

**POTENCIAL ANTIVIRAL E INMUNOMODULADOR DE ANTIBIÓTICOS Y  
COMPONENTES DE ACEITES ESENCIALES SOBRE EL VIRUS DEL DENGUE**

**MARÍA CAMILA FLECHAS ALARCÓN**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BASICAS  
MAESTRIA EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS  
BUCARAMANGA**

**2015**

**POTENCIAL ANTIVIRAL E INMUNOMODULADOR DE ANTIBIÓTICOS Y  
COMPONENTES DE ACEITES ESENCIALES SOBRE EL VIRUS DEL DENGUE**

**MARÍA CAMILA FLECHAS ALARCÓN**

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

**Directora: Raquel E Ocazonez J. PhD**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BASICAS  
MAESTRIA EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS  
BUCARAMANGA**

**2015**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero expresar mi sincero agradecimiento a mi mentora, Dra. Raquel Ocazonez, por su comprensión, dedicación y paciencia durante los desafíos que este proyecto presenta. He crecido enormemente como persona y profesional durante los años de trabajo bajo su orientación.

Agradezco a todo el grupo CINTROP y en especial a Sindi, Sergio, Cesar, María Fernanda, Diana y demás miembros del laboratorio de Arbovirus que me han ayudado de diversas maneras durante esta travesía.

Un agradecimiento especial a mis padres y hermano que me han apoyado incondicionalmente en todos los proyectos que he emprendido.

Por último, pero no menos importantes: Diego, Ana María, Mariana, Verónica, Laura, Sandra, Magda y Stefanny que me han dado consejos invaluable, por su interminable apoyo y por ayudarme a mantener la perspectiva cuando los tiempos eran difíciles.

Este trabajo se realizó con la financiación del Patrimonio Autónomo Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas, Colciencias, Contrato RC 0572–2012.

*Las dificultades preparan a personas comunes para destinos extraordinarios*

*C. S. Lewis*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
2.1 GENERAL.....	20
2.2 ESPECÍFICOS .....	20
<b>3. MARCO TEORICO</b> .....	<b>21</b>
3.1 ESTRUCTURA DEL VIRUS DEL DENGUE (VDEN).....	21
3.2 CICLO REPLICATIVO DEL VIRUS .....	22
3.3. BASE INMUNOLÓGICA DE LA PATOGENESIS DEL DENGUE.....	24
3.4 ESTADO DEL ARTE EN EL DESCUBRIMIENTO DE ANTIVIRALES PARA EL DENGUE .....	26
3.5 ENSAYOS EN LA BÚSQUEDA DEL ANTIVIRAL .....	31
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	<b>35</b>
4.1 MATERIALES .....	35
4.2 PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO.....	38
4.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL.....	42
4.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO SOBRE CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS ..	44
4.5 ANÁLISIS DE DATOS .....	45
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
5.1 OPTIMIZACIÓN DE PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO.....	46
5.2 TOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS PARA CÉLULA HUMANA.....	50
5.3 ACTIVIDAD ANTIVIRAL.....	53
5.4 EFECTO DE COMPUESTOS ACTIVOS SOBRE CITOQUINAS .....	62
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>63</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>70</b>

**8. BIBLIOGRAFIA .....72**

## LISTA DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Aceites esenciales de plantas analizadas por el grupo CIBIMOL – UIS	19
<b>Tabla 2.</b> Terpenos seleccionados para el presente estudio	36
<b>Tabla 3.</b> Información sobre antibióticos seleccionados para el presente estudio	37
<b>Tabla 4.</b> Concentración tóxica cincuenta (CC <sub>50</sub> ) de terpenos para célula humana hepática y renal	51
<b>Tabla 5.</b> Toxicidad de antibióticos para célula humana	53
<b>Tabla 6.</b> Efecto inhibitorio de terpenos sobre la replicación del VDEN-2	55
<b>Tabla 7.</b> Potencial antiviral de terpenos	55
<b>Tabla 8.</b> Reducción de la replicación del VDEN-2 en presencia de antibiótico en el medio de cultivo.	56
<b>Tabla 9.</b> Reducción de la replicación del VDEN-2 por terpenos por tratamiento en tiempos distintos después de la adsorción.	58
<b>Tabla 10.</b> Efecto inhibitorio de los compuestos activos para VDEN-2 sobre la secreción de citoquinas pro-inflamatorias	62

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Estructura química de los terpenos usados en el estudio	36
<b>Figura 2.</b> Estructura química de los antibióticos usados en el estudio	37
<b>Figura 3.</b> Diseño experimental para el modo de acción antiviral.	43
<b>Figura 4.</b> Viabilidad de células humanas crecidas en placa de 96 pozos de acuerdo al número usado en la siembra.	47
<b>Figura 5.</b> Replicación del VDEN-2 en hepatocitos humanos de acuerdo a la multiplicidad de infección (MOI).	48
<b>Figura 6.</b> Reducción de la replicación de VDEN-2 por tratamiento con droga de referencia (ribavirina) de acuerdo al MOI.	48
<b>Figura 7.</b> Células de <i>Aedes albopictus</i> (C6/36) infectadas con sobrenadante del cultivo de hepatocitos humanos (HepG2) infectados con VDEN-2.	49
<b>Figura 8.</b> Detección de la citoquina RANTES en hepatocitos humanos infectados con VDEN-2 de acuerdo al tiempo y al MOI.	50
<b>Figura 9.</b> Curvas dosis-respuesta representativas de ensayos de MTT para evaluar citotoxicidad de terpenos sobre célula humana.	52
<b>Figura 10.</b> Curvas dosis-respuesta de ensayos de MTT para evaluar citotoxicidad de antibióticos sobre célula humana.	53
<b>Figura 11.</b> Actividad antiviral de terpenos dependiendo de la concentración.	56
<b>Figura 12.</b> Reducción de la replicación del VDEN-2 por rifampicina	57

<b>Figura 13.</b> Actividad inhibitoria de terpenos sobre el VDEN-2 en tiempos después de la adsorción	59
<b>Figura 14.</b> Recuperación de VDEN-2 de hepatocitos humanos (células HepG2) infectados y tratadas con BC002NO.	60
<b>Figura 15.</b> Recuperación de VDEN-2 de hepatocitos humanos (células HepG2) infectados y tratadas con ES0100L.	61

# TÍTULO: POTENCIAL ANTIVIRAL E INMUNOMODULADOR DE ANTIBIÓTICOS Y COMPONENTES DE ACEITES ESENCIALES SOBRE EL VIRUS DEL DENGUE<sup>1</sup>

AUTORES: FLECHAS ALARCÓN María C.; OCAZONEZ JIMÉNEZ, Raquel E<sup>2</sup>.

PALABRAS CLAVES: dengue, terpeno, antibiótico, antiviral, IL-8, RANTES

## RESUMEN

A pesar de una intensa investigación aún no se cuenta con un medicamento licenciado para curar el dengue, ni tampoco para aminorar la respuesta inflamatoria que lleva a enfermedad severa. Los terpenos presentes en el aceite esencial de plantas medicinales y los antibióticos licenciados podrían ser considerados. El objetivo fue identificar terpenos y antibióticos con efecto inhibitorio sobre la replicación del VDEN y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias. Se incluyeron 13 terpenos presentes en aceites esenciales con actividad antiviral previamente identificada y los antibióticos tetraciclina, doxicilina y rifampicina. La actividad antiviral se evaluó usando un ensayo *in vitro* con hepatocitos humanos (HepG2) y cuantificando el nivel extracelular de la proteína viral NS1 y citoquinas IL-8 y RANTES usando estuches comerciales de ELISA. La toxicidad de cada compuesto se evaluó en células HepG2 y célula renal embrionaria (HEK-293) mediante el ensayo del MTT. Los terpenos BC002NO, ES010OL, CI004AL y PC003NO mostraron actividad antiviral promisoria sobre el VDEN-2:  $CI_{50}$  de  $22.5 \pm 5.6$ ,  $23.2 \pm 4.0$ ,  $31.3 \pm 4.5$  y  $73.0 \pm 8.4$   $\mu$ M, e IS entre 7.0 y 71.0. La Rifampicina presentó actividad a una  $CI_{50}$  de  $49.7 \pm 8.9$   $\mu$ M con IS entre 3.2 y 4.3 dependiendo la célula. Los ensayos de adición en el tiempo sugieren que los compuestos activos podrían interrumpir etapas muy tempranas del ciclo de replicación viral. Los terpenos activos y la rifampicina redujeron entre un 23 a 89% el nivel de IL-8 y RANTES en hepatocitos infectados con VDEN-2. Estos compuestos podrían ser seleccionados para estudios posteriores enfocados al descubrimiento de un medicamento eficaz para el dengue.

---

<sup>1</sup> Trabajo de grado

<sup>2</sup> Facultad de Salud. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director Tesis RAQUEL E. OCAZONEZ PhD.

TITLE: ANTIVIRAL AND INMUNOMODULATORY POTENTIAL ANTIBIOTICS AND ESSENTIAL OIL COMPONENTS ON DENGUE VIRUS<sup>3</sup>

AUTHORS: FLECHAS ALARCÓN María C.; OCAZIONEZ JIMÉNEZ, Raquel E<sup>4</sup>.

