225	5.0
α-Alaskene	1501	1719	0.3
trans-Piperitol	1264	1641	1.1
α-Terpineol	1203	1705	0.1
α-Humuleno	1453	1454	0.1
y-Gurjuneno	1476	2210	0.1
Óxido de cariofileno	1583	1581	0.2
α-Eudesmol	1674	2116	1.4
Germacreno D	1481	1480	0.2
β-Bisaboleno	1509	1509	0.1
y-Muuroleno	1464	1709	0.5
Biciclogermacreno	1510	1750	0.1
Espatulenol	1595	2043	0.1
trans-β-Cariofileno	1436	1606	0.3
trans-y-Bisaboleno	1509	1509	0.1
δ-cadineno	1524	1524	0.1
β-Selineno	1486	1485	0.5
trans-Calameneno	1534	1844	1.1
trans-Nerolidol	1566	1946	0.2

Datos tomados de: Stashenko *et al*., 2013.

Apéndice D. Energías de interacción (kcal/mol) con flavonoides de extractos de *Lippia origanoides* y proteínas de DENV-1

Fitoquímico	**C**	**prM**	**E**	**NS1**	**NS2B/NS3**	**NS5MTasa**	**NS5RdRp**
Quercetina	-6.00 ± 0.00	-6.20 ± 0.00	-8.09 ± 0.03	-10.28 ± 0.70	-7.24 ± 0.05	-7.88 ± 0.04	-7.20 ± 0.00
Galangina	-6.00 ± 0.00	-5.60 ± 0.00	-7.78 ± 0.04	-9.20 ± 0.00	-6.86 ± 0.05	-7.89 ± 0.03	-7.40 ± 0.00
Pinocembrina	-6.10 ± 0.00	-5.78 ± 0.06	-8.31 ± 0.03	-9.10 ± 0.00	-7.05 ± 0.05	-8.01 ± 0.03	-7.30 ± 0.00
Taxifolina	-5.70 ± 0.00	-6.10 ± 0.00	-8.10 ± 0.00	-8.90 ± 0.00	-7.30 ± 0.00	-7.70 ± 0.00	-7.40 ± 0.00
Eriodictiol	-6.02 ± 0.04	-6.10 ± 0.00	-8.60 ± 0.00	-8.76 ± 0.13	-7.65 ± 0.05	-7.70 ± 0.00	-7.80 ± 0.00
Sakuranetina	-6.00 ± 0.00	-5.66 ± 0.05	-8.09 ± 0.03	-8.50 ± 0.00	-6.90 ± 0.00	-7.45 ± 0.05	-7.30 ± 0.00
Luteolina	-6.30 ± 0.00	-6.08 ± 0.04	-8.59 ± 0.03	-8.42 ± 0.19	-7.50 ± 0.00	-7.82 ± 0.04	-7.80 ± 0.00
Crisoeriol	-6.25 ± 0.05	-5.82 ± 0.04	-8.51 ± 0.09	-8.37 ± 0.07	-7.30 ± 0.00	-7.93 ± 0.05	-7.80 ± 0.00
Naringenina	-5.90 ± 0.00	-5.80 ± 0.00	-8.01 ± 0.03	-8.30 ± 0.00	-7.30 ± 0.00	-7.45 ± 0.14	-7.39 ± 0.03
Galangina metilada	-5.78 ± 0.08	-5.20 ± 0.00	-7.50 ± 0.00	-7.72 ± 0.20	-6.90 ± 0.00	-7.40 ± 0.00	-7.10 ± 0.00
Cirsimaritina	-5.90 ± 0.00	-5.89 ± 0.03	-7.70 ± 0.00	-7.47 ± 0.07	-7.00 ± 0.00	-7.42 ± 0.15	-7.50 ± 0.00
Compuestos de referencia							
Galato de epigalocatequina	-5.90 ± 0.00	-6.60 ± 0.00	-9.95 ± 0.05	-10.05 ± 0.20	-7.41 ± 0.03	-8.64 ± 0.13	-9.27 ± 0.05
Baicaleina	-6.20 ± 0.00	-6.10 ± 0.00	-8.59 ± 0.03	-8.44 ± 0.05	-7.80 ± 0.00	-7.76 ± 0.05	-8.00 ± 0.00

Apéndice E. Energías de interacción (kcal/mol) con flavonoides de *Lippia origanoides* y proteínas celulares presentes en macrófagos humanos.