KEYWORDS: dengue, terpene, antibiotic, antiviral, IL-8, RANTES

### SUMMARY

In spite of intensive research, it has not been found out a licensed medicine for dengue yet, or a way to lessen exacerbated inflammatory response that leads to severe disease. The terpenes that are present in essential oil of medicinal plants and licensees antibiotics could be taken into account. The objective was Identify the terpenes and antibiotics inhibitory effect on replication of DENV and the secretion of inflammatory cytokines. It were included 13 terpenes present in essential oils with antiviral activity previously identified and the antibiotics tetracycline, doxycycline and rifampicin. Antiviral activity was assessed by using an in vitro assay with human hepatocytes (HepG2) and quantifying the level of extracelular viral NS1 protein, IL-8 and RANTES cytokines using a comerciales ELISA kits. The toxicity of each compound was assessed in HepG2 cells and embryonic kidney cells (HEK-293) using MTT essay. BC002NO, ES010OL, CI004AL and PC003NO terpenes showed promising antiviral activity on dengue virus: IC<sub>50</sub> 22.5 ± 5.6, 23.2 ± 4.0, 31.3 ± 4.5 and 73.0 ± 8.4 µM, and SI between 7.0 – 71.0. Rifampicin activity presented an IC<sub>50</sub> 49.7 ± 8.9 µM with SI between 3.2 and 4.3 depending on the cell. The addition tests suggest that over time the active compounds may disrupt very early stages of the viral replication cycle. Active terpenes and rifampicin reduced between 23 to 89% the level of IL-8 and RANTES in infected hepatocytes DENV-2. These compounds could be selected for further studies focused on the Discovery of a medicament effective for dengue.

---

<sup>3</sup> Degree work

<sup>4</sup> Health Faculty. Master of Basic Biomedical Sciences. Director: RAQUEL E. OCAZIONEZ PhD.

## 1. INTRODUCCIÓN

El dengue se considera una enfermedad emergente que afecta países del sudeste de Asia, África, el Mediterráneo oriental y las Américas. Se estima que cada año ocurren 390 millones de infecciones en todo el mundo, de las cuales 96 millones manifiestan síntomas (Bhatt et al. 2013; Guzman et al. 2010). En las Américas, durante los años 90 se reportaron 2.7 millones de casos. Para el 2010 fueron más de 1.7 millones de casos, de estos 50.235 fueron casos severos con 1.185 muertes y una incidencia mayor a 200 casos por cada 100.000 habitantes (Brathwaite et al. 2012; WHO 2011; San Martin et al. 2010). El dengue genera altos costos en salud, para el continente Americano el gasto anual entre 2000 – 2007 se estimó en \$ 2.1 billones de dólares (Shepard et al. 2011). En Colombia la incidencia del dengue incrementó de 5.2 casos por cada 100.000 habitantes en la década de los 90, a 18.1 en los últimos siete años (INS 2012). El gasto en atención médica se calculó en \$16.9 millones de dólares en 2011, sin tener en cuenta los costos de las campañas para el control del vector (Castañeda-Orjuela et al. 2012).

El dengue es una enfermedad de amplio espectro clínico, desde un síndrome febril inespecífico hasta una enfermedad severa caracterizada por permeabilidad vascular, complicaciones hemorrágicas y deterioro de órganos (Yacoub et al. 2013; Whitehoma et al. 2011). Numerosos estudios demuestran que la evolución de la enfermedad depende en gran parte del balance entre la replicación del virus y la respuesta inmune que lleva a recuperación y/o contribuye al desarrollo de enfermedad severa (Rothman 2010; Guzmán et al. 2010; Medin et al. 2005). Así, existe acuerdo que una droga eficaz para el tratamiento de los enfermos es aquella que elimina el virus y/o aminora los efectos de la respuesta inmune que

contribuyen a la severidad (Halstead 2012; Srikiatkachom et al. 2012; Julander et al. 2011).

Hasta la fecha no existe un antiviral licenciado para el tratamiento del dengue, en consecuencia la opción terapéutica se orienta a tratar los síntomas y complicaciones, tornándose laborioso y de éxito limitado (WHO 2009). La búsqueda de un antiviral para el tratamiento del dengue lleva al menos cincuenta años. Hasta la fecha se han evaluado centenares de moléculas producidas por síntesis química, docenas han resultado con actividad antiviral *in vitro* y una pocas promisorias en ensayos con animales. (Revisado en: Lim et al. 2013, Srikiatkachom et al. 2012, Julander et al. 2011, Nobel et al. 2010, Canard 2010). Con antivirales licenciados como ribavirina, tiazofurin, carboxamida y derivados de la pirazolina, los resultados *in vivo* han sido desalentadores porque se requieren dosis que se consideran tóxicas para el humano.

El tratamiento con corticoides se ha propuesto como alternativa para aminoren el efecto dañino de la respuesta inmune inflamatoria en el paciente con dengue. Varios estudios han sido realizados con resultados contradictorios y aún existe controversia sobre la eficacia (Rajapakse et al. 2010; Panpanich et al. 2010). También se ha propuesto el tratamiento con INF $\alpha$  como en pacientes con hepatitis C, en consideración que en experimentos *in vitro* (Diamond et al. 2000) e *in vivo* (Ajariyakhajom et al. 2005) se ha demostrado inhibición de la replicación del virus. Otros mediadores de la respuesta inflamatoria se ha propuesto, pero existe aún incertidumbre sobre sus efectos positivos y negativos, lo segundo en consideración a que la modulación inmune podría tener efectos negativos sobre una adecuada y eficaz respuesta de defensa contra el virus (Espada-Murao & Morita 2011).

En consideración al fracaso hasta la fecha para la invención y descubrimiento de un medicamento para el dengue, una parte de la investigación está siendo orientada a evaluar la actividad antiviral de medicamentos licenciados para tratamiento de enfermedades distintas al dengue y uno de estos medicamentos son los antibióticos. El conocimiento sobre la actividad anti-dengue de los antibióticos es limitado (Rothan et al. 2013; De Burghgrave et al. 2012; Low et al. 2011; Kaptein et al. 2010; Zhang et al. 2009, Yang et al. 2007). Los resultados sugieren que pueden ligarse a proteínas del virus *in silico* y que reducen la replicación del virus *in vitro*.

Los productos de plantas se consideran fuente inagotable para buscar moléculas útiles para la invención y descubrimiento de un medicamento. Los resultados de investigaciones en el CINTROP demuestran que la replicación *in vitro* del Virus del Dengue (VDEN) y del Virus de la Fiebre Amarilla (VFA), se puede interrumpir cuando se expone previamente al aceite esencial de varias plantas medicinales (Gómez et al. 2013; Ocazonez et al. 2010; Meneses et al. 2009a; Meneses et al. 2009b). Estos aceites esenciales son extraídos y luego caracterizados químicamente por el Centro de Biomoléculas de la UIS. Los constituyentes mayoritarios del aceite esencial son terpenos (Tabla 1) y la mayoría de ellos se encuentran disponibles en el mercado.

Luego de una extensa revisión bibliográfica no se encontraron estudios sobre la actividad de terpenos sobre VDEN. En un proyecto de maestría anterior en el CINTROP, se evaluó la actividad antiviral de dos terpenos sobre el VFA comparada con el aceite esencial que fue activo (Gómez et al. 2013). Los resultados de este y los otros estudios, motivaron la realización del presente trabajo. Otros han reportado actividad inhibitoria sobre VDEN de extractos de plantas que también contienen terpenos (Bourjot et al. 2012; Allard et al. 2012).

En la búsqueda de una droga inmunomoduladora, los terpenos y antibióticos podrían igualmente ser una alternativa. Sobre los antibióticos ya es conocida su propiedad inmuno-moduladora y anti-inflamatoria (Buret et al. 2010; Tauber & Nau 2008), de hecho, existe un ensayo clínico de pacientes con dengue, en el cual los autores reportan síntomas menores y disminución de la estancia hospitalaria en individuos tratados comparado con los no tratados (Castro et al. 2011), pero el efecto del tratamiento sobre el nivel de la viremia no se evaluó.

En el contexto antes descrito, el propósito fundamental del presente estudio fue descubrir terpenos y antibióticos con actividad antiviral sobre el VDEN y efecto inhibitorio sobre la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-8 y RANTES). La ejecución y los resultados contribuyeron al desarrollo del proyecto *“Evaluación de actividades citotóxicas, alergénica, antimicrobiana, inmunomoduladora y antitumoral de aceites esenciales y extractos SFE de plantas tropicales Colombianas, ingredientes potenciales para la industria cosmética, farmacéutica y de aseo”*. Este proyecto es dirigido por la Dra. Raquel E. Ocazonez, orientadora del presente trabajo, y hace parte del Programa que sustenta la Unión Temporal Bio-Red Colciencias Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de especies vegetales aromáticas y medicinales tropicales (UT-Bio-Red-CO-CENIVAM). Uno de los aportes de este Programa es la generación de librerías de fuentes naturales y derivados sintéticos como fuentes de moléculas y compuestos de interés para las compañías farmacéuticas que investigan en drogas o remedios.

**Tabla 1.** Aceites esenciales de plantas analizadas por el grupo CIBIMOL – UIS

Terpeno	Planta	%
1,8-Cineol	<i>L. citriodora, C. Longo, Z. officinale</i>	6.4 – 5.0
3-octanol	<i>P. racemosa</i>	1.1
Acetato de geraniol	<i>L. citriodora</i>	1.3
$\alpha$ -Felandreno	<i>C. longo</i>	13.0
$\alpha$ -Terpinona	<i>P. auritumkunth</i>	0.5
$\alpha$ -Tujona	<i>A. vulgaris</i>	38.1
$\beta$ -Burboneno	<i>L. alba</i>	1.7
$\beta$ -Mirceno	<i>T. lucida</i>	1.6
$\beta$ -Pinona	<i>P. racemosa</i>	8.4
$\beta$ -Sesquifelandreno	<i>C. longo, Z. officinale</i>	7.3 – 3.8
Carvacrol	<i>L. organoides</i>	44.0
Carvona	<i>L. alba</i>	39.7
Chavicol	<i>P. racemosa</i>	15.5
Curlona	<i>C. longo</i>	10.7
Espatulenol	<i>L. citriodora</i>	4.7
Estragol	<i>P. auritumkunth</i>	95.7
Eugenol	<i>P. racemosa</i>	56.1
Geranial	<i>L. citriodora</i>	18.9
Geraniol	<i>L. citriodora, Z. Officinale</i>	3.5 - 2.7
$\gamma$ -Terpineno	<i>L. organoides, O. Vulgare</i>	10.0 – 5.2
Limoneno	<i>L. alba, L. Citriodora, P. racemosa</i>	30.6 – 3.5
Linalol	<i>P. racemosa</i>	4.9
Metileugenol	<i>P. auritumkunth</i>	0.8
Neral	<i>L. citriodora, Z. Afficinale</i>	15.6 – 10.3
Nerol	<i>L. citriodora</i>	2.0
p-Cimeno	<i>O. vulgare</i>	4.5
Piperitona	<i>L. alba</i>	2.8
Sabinona	<i>L. citriodora</i>	1.9
Safrol	<i>P. auritumkunth</i>	91.3
Timol	<i>L. organoides, O. Vulgare</i>	15.0 11.0
Trans- $\beta$ -cariofileno	<i>L. citriodora</i>	2.3
<i>trans</i> -Sabinona	<i>O. vulgare</i>	21.0

Tomado de: Ocazonez et al. 2010; Meneses et al. 2009

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 General**

Descubrir terpenos y antibióticos con actividad promisorio antiviral sobre el VDENV e inhibitoria de citoquinas pro-inflamatorias.

### **2.2 Específicos**

1. Determinar el potencial antiviral de terpenos y antibióticos sobre la replicación in vitro del VDENV-2.
2. Determinar el efecto sobre la secreción de IL-8 y RANTES por hepatocitos infectados con VDENV-2 debido a la presencia de terpeno y antibiótico.
3. Determinar el modo de acción antiviral de terpenos y antibióticos activos

### 3. MARCO TEORICO

#### 3.1 Estructura del virus del dengue (VDEN)

El VDEN es un miembro del género *Flavivirus* y existe como cuatro serotipos conocidos como VDEN-1, -2, -3 y -4. Posee envoltura lipoproteína derivada de la célula, capsida icosaédrica y el genoma es una hebra de ARN tipo mensajero. El ARN se traduce en una poliproteína la cual es fragmentada durante la síntesis en tres proteínas estructurales: cápsida (C), membrana (M) y envoltura (E); y siete proteínas no-estructurales (NS su sigla en inglés) con diversas funciones durante la morfogénesis viral (Guzmán, 2010; Noble et al., 2010).

De las proteínas estructurales, la E es considerada un blanco en investigación de antivirales debido a que interactúa con el receptor de la célula durante la adsorción y penetración del virus al interior del citoplasma. Esta proteína también es un potente antígeno que estimula la producción de anticuerpos neutralizantes, los cuales protegen de la re-infección con el virus. Las mutaciones en E afectan la biología del virus con respecto a tropismo celular, habilidad para establecer infección productiva y control de la infección por la respuesta inmune. La proteína M está también embebida en la envoltura y es crucial en el proceso de maduración de la partícula viral reorganizando la estructura de la superficie del virus (Revisado en: Alen et al. 2012; Noble et al. 2010; Sampath et al. 2009).

Con respecto a las proteínas NS, la NS1 es secretada por células infectadas y se ha considerado un marcador de replicación activa del virus (Muller et al. 2013; Watanabe et al. 2012; Ludert et al. 2008), e incluso un blanco antiviral (Amorin et al. 2014). NS2A promueve el ensamblaje y la replicación viral; NS2B es un

cofactor de NS3; NS4, y NS4B son proteínas asociadas a la membrana que se cree anclan y regulan el complejo de replicación durante el ciclo replicativo viral. La proteína NS3 presenta actividad NTPasa, helicasa y serina proteasa teniendo un rol importante en la síntesis de ARN. La proteína NS5 es la más conservada del género *Flavivirus*, posee actividad enzimática de metiltransferasa y guanidiltransferasa, por lo tanto, actúa como polimerasa durante la replicación y transcripción viral (Weaver et al. 2009; Natarajan et al. 2010). Las proteínas NS3 y NS5 son considerados blancos de acción antiviral (Noble et al. 2010).

### **3.2 Ciclo replicativo del virus**

En el humano el VDEN infecta células del sistema retículo endotelial (Noisakran et al. 2010), hepatocitos (Suksanpaisan et al. 2009) monocitos, macrófagos y leucocitos adherentes (Alen et al., 2012; Zompi et al., 2012). *In vitro*, el virus puede replicarse en una variedad de células humanas, de animales y artrópodos (revisado en: Marianneau et al., 1996; Aguilar et al., 2005). El cultivo de hepatocitos humanos ha sido usado como modelo para evaluar el efecto inhibitorio de la replicación viral de variados compuestos. La línea HepG2, obtenida de carcinoma hepático, es un sistema que sirve para evaluar la síntesis de citoquinas IL-6, IL-8, RANTES, TNF $\alpha$  e INF- $\beta$  activada por la infección viral (Fink et al. 2007; Medin et al. 2006; Medin et al. 2005; Lin et al. 2000). Como es conocido, el incremento de estas citoquinas contribuye a varias de las disfunciones orgánicas vistas en pacientes (Rothman et al. 2010; Green et al. 2006). Otras líneas celulares como LLC-MK-2, Vero o BHK-21 son usadas en experimentación (Thomas et al. 2009) y el clon C6/36 de *Aedes aegypti* (Igarashi et al. 1978) es el más usado para aislamiento primario y producción de stock de virus (Mosso et al. 2008).

El ciclo replicativo del VDEN sigue varias etapas. La entrada se inicia con la adsorción mediante la interacción con el receptor celular como DC-SIGN, L-SIGN, Heparan sulfato, receptor de manosa, receptor de alta afinidad a laminina o GRP78, entre otros (Canard 2010), a través de la proteína E y la penetración ocurre por endocitosis dentro de vesículas. En el endosoma el pH bajo induce la formación de trímeros de la proteína E y este cambio conformacional de la proteína resulta en fusión de la envoltura viral con la membrana endosomal. La fusión forma un poro por el cual la cápside es liberada al citoplasma (Stevens, et al. 2009). La replicación del ARN inicia con la síntesis de una cadena negativa complementaria resultando una molécula de doble cadena (forma replicativa -RF) y a partir de la cadena negativa se sintetizan cadenas nacientes (RI) hasta completar nuevas moléculas de ARN cadena sencilla y polaridad positiva. (Uchil, et al. 2003). Varias proteínas celulares y del virus participan en la replicación, NS5, NS3 y NS2A se ensamblan con proteínas celulares formando el complejo replicativo (Clyde et al. 2006).

El evento más temprano en la formación de nuevos viriones es la formación de la nucleocápside, la cual está conformada de una copia de ARN y abundantes copias de proteína C que se ensamblan en el citoplasma asociadas a la membrana del retículo endoplásmico. En el lumen del retículo, las proteínas prM y E forman un heterodímero que sigue la vía secretora celular hasta el aparato de Golgi. En las cisternas trans la proteína prM es fragmentada a M antes de la salida del virión liberándose el péptido, por lo cual deja expuesto el dominio de fusión y esto convierte la partícula en un virus maduro capaz de infectar una nueva célula (Zhang et al. 2003). Los nuevos viriones son transportados a la membrana celular por el sistema de vesículas y son liberados al medio extracelular por fusión con la membrana citoplasmática. Algunos viriones pueden abandonar la célula a través de rupturas en la membrana celular (Clyde et al. 2006).

### **3.3. Base inmunológica de la patogénesis del dengue**

La mayoría de los infectados con el VDEN no desarrollan síntomas o son leves y logran eliminar el virus de los tejidos. En algunos, con mayor frecuencia quienes sufren infección secundaria, se presenta incremento de la permeabilidad vascular, hemorragias y daño hepático, contribuyendo al choque hipovolémico característico del dengue severo (Rothman 2011; Bozza et al. 2008) Numerosos estudios demuestran que la evolución de la enfermedad versus la gravedad del dengue depende del perfil de activación del sistema inmune. Mecanismos de respuesta innata y adquirida del hospedero están involucrados en la protección y severidad (Suttitheptomrong et al. 2013; Sun et al. 2013; Rathakishnan et al. 2012; Rothman 2011)

En la fase temprana de la infección hay incremento del nivel sérico de interferones tipo 1 (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) como respuesta de defensa de células dendríticas y macrófagos y también activación de células naturales-asesinas (NK) que eliminan células infectadas. Esta respuesta de la inmunidad innata es la primera línea de defensa para eliminar el virus durante la infección primaria y la re-infección. Simultáneamente, linfocitos CD4+ y macrófagos son estimulados llevando a incremento en el nivel de varias citoquinas entre estas IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-10. Esta activación inmune resulta en activación de linfocitos CD8+ que destruyen células infectadas y de linfocitos B que se convierten en células secretoras de anticuerpos contra el virus. Todos estos eventos características de respuesta Th1 contribuyen a la recuperación de la salud en el infectado (Rothman et al. 2009; Green et al 2006).