Fitoquímico	TLR-1/2	MyD88	NF-κB	HSP70	HSP90	GRP78	DC-SIGN	RIG-1	MAVS
Crisoeriol	-8.72 ± 0.08	-9.00 ± 0.00	-7.82 ± 0.06	-9.01 ± 0.03	-6.50 ± 0.00	-9.45 ± 0.13	-8.52 ± 0.04	-7.51 ± 0.03	-8.00 ± 0.00
Taxifolina	-8.50 ± 0.00	-9.10 ± 0.00	-7.62 ± 0.10	-9.08 ± 0.04	-6.20 ± 0.00	-8.94 ± 0.19	-8.32 ± 0.04	-7.70 ± 0.00	-8.00 ± 0.00
Luteolina	-9.36 ± 0.08	-9.00 ± 0.00	-8.00 ± 0.00	-9.20 ± 0.00	-6.60 ± 0.00	-8.18 ± 0.04	-8.40 ± 0.00	-7.80 ± 0.00	-7.99 ± 0.03
Pinocembrina	-9.35 ± 0.13	-8.78 ± 0.04	-7.30 ± 0.00	-9.09 ± 0.03	-6.10 ± 0.00	-7.90 ± 0.00	-8.07 ± 0.21	-7.70 ± 0.00	-8.10 ± 0.00
Eriodictiol	-9.27 ± 0.28	-8.90 ± 0.00	-8.10 ± 0.00	-9.09 ± 0.03	-6.40 ± 0.00	-8.48 ± 0.32	-8.30 ± 0.00	-7.80 ± 0.00	-7.80 ± 0.00
Sakuranetina	-8.41 ± 0.20	-8.80 ± 0.00	-7.47 ± 0.05	-9.09 ± 0.03	-6.29 ± 0.03	-7.83 ± 0.08	-8.10 ± 0.00	-7.59 ± 0.03	-8.10 ± 0.00
Naringenina	-9.00 ± 0.00	-8.90 ± 0.00	-7.60 ± 0.00	-9.01 ± 0.03	-6.40 ± 0.00	-7.71 ± 0.03	-8.00 ± 0.00	-7.50 ± 0.00	-7.90 ± 0.00
Cirsimaritina	-8.38 ± 0.04	-8.60 ± 0.00	-7.10 ± 0.00	-8.80 ± 0.00	-6.30 ± 0.00	-8.76 ± 0.49	-8.24 ± 0.10	-7.70 ± 0.00	-7.70 ± 0.00
Galangina	-7.83 ± 0.05	-8.70 ± 0.17	-7.35 ± 0.05	-8.00 ± 0.00	-5.95 ± 0.05	-7.40 ± 0.00	-8.30 ± 0.00	-7.08 ± 0.04	-8.15 ± 0.05
Galangina metilada	-8.45 ± 0.31	-8.25 ± 0.05	-6.97 ± 0.07	-8.40 ± 0.00	-6.08 ± 0.04	-9.50 ± 0.60	-8.20 ± 0.00	-7.30 ± 0.00	-7.90 ± 0.00
Quercetina	-8.06 ± 0.08	-8.80 ± 0.00	-7.78 ± 0.04	-8.70 ± 0.00	-6.10 ± 0.00	-7.36 ± 0.08	-8.00 ± 0.00	-7.93 ± 0.36	-7.82 ± 0.04
Compuestos de referencia									
Celastrol	-10.0 ± 0.00	-11.1 ± 0.00	-9.20 ± 0.00	-9.10 ± 0.00	-7.90 ± 0.00	-9.19 ± 0.03	-10.2 ± 0.12	-8.50 ± 0.00	-10.5 ± 0.05
Prednisolona	-8.99 ± 0.03	-9.18 ± 0.09	-7.47 ± 0.16	-9.47 ± 0.16	-6.82 ± 0.29	-9.38 ± 0.04	-8.75 ± 0.07	-7.85 ± 0.10	-8.70 ± 0.05