Existe acuerdo en que respuesta inmune Th2 contribuye a las diversas alteraciones orgánicas en casos severos de dengue. Incremento notorio del nivel sanguíneo y en tejido de varias citoquinas como IP-10, ITAC, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8,

IL-10, IL-12, IL-13, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MIF, RANTES, histamina, VEGF, y proteínas del complemento C3, C3a y C5a, es un cuadro constante en casos severos y raro en leves (Sukathida & Halstead 2010; Guzmán et al. 2010).

Quimioquinas como RANTES e IL-8 son producidas por varios tipos de células, incluido monocitos/macrófagos, células T, neutrófilos, fibroblastos, células endoteliales hepatocitos, queratinocitos, entre otras. Actúan como quimio atrayente para neutrófilos y LT CD4+ y CD8+ y contribuyen al choque hipovolémico incrementando la permeabilidad vascular (Sukathida & Halstead 2010; Rothman et al. 2009; Medin et al. 2005; Lei et al. 2001). Se ha demostrado que la IL-8 directamente incrementa la permeabilidad de células del endotelio cultivadas *in vitro* (Talavera et al. 2004; Hess et al. 2004). Aún más, se ha encontrado que IL-8 puede aminorar la respuesta innata de defensa inhibiendo el efecto antiviral del INF y en consecuencia favoreciendo la diseminación del virus (Khabar et al. 1997). Por su papel en la patogénesis del dengue estas quimioquinas se han considerado un blanco terapéutico.

Dado que el VDEN se replica en hepatocitos y células de Kupffer causando daño del órgano, se ha visto que los niveles de aspartato transaminasa y alanina transaminasa (AST/ALT) se encuentran más elevados en casos con dengue severo comparados con los leves. Se ha reportado insuficiencia hepática fulminante debido a la hepatitis o necrosis focal (Malavige et al. 2012; Fink et al. 2007; Medin et al. 2005).

### 3.4 Estado del arte en el descubrimiento de antivirales para el dengue

#### 3.4.1 Compuestos sintéticos

En años recientes el descubrimiento de antivirales para el dengue se ha direccionado básicamente a inhibidores sintéticos de proteínas virales: *i.* De las proteasas NS2B/NS3, los cuales han resultado con diverso grado de éxito siendo la mayor limitación el gasto y tiempo que requiere el diseño de la molécula. *ii.* De la helicasa, siendo la principal limitante la baja actividad de la enzima que hace técnicamente difícil detectar la actividad antiviral. *iii.* De la polimerasa NS5, como análogos de nucleótidos o pro-fármacos transformados en el interior de la célula por una enzima celular, teniendo como principal limitante la toxicidad mitocondrial como efecto secundario de exposiciones duraderas. *iv.* Inhibidores de la metiltransferasa, fármacos que buscan generar un cambio o mutación estructural a esta enzima de forma que no sea reconocida. *v.* Inhibidores de entrada, se ha demostrado que al dominio III y otros sitios de la proteína E se pueden ligar diversas moléculas bloqueando la interacción con receptores celulares y en consecuencia la adsorción y penetración del virus al citoplasma. La limitante mayor de los inhibidores de entrada es la baja absorción gastrointestinal requiriendo aplicación intravenosa (Revisado en: Noble et al. 2010; De Clercq et al. 2010).

Otra estrategia en la búsqueda del antiviral es la invención de inhibidores de enzimas celulares que participan en vías metabólicas indispensables para el virus. Entre estos blancos celulares están: *i.* proteasas que el virus usa para el procesamiento de la poli-proteína. *ii.* 6-glucosidasa que participa en el plegamiento y glucosilación de las proteínas virales prM, E y NS1. *iii.* quinasas que participan en el ensamble y secreción de las partículas virales. Recientemente se han propuesto inhibidores de enzimas de la vía del colesterol debido a que se ha encontrado que los complejos de replicación se asocian con los lípidos de membranas intracelulares de una variedad de organelas como el retículo

endoplasmático y aparato de Golgi (Revisado en: Julander et al. 2011; Noble et al. 2010; Sayce et al. 2010).

### 3.4.2 Componentes de aceites esenciales – Terpenos

Se ha demostrado que los aceites esenciales y sus metabolitos aislados pueden interactuar con componentes de la célula humana y de virus patógenos, de esta manera pueden interrumpir el ciclo viral y simultáneamente modular la respuesta inmune interrumpiendo las vías celulares que promueven la inflamación y activando las que conducen al patrón de respuesta Th1. Es por esta razón que los productos naturales se consideran fuente de compuestos para la invención y el descubrimiento de drogas (Revisado en: Teixeira et al. 2014; Si-Yuan et al. 2013; Abd-Kadir et al. 2013; Canard 2010; Cravotto et al. 2010; Bakkali et al. 2008)

El potencial antiviral de terpenos presentes en el aceite esencial ha sido poco investigado y el conocimiento hasta la fecha publicado está referido a resultados de ensayos *in vitro* con el virus herpes simplex (VHS). Actividad antiviral se encontró con fenilpropanoides y sesquiterpenos (trans-anethol,  $\beta$ -cariofileno, eugenol,  $\beta$ -eudesmol, óxido de  $\beta$ -cariofileno y Farnesol) obtenidos del anís estrellado. Los compuestos redujeron la formación de placas de infección del VHS entre 40 – 98%, siendo mayor con el  $\beta$ -cariofileno a  $CI_{50}$  de 0.25  $\mu\text{g/mL}$  e IS de 140. De la misma manera, los monoterpenos  $\alpha$ -Terpineno,  $\gamma$ -Terpineno,  $\alpha$ -Pineno, p-Cimeno, Terpinen-4-ol,  $\alpha$ -Terpineol, Timol, Citral y 1,8-Cineol, componentes mayoritarios del aceite esencial de eucalipto, árbol del té y timo, redujeron la infectividad viral en 80%. El rango de  $CI_{50}$  resultó desde 3.5  $\mu\text{g/mL}$  para Citral, hasta 1200  $\mu\text{g/mL}$  para 1,8-cineol, e IS entre 1.7 para 1,8-cineol y 18.2 para  $\alpha$ -Terpineol. El modo en el que actúan los terpenos estudiados parece ser interfiriendo en la entrada de la célula debido a inactivación directa del virus (Astani et al. 2011; Astani et al. 2009). Terpenoides aislados de *Trigonostemon*

*cherrieri* fueron evaluados sobre la proteína viral NS5 de VDEN. Tres de estos terpenoides presentaron una  $CI_{50}$  entre 3.1 – 16.0  $\mu$ M (Revisado en: Teixeira et al. 2014; Allard et al. 2012)

El grupo de investigación que soportará el presente trabajo ha estudiado el efecto inhibitorio in vitro de terpenos sobre el VFA. El Citral, componente mayoritario del aceite esencial de *Lippia citriodora* y *Lippia alba* inhibió 50% la replicación viral cuando se usó entre 17.0 – 25.0  $\mu$ g/mL en tratamientos antes y después de la adsorción respectivamente. En tanto que el limoneno, otro componente, no fue tóxico a altas concentraciones pero no presentó actividad antiviral (Gómez et al. 2013).

#### 3.4.3 Drogas licenciadas

Ante el poco éxito en el descubrimiento del antiviral para el dengue, la investigación con medicamentos licenciados se viene considerando como alternativa prometedora. Esto teniendo en cuenta que menos estudios son requeridos comparados cuando se trabaja con un compuesto recién descubierto y se puede obtener varios derivados del fármaco con probabilidad de encontrar el medicamento en menor tiempo.

Inmuno-moduladores: en el contexto de la patogénesis del dengue descrito antes, el tratamiento de pacientes con inmuno-moduladores como los corticoides se ha propuesto como estrategia para el manejo clínico. Varios estudios han sido realizados con resultados contradictorios. Al revisar en detalle estos estudios se concluyó que el tratamiento con dexametasona y metilprednisolona no producen efectos benéficos en todos los casos. No obstante, existe acuerdo en que son necesarios ensayos clínicos más precisos y bien controlados para determinar

precisamente la utilidad de los corticoides (Premaratna et al. 2011; Rajapakse et al. 2010; Kularatne 2009).

En consideración al éxito del tratamiento con INF- $\alpha$  en la hepatitis B y C se ha sugerido que el mismo resultado podría obtenerse con dengue. En experimentos *in vitro* se ha demostrado inhibición de la replicación del VDEN en presencia de INF- $\alpha$  en células humanas como mononucleares de sangre periférica (Ajariyakhajorn et al. 2005), fibroblastos humanos (HFF), hepatocitos (HepG2), mielo monocitos (U937) y monocitos de leucemia (THP-1) (Diamond et al. 2000). En monos *Rhesus* infectados con VDEN y luego tratados con el INF se observó disminución de la viremia pero no eliminación completa del virus (Ajariyakhajorn et al. 2005). El uso del INF podría superar otros inmuno-moduladores por su seguridad y tolerabilidad clínica especialmente en pediatría. Además podría requerir de una única dosis siempre y cuando se administre en las primeras 72 horas para garantizar la eficacia (Espada-Murao & Morita 2011).

Otro blanco terapéutico son las citoquinas y mediadores de citoquinas. En ratones infectados, el tratamiento con anticuerpos contra el factor inhibidor de la migración de macrófagos o contra la molécula CLEC5a redujo los niveles de estas citoquinas y mejoró el estado del animal. Otros mediadores de la respuesta inmune han sido razonados, pero es difícil predecir resultados promisorios en consideración a que la alteración de una citoquina podría tener efectos negativos sobre una adecuada y eficaz respuesta de defensa contra el virus (Espada-Murao & Morita 2011).

Antibióticos: estudios revelaron que el tratamiento con tetraciclinas, cefalosporinas, rifampicina y clindamicina puede disminuir el nivel de citoquinas pro-inflamatorias (Buret 2010; Tauber & Nau, 2008). Por esta actividad los antibióticos se han considerado candidatos promisorios para el tratamiento del

dengue. Esto porque como es conocido, la magnitud de la viremia y el tipo de respuesta inmune son determinantes del resultado de la infección (Rothman et al. 2010). La investigación del potencial de los antibióticos para el tratamiento del dengue es reciente y luego de revisar varias bases de datos se encontraron algunos trabajos usando análisis *in silico*, ensayos *in vitro* y un estudio clínico.

Zhang et al. (2009) reporta actividad del geneticin sobre el VDEN ( $CI_{50}$  de  $2 \pm 0.1$   $\mu\text{g/ml}$  e IS de 66), el cual puede interferir con la síntesis de proteínas y replicación del genoma viral. Yang et al. (2009) y Rothan et al. (2013) encontraron que derivados de la tetraciclina (rolitetraciclina y doxiciclina) inhibieron la replicación del VDEN a  $CI_{50}$  entre 55 - 67  $\mu\text{M}$  y los resultados *in silico* mostraron una interacción hidrofóbica con residuos de la proteína E interrumpiendo la reorganización conformacional del virus que lleva a bloqueo de la penetración del virus al interior de la célula. Kaptein et al. (2010) encontraron potencial antiviral de doxorubicina ( $CI_{50}$  de 0,34  $\mu\text{g/ml}$ ). De Burghgraeve, et al. (2012) estudio la actividad sobre varios *Flavivirus* de un análogo de teicoplanina aglicolada (LCTA-949) encontrando una  $CI_{50}$  de 6.9  $\mu\text{M}$  para VDEN. Por su parte Low et al. 2011 reportaron la actividad de Narasin a una  $CI_{50}$  de 1  $\mu\text{M}$ , y el mecanismo de acción se asoció con la interrupción de la síntesis de proteínas virales.

Los antibióticos son frecuentemente usados en la práctica médica para el tratamiento de síndromes febriles, que en algunos casos puede ser dengue que no se confirma por laboratorio. Castro et al. (2011) realizaron un estudio con pacientes hospitalizados en quienes el dengue se confirmó. A un grupo se le dio tratamiento con tetraciclina y doxiciclina y a otro no. Los autores reportan síntomas menores y disminución de la estancia hospitalaria en tratados comparado con los otros. Al analizar el nivel sérico de las citoquinas encontraron que IL-6, IL-1 $\beta$  y

TNF- $\alpha$  fue menor en los tratados. El efecto del tratamiento sobre el nivel de la viremia no se evaluó.

### **3.5 Ensayos en la búsqueda del antiviral**

#### **3.5.1 Ensayos basados en células (In vitro)**

A pesar de los grandes avances en tecnología, los ensayos usando sistemas celulares continúan siendo los más utilizados en los laboratorios dedicados a la búsqueda de antivirales. En todos los casos, se debe evaluar primero la toxicidad del compuesto para la célula blanco de la infección. La magnitud de la citotoxicidad es un criterio indispensable para determinar el índice de selectividad. (Cos et al. 2006).

Existe una amplia variedad de métodos que usan sistemas celulares que en general siguen los mismos parámetros:

*Método de reducción de placa* – el virus se incuba unas horas con compuesto y la mezcla se adiciona al cultivo celular; o, el virus es primero adsorbido a la célula y la replicación se lleva a cabo en presencia del compuesto. En ambos casos, las células se mantienen en medio de cultivo viscoso que delimita la dispersión del virus resultando focos o placas. Las placas se pueden visualizar por coloración o por inmuno-histoquímica y la actividad antiviral se evidencia cuando se confirma reducción en al menos 50% en relación con el control. Estos procedimientos son recomendados para evaluar la habilidad del compuesto para inactivar directamente el virus o inhibir la diseminación célula-célula. La limitante es que el procedimiento es laborioso, el resultado demora varios días, y está sujeto a variaciones notorias debido a pérdida de la estabilidad del virus (Meneses et al. 2009a; Cos et al. 2006).

*Reducción de la progenie viral*- el virus se trata como se describió en la reducción de placa pero el medio de cultivo es líquido impidiendo la formación de placa. El efecto antiviral se evidencia por reducción  $\geq 50\%$  del título viral o el nivel de una proteína viral secretada, ambos en una muestra del sobrenadante del cultivo. El ensayo es una herramienta para la cuantificación rápida y fiable de la replicación del virus en células cultivadas (Ludert et al. 2008).

*Inhibición del efecto citopático (ECP)* - la replicación del virus se lleva a cabo en presencia del compuesto en el sobrenadante del cultivo, y el efecto inhibitorio se evidencia por ausencia o disminución  $\geq 50\%$  de alteración morfológica de la monocapa celular o ECP al ser revelada con un colorante viral como cristal violeta. El ensayo evalúa el efecto sobre la adsorción, penetración o replicación intracelular (Crance et al. 2003) es el procedimiento más recomendado para la fase de tamizaje primario cuando no se dispone de ensayos de alto rendimiento (Morrey et al. 2002). Un compuesto considerado activo por este método, deberá ser evaluado por un método más sensible y específico.

Existen diversos procedimientos de mayor rendimiento para tamizaje de grandes bibliotecas de compuestos. Entre estos está el ensayo de inhibición del efecto citopático adaptado para tamizaje de alto rendimiento, se usan platos de 96 pozos donde se crecen células infectadas con el virus realizando distintos tipos de tratamiento con el compuesto. A las 24 h la actividad se evalúa usando ensayos que miden muerte celular y se expresa como el porcentaje de viabilidad de las monocapas con virus-tratado con respecto a las infectadas con virus no-tratado. Lo recomendado para medir la viabilidad celular es usar estuches comerciales que miden la intensidad de una reacción bioquímica usando un indicador. Por ejemplo, las unidades de luminiscencia generadas por una luciferasa termo-estable las cuales son proporcionales a la cantidad de ATP presente en las células viables.

Debido a que este tipo de ensayo no es una medición directa de la replicación viral, es necesario que los compuestos que resulten activos sean analizados por el método de reducción de placa. De otra parte, esta metodología usando estuches comerciales resulta costosa para laboratorios con escasos recursos.

Otro tipo de ensayo de alto rendimiento es el ELISA celular *in situ*, el cual es efectivo para medir directamente la replicación viral, se basa en la inmunodetección cuantitativa de la proteína E del virus en células infectadas. Una desventaja es que requiere de varias etapas, lo que limita su adaptación a un formato de alto rendimiento y se requiere de anticuerpos específicos que no son de fácil acceso en el comercio. No obstante, tiene ventajas sobre el ensayo de reducción de placa, esto es: menos laborioso y el tiempo es menor (3 días vs 6-7 días). Además, la recolección de datos se realiza en un lector de placas, evitando el conteo manual subjetivo que se hace en placa.

Existen varios ensayos de tamizaje a nivel molecular pero presentan varias desventajas para adaptarlos a laboratorios de escasos recursos debido a que se requiere equipo sofisticado, producir clones moleculares de componentes del virus y/o anticuerpos monoclonales.

### 3.5.2 Ensayos In vivo

Uno de los mayores obstáculos en el descubrimiento de un antiviral para el dengue es la carencia de un buen modelo animal. En 2005 se reportó la cepa murina NOD/SCID trasplantada con células madres hematopoyéticas de cordón umbilical humano. La infección produjo en el ratón un cuadro similar a dengue leve con trombocitopenia aunque sin anticuerpos detectables, por lo cual se consideró un modelo apto para evaluar antivirales (Bente et al. 2006). Desde entonces otras

cepas de ratón humanizado han sido reportadas (Kuruville et al. 2007; Pearson et al. 2008). En 2009 se reportó la cepa NOD-scid IL2rynull con mayor grado de desarrollo del sistema inmune humano y la infección con cepas de diferentes genotipos del VDEN-2 permitió concluir que el modelo es apropiado para evaluar patogénesis en términos de virulencia de la cepa (Mota et al. 2009). El mono es otro modelo animal para evaluar la eficacia de una droga, porque se induce niveles detectables de viremia y simultáneamente se puede evaluar la toxicidad (Revisado en: Zompi et al. 2012).

El uso de modelos animales en investigación de antivirales está actualmente restringido a ciertos laboratorios, así que para la gran mayoría de grupos de investigación es una alternativa de bajo alcance. La evaluación en modelo animal deberá continuar en ensayos clínicos con pacientes, los cuales se llevan a cabo en varias fases: *i.* Con pocos individuos para determinar seguridad y efecto antiviral; *ii.* Con número mayor de participantes para confirmar seguridad y evaluar dosis en relación a la edad; *iii.* Grupos de individuos que reciben o no tratamiento con el compuesto (estudios controlados) para determinar la eficacia; y *iv.* Estudio en poblaciones para confirmar eficacia e identificar efectos secundarios (Linde et al. 2001).

El estudio realizado se enmarcó dentro de la fase exploratoria del proceso de descubrimiento, desarrollo y aprobación de un medicamento; el objetivo del estudio fue generar una librería de potenciales compuestos con actividad anti-dengue que puedan posteriormente ingresar a estudios de toxicología animal y evaluación de actividad antiviral e inmuno-modulación en cultivos primarios o modelos murinos.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Materiales

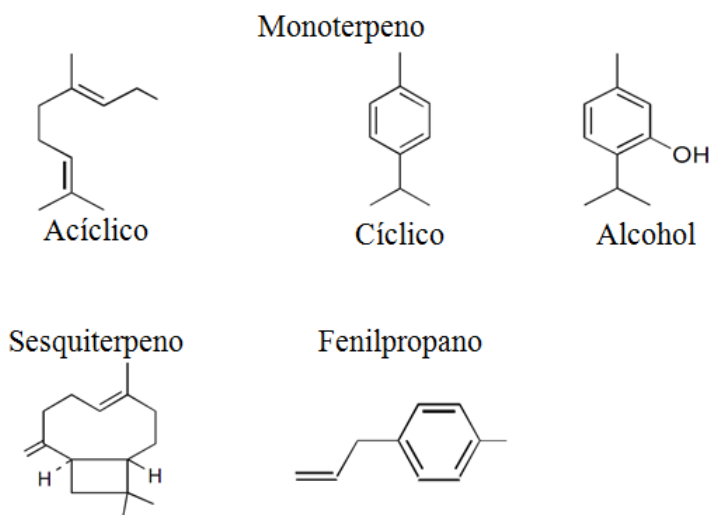
#### Terpenos

Se analizaron 13 terpenos con estructuras químicas como las presentadas en la Figura 1. El nombre químico de cada uno se omite en el presente documento debido a compromisos de confidencialidad con el programa UT-Bio-Red-CO-CENIVAM. En consecuencia, se asumió un código de identificación para cada uno (Tabla 1). Los terpenos se seleccionaron con base en información previa con respecto a: el aceite esencial que lo contiene inhibió la replicación *in vitro* del VDEN (Ocazonez et al. 2010; Meneses et al. 2009a; Meneses et al. 2009b); el terpeno tuvo efecto inhibitorio sobre la replicación *in vitro* del VFA (Gómez et al. 2013; y el terpeno podría inactivar proteína del VDEN según resultados de análisis *in silico* (Pajaro-Castro et al. 2014). Los terpenos se adquirieron comercialmente (SIGMA – ALDRICH Co.). De cada uno se hizo una solución madre en dimetil sulfóxido (máxima concentración en uso 1%), suficiente para el total de experimentos, que se distribuyó en alícuotas las cuales permanecieron almacenadas a -20°C.

#### Antibióticos

Se incluyeron la rifampicina, tetraciclina y doxiciclina, los cuales se seleccionaron con base en información previa que sugiere actividad anti-dengue o inmunomoduladora (Tabla 2, Figura 2). Esto es: el tratamiento de pacientes resultó en mejoría asociada a disminución del nivel sérico de citoquinas pro-inflamatorias y el antibiótico podría inactivar proteína del VDEN (análisis *in silico*) o inhibir la replicación *in vitro* del VDEN. Los antibióticos se adquirieron

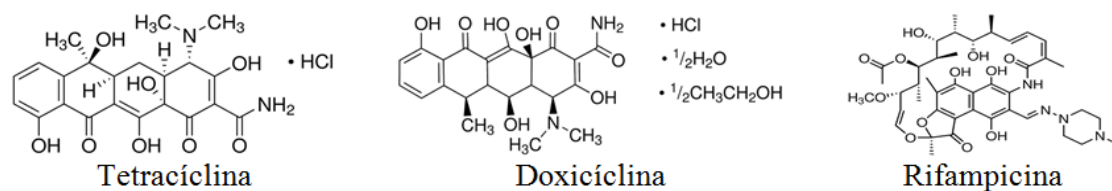
comercialmente (SIGMA – ALDRICH Co.). De cada uno se hizo una solución madre en agua o DMSO, suficiente para el total de experimentos, que se distribuyó en alícuotas almacenadas a -20°C.



**Figura 1. Estructura química de los terpenos usados en el estudio.**

**Tabla 2.** Terpenos seleccionados para el presente estudio

Naturaleza química	Terpeno
Monoterpeno	AT017OL, CI004AL, NE015OL, AG018OL, AN011LO, AF013NO, DC019NA, OL012NO, PC003NO, RC014NA, SC016NA
Sesquiterpeno	BC002NO
Fenilpropano	ES010OL



**Figura 2. Estructura química de los antibióticos usados en el estudio**

**Tabla 3.** Información sobre antibióticos seleccionados para el presente estudio

Nombre comercial	Uso medico	Referencia
Tetraciclina	Tratamiento para infecciones respiratorias, acné, infecciones de piel	J.E. Castro et al. (2011) J.M. Yang et al. (2007) R. Balajee et al. (2010) H.A. Rothan et al. (2013)
Doxiciclina	Tratamiento para neumonía, acné, sífilis	R. James et al. (2012) J.E. Castro et al. (2011) J.M. Yang et al. 2007 J.S. Low et al. (2011)
Rifampicina	Tratamiento para la tuberculosis	Y. Yuhás et al. (2011) S.C. Tauber & R. Nau (2008)

### Células

*Hepatocitos humanos* (línea HepG2) - fue crecida y mantenida en cajas de 25 cm<sup>2</sup> en medio D-MEM-F12 (DMEM/F-12 1:1 GIBCO) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SFB, GIBCO) y 1% de antibiótico (penicilina/streptomina, GIBCO) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

*Renal de embrión humano* (línea HEK-293) – fue crecida y mantenida en cajas de 25 cm<sup>2</sup> en las mismas condiciones que las células HepG2.

*Aedes albopictus* (C6/36 HT) - fue criada y cultivada en medio de Liebovitz (L-15, GIBCO) suplementado con 6% de SFB, 10% triptosa (SIGMA) y 1% de antibiótico a 28°C.

## Virus

Se usó el VDEN-2 genotipo Asia/Americano, el cual fue obtenido de la Colección del Laboratorio de Arbovirus del CINTROP. El virus se replicó en células C6/36 para preparar el stock como sigue: monocapas celulares crecidas en cajas de 25 cm<sup>2</sup>, se infectaron con una preparación del virus y se incubaron por 4 días a 32°C con medio L-15 al 2% de SFB. Al término, el sobrenadante se recolectó y alícuoto para almacenar a -70°C hasta ser usado. El título viral del stock se determinó por el método de dilución de punto final propuesto por Reed & Muench (Lidenbach 2009; Reed & Muench 1938) usando hepatocitos y/o células. Brevemente, VDEN-2 se adsorbió a monocapas de células HepG2 (crecidas en placa de 96 pozos) 1 h a 37°C, las células fueron lavadas con PBS para remover el virus no-adsorbido y luego incubadas en medio con 2% de SFB. Por cada dilución del virus se realizaron ocho replicas. A las 72 h post-infección las células se analizaron por inmunofluorescencia como se describe adelante. El título viral se expresó en CCID<sub>50</sub>/μL o dosis infecciosa 50 para cultivo de células (Cell Culture Infectious Dose 50) por cada μL del stock viral.

## 4.2 Procedimientos de laboratorio

### Ensayo de MTT

Fue el método establecido para determinar la viabilidad de monocapas celulares. Se siguió el protocolo del laboratorio ya descrito (Gómez et al 2013) con modificaciones. Brevemente, células HepG2 o HEK-293 fueron sembradas en placas de 96 pozos por 24 h a 37°C, luego el medio de crecimiento (SBF 10%) fue

remplazado por medio de mantenimiento (SBF 2%) y las células se incubaron de nuevo a 37°C por 72 h. Al término, el medio fue removido y una solución de MTT (20 µL, 5 mg/mL. Sigma Co.) fue añadida a cada pozo durante 4 h a 37°C. El sobrenadante de cada pozo se retiró y 100 µL de DMSO fue añadido para solubilizar los cristales. El grado de reducción de MTT a formazán se cuantificó midiendo la densidad óptica a 580 nm (DO<sub>580</sub>) en un espectrofotómetro Multiskan Go (Thermo Scientific). La intensidad del color se consideró proporcional a la viabilidad del cultivo. Valores de DO entre 0.9 y 1.3 se consideraron como viabilidad celular. Teniendo en cuenta que para los ensayos es indispensable una monocapa celular viable hasta por 4 días, se hicieron ensayos variando el número de células desde 1250 hasta 40,000 por pozo, esto con el propósito de determinar la densidad celular óptima para los ensayos de actividad antiviral y efecto inhibitorio sobre citoquinas pro-inflamatorias. Las placas se observaron diariamente, registrando el color de medio (amarillo se interpretó como acidez) y el porcentaje de confluencia de la monocapa.

#### ELISA – NS1

Para este estudio, la presencia de la proteína viral NS1 en el sobrenadante de cultivos infectados se consideró el indicador de replicación viral. Para detectar la proteína se usó el estuche comercial E-DEN02P (PanBio - Alere™) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ensayo consistió en: 100 µL de sobrenadante (dilución 1:2) fueron adicionados a pozos sensibilizados con anticuerpo policlonal anti-NS1 y la placa fue incubada 1 h a 37°C. Después de 6 lavados se agregaron 100 µL de conjugado anti-NS1 Mab HRP, se incubó nuevamente 1 h a 37°C y se realizó nuevamente 6 lavados. Los complejos inmunes se detectaron por desarrollo de color adicionando 100 µL de TMB por 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. La reacción se detuvo con ácido fosfórico (solución de parada) y la intensidad de color se midió en un espectrofotómetro Multiskan Go (Thermo Scientific) a longitud de onda de 450 nm. La concentración de la proteína

se calculó siguiendo las instrucciones del fabricante y se expresó como Unidades PanBio (UP). El valor de 11.0 UP (0.55 DO) de NS1 es el límite mínimo de detección del estuche.

#### Inmunofluorescencia

La técnica fue utilizada para detectar la presencia de virus en células infectadas. Se siguió el protocolo previamente descrito (Cortes et al. 2007). Brevemente, células obtenidas de los ensayos se fijaron en láminas para inmunofluorescencia con acetona fría. Los pozos se cubrieron con una dilución 1:64 de anticuerpo contra el VDEN y se incubaron por 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Al término se lavaron las láminas con PBS por 10 minutos y luego fueron expuestas a una dilución 1:400 – 1:800 de anti-IgG de ratón marcado con fluorocromo por 30 min a 37°C en cámara húmeda. El anticuerpo no ligado fue retirado por varios lavados con PBS, las láminas se secaron a temperatura ambiente y luego fueron cubiertas con glicerina tamponada para observación al microscopio de fluorescencia. Células infectadas fueron aquellas que se observaron de color verde fluorescente y las que no, captaron el colorante de contraste (rojo).

#### Replicación de VDEN-2 en hepatocitos

El propósito de este procedimiento fue establecer la proporción virus – célula (MOI: multicplity of infección) apropiada para realizar los ensayos antivirales. Esto es, la concentración del stock viral que causara infección reflejada en ~44.0 UP de NS1 y que equivale a ~4 veces el límite de detección del estuche comercial (11.0 UP). Células HepG2 en placa de 96 pozos se infectaron a MOI de 1.0, 3.0, 6.0, 11.0 y 23.0. Después de 1 h a 37°C se retiró el sobrenadante, las células fueron lavadas con PBS para remover el virus no-adsorbido y luego incubadas en medio

de mantenimiento (SBF 2%) durante 72 h. Al término, el sobrenadante se colectó para determinar la concentración de NS1.

Una vez establecido el MOI se realizaron infecciones variando el tiempo de incubación para replicación del virus. Brevemente, VDEN-2 (MOI apropiado) se adsorbió a células HepG2 crecidas en placa de 96 pozos, después de 1 h a 37°C se retiró el sobrenadante, las células fueron lavadas con PBS para remover el virus no-adsorbido y luego incubadas en medio de mantenimiento. El sobrenadante se colectó inmediatamente después de la adsorción del virus (tiempo 0 h), 4, 8, 12 y 24 h más tarde. Cada sobrenadante se usó para infectar monocapas de células C6/36 y la recuperación de virus se confirmó al 5º día post-infección analizando las células por inmunofluorescencia.

#### ELISA – Citoquinas

La presencia de RANTES e IL-8 en el sobrenadante de hepatocitos infectados con VDEN se determinó usando estuches comerciales de ELISA (Invitrogen KAC1511 y KHC0081, respectivamente). El ensayo consistió en: un volumen de la muestra junto con el conjugado fueron adicionados a pozos sensibilizados con anticuerpo monoclonal para cada citoquina, la placa fue incubada a temperatura ambiente por cierto tiempo, posteriormente se realizaron lavados con buffer, los complejos inmunes se detectaron por desarrollo de color adicionando TMB e incubando a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico (solución de parada) y la intensidad de color se midió en un espectrofotómetro Multiskan Go (Thermo Scientific) a longitud de onda de 450 nm ( $DO_{450}$ ). La concentración de la citoquina se calculó siguiendo las instrucciones del fabricante, usando la curva de calibración de cada estuche comercial. Se realizaron experimentos para establecer el MOI y tiempo mínimo post-infección viral para detectar la citoquina. Brevemente, VDEN-2 (MOI apropiado) se adsorbió a células HepG2 crecidas en

placa de 96 pozos, después de 1 h a 37°C se retiró el sobrenadante, las células fueron lavadas con PBS para remover el virus no-adsorbido y luego incubadas en medio de mantenimiento. El sobrenadante se colectó 12, 24, 48 y 72 h después de la infección y se almaceno a -70°C para cuantificar RANTES como se describió.

### **4.3 Evaluación de la actividad antiviral**

Etapa 1: determinación de la toxicidad de los compuestos para célula humana

Brevemente, células HepG2 o HEK-293 fueron sembradas en placas de 96 pozos a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/pozo e incubadas por 24 h a 37°C. El medio fue removido y medio fresco que contenía compuesto a concentración entre 12.5 – 1600  $\mu\text{M}$  fue añadido por 72 h a 37°C. Cumplido el tiempo el medio fue descartado y las células se procesaron por el ensayo de MTT como se describió. Cada compuesto se evaluó por duplicado en dos ensayos independientes. La toxicidad se expresó como: concentración máxima evaluada no tóxica (CMNT) - concentración máxima del compuesto que mantuvo la viabilidad similar al control celular y concentración citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>) – concentración del compuesto que redujo en 50% la viabilidad celular.

Etapa 2: selección de compuestos inhibitorios del VDEN-2

VDEN-2 (MOI apropiado) se adsorbió a células HepG2 crecidas en placa de 96 pozos, después de 1 h a 37°C se retiró el sobrenadante, las células fueron lavadas con PBS para remover el virus no-adsorbido y luego incubadas en medio de mantenimiento con compuesto a 30  $\mu\text{M}$  o CMNT durante 72 h. Al termino el sobrenadante fue colectado y almacenado a -20°C para cuantificar NS1 como se describió. Como droga control se incluyó la ribavirina (100  $\mu\text{M}$ ) en cada ensayo. Cada compuesto fue evaluado por triplicado en dos experimentos independientes. El efecto inhibitorio se expresó como porcentaje de reducción de NS1 con

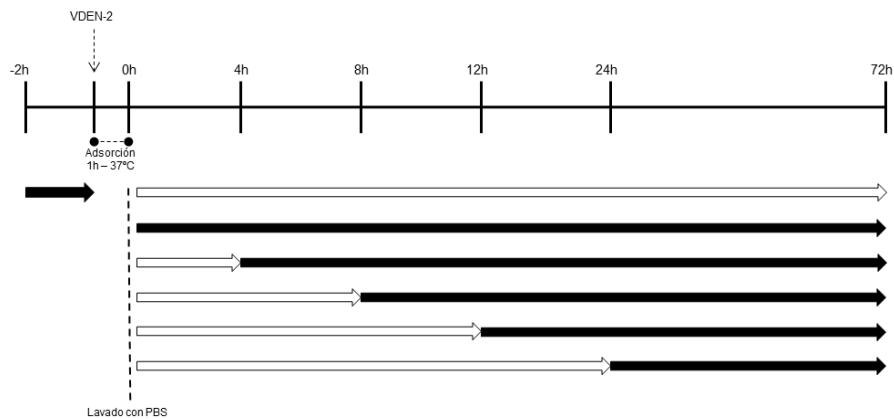
respecto al infectado no-tratado (control). Los compuestos con porcentaje  $\geq 50\%$  fueron seleccionados para la siguiente etapa.

### Etapa 3: actividad antiviral promisorio de compuestos inhibitorios

V DEN-2 (MOI apropiado) se adsorbió a células HepG2 crecidas en placa de 96 pozos, después de 1 h a 37°C se retiró el sobrenadante, las células fueron lavadas con PBS para remover el virus no-adsorbido y luego incubadas 72 h en medio con compuesto a cinco concentraciones por debajo de la CMNT. Al término el sobrenadante fue colectado y almacenado a -20°C para cuantificar NS1 como se describió. La actividad antiviral se expresó como concentración inhibitoria cincuenta (CI<sub>50</sub>) o la concentración que redujo en 50% el número de UP de NS1 con respecto al control (infectado no-tratado).

### Etapa 4: evaluación del modo de acción antiviral

El diseño experimental se muestra en la Figura 3.



**Figura 3. Diseño experimental para evaluar el modo de acción antiviral.** Las flechas blancas y negras indican ausencia o presencia del compuesto respectivamente.

*Tratamiento del virus antes de la adsorción a la célula:*

V DEN-2 (158 CCID<sub>50</sub>) se incubó o no (control) con compuesto a 100 µM o CMNT por 2 h a 37°C y la mezcla se usó para infectar monocapas de células HepG2 crecidas en placas de 96 pozos. Luego de 1 h a 37°C las células se lavaron con PBS para remover el virus no-adsorbido y se incubaron con medio al 2% SFB durante 72 h a 37°C. Al término el sobrenadante fue colectado y almacenado a -20°C para cuantificar NS1 como se describió. Como droga control de inactivación viral se incluyó el dextran-sulfato (10 µg/mL).

*Tratamiento a diferentes tiempos después de la adsorción del virus:*

Para determinar el modo de acción antiviral de los compuestos luego de la adsorción del virus. Brevemente, V DEN-2 (MOI apropiado) se adsorbió a células HepG2 crecidas en placa de 96 pozos, después de 1 h a 37°C se retiró el sobrenadante, las células fueron lavadas con PBS para remover el virus no-adsorbido y luego incubadas en medio de mantenimiento durante 72 h. Los tratamientos a 100 µM o CMNT se aplicaron inmediatamente (tiempo 0), 4, 8, 12 y 24 h después de la adsorción. Al término el sobrenadante fue colectado y almacenado a -20°C para cuantificar NS1 como se describió. El efecto inhibitorio se calculó como porcentaje de reducción de NS1 con respecto al control (infectado no-tratado). Se determinó para cada compuesto en que etapas del ciclo de replicación viral estaría actuando.

#### **4.4 Evaluación del efecto inhibitorio sobre citoquinas pro-inflamatorias**

V DEN-2 (MOI apropiado) se adsorbió a células HepG2 crecidas en placa de 96 pozos, después de 1 h a 37°C se retiró el sobrenadante, las células fueron lavadas con PBS para remover el virus no-adsorbido y luego incubadas en medio de

mantenimiento con compuesto a 100  $\mu\text{M}$  o CMNT durante el tiempo establecido para citoquinas. Al termino el sobrenadante fue colectado y almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  para cuantificar IL-8 y RANTES como se describió previamente. El efecto inhibitorio se calculó como porcentaje de reducción de cada citoquina con respecto al infectado no-tratado (control).

#### **4.5 Análisis de datos**

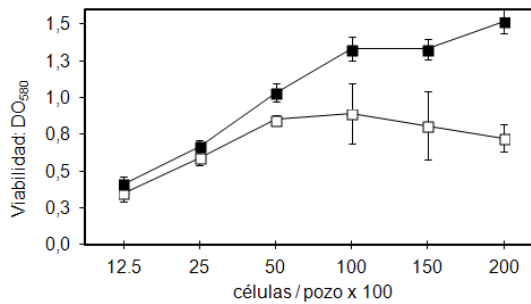
Los valores de DO y sobrevivencia fueron analizados aplicando un modelo logístico en el software R (R Core Team, 2013). La  $\text{CC}_{50}$  se calculó usando el paquete estadístico MASS y la CMNT se determinó usando la prueba de Dunnet para determinar la significancia de diferencias por cada concentración con respecto al control (no-tratado). Compuestos con valores de  $\text{CI}_{50} \leq 30 \mu\text{M}$  e  $\text{IS} \geq 4$  se consideraron con actividad promisoría. Se comparó el promedio de UP-NS1 del tratado vs el control y la significancia de las diferencias se estableció aplicando la prueba t student. Para determinar diferencias en reducción de NS1 debido a tratamiento a diferente tiempo, los datos se compararon aplicando ANOVA. El nivel de significación para el análisis se fijó en  $p < 0.05$ . Para los análisis se usaron los paquetes estadísticos del software R.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Optimización de procedimientos de laboratorio

#### Cultivo celular en placa

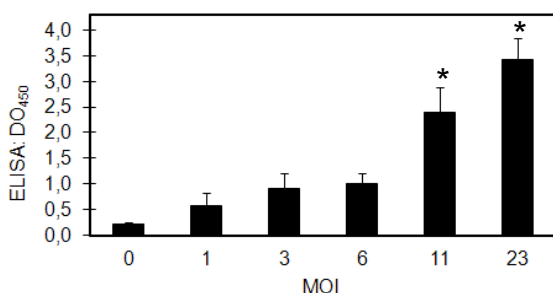
La actividad antiviral y efecto inhibitorio sobre citoquinas pro-inflamatorias de los compuestos, se examinó en células HepG2 y HEK-293 crecidas en placas de 96 pozos. Estas células forman monocapa confluyente ~72 h después de sembradas, con notoria acidificación ( $\text{pH} \pm 5.0$ ) del medio que conlleva a muerte celular. Dado que para los ensayos es indispensable una monocapa celular viable hasta por 4 días, se hicieron cultivos en placa sembrando variado número de células. Los resultados se muestran en la Figura 4. Cultivos que se iniciaron con menos de 5000 células por pozo, formaron monocapa confluyente de 50 – 70%, sin acidificación del medio y viabilidad ( $\text{DO}_{580}$ ) entre 0.85 – 1.03. De igual forma cultivos que iniciaron con 10,000 células, presentaron monocapa confluyente de 85%, leve acidificación del medio y  $\text{DO}_{580}$  de 1.33 y 0.89 para hepatocitos y célula renal, respectivamente. Por último, cultivos con más de 15,000 y 20,000 células, presentaron acidez del medio, cambios morfológicos y  $\text{DO}_{580}$  entre 0.81– 1.52 según la línea celular. De acuerdo a estos resultados, se decidió usar 10,000 células por pozo de cada línea en los experimentos.



**Figura 4. Viabilidad de células humanas crecidas en placa de 96 pozos de acuerdo al número usado en la siembra.** El número mostrado de hepatocitos (■, HepG2) y células de riñón (□, HEK-293) se sembró en cada pozo de una placa de 96 y la viabilidad se examinó al cuarto día usando el método del MTT. Los resultados son el promedio de un ensayo con ocho replicas por concentración. Se escogió el promedio de 10.000 células para iniciar el cultivo en cada pozo de una placa de 48.

#### Replicación de VDEN-2 en hepatocitos humanos

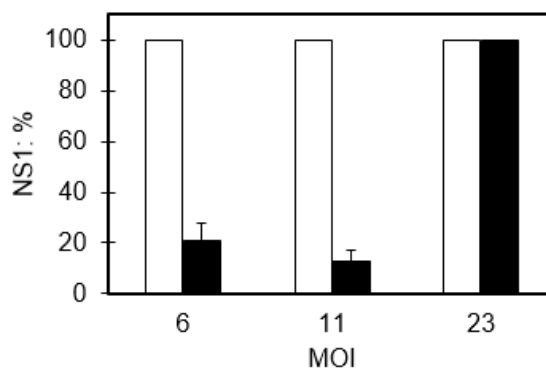
Se hicieron experimentos para establecer la multiplicidad de infección (MOI: multiplicity of infection) esto es, proporción virus:célula necesaria para obtener el nivel de replicación viral adecuado para el ensayo antiviral. VDEN-2 a diferente MOI se adsorbió 1 h a hepatocitos, la replicación se llevó a cabo por 72 h y al término el sobrenadante del cultivo se colectó para cuantificar proteína viral NS1 por ELISA (Figura 5). Con MOI hasta de 6.0 el nivel de NS1 fue 5 veces más con respecto al no-infectado, mientras que con MOI de 11.0 y 23.0 fue más de 10. Posteriormente, se realizaron experimentos para determinar el mayor MOI reducido por la droga de referencia. Para esto, VDEN-2 se adsorbió 1 h a los hepatocitos y la replicación se llevó a cabo en medio que contenía 100  $\mu$ M de ribavirina. Se observó reducción entre 78 y 88% en cultivos infectados a MOI de 6.0 y 11.0 y ninguna reducción a MOI de 23.0 (Figura 6). De acuerdo a los resultados se decidió usar MOI de 11.0 en ensayos antivirales.



MOI	NS1: UP	I <sup>‡</sup>
0.0	4.6 ± 0.7	-
1.0	12.2 ± 5.4	2.7
3.0	19.6 ± 6.3	4.3
6.0	19.5 ± 4.3	4.3
11.0	50.6 ± 10.7	11
23.0	72.4 ± 8.9	16

<sup>‡</sup>: Incremento respecto al cultivo no infectado (MOI de 0.0)

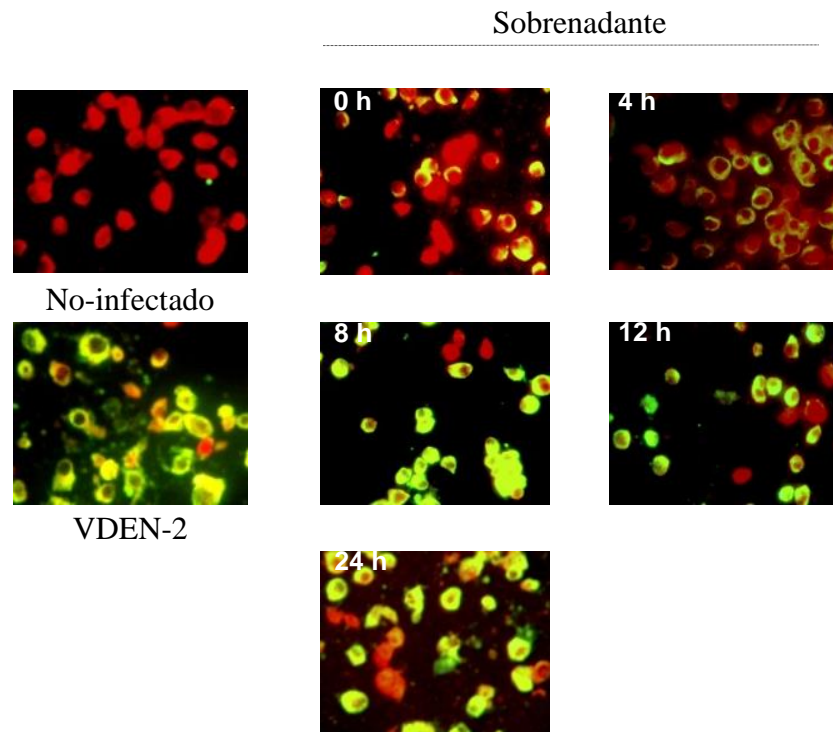
**Figura 5. Replicación del VDEN-2 en hepatocitos humanos de acuerdo a la multiplicidad de infección (MOI).** VDEN-2 se adsorbió a hepatocitos (células HepG2) y a las 72 h se determinó el nivel (Unidades PanBio: UP) de NS1 en el medio de cultivo usando el estuche de PanBio. \*: Incremento de 11 y 16 veces comparado con el cultivo no infectado (MOI de 0.0). Los datos son el promedio de dos ensayos independientes.



**Figura 6. Porcentaje de NS1 por tratamiento con droga de referencia (ribavirina) de acuerdo al MOI.** VDEN-2 se adsorbió a hepatocitos (células HepG2) y la replicación se llevó a cabo en ausencia (□) o presencia (■) de la droga. El nivel de proteína NS1 en el sobrenadante del cultivo se determinó a las 72 h post-infección. Los datos corresponden al porcentaje de NS1 con respecto al infectado no-tratado.

Una vez establecido el MOI, se realizaron experimentos para determinar la presencia de progenie viral en el sobrenadante de cultivo a varios tiempos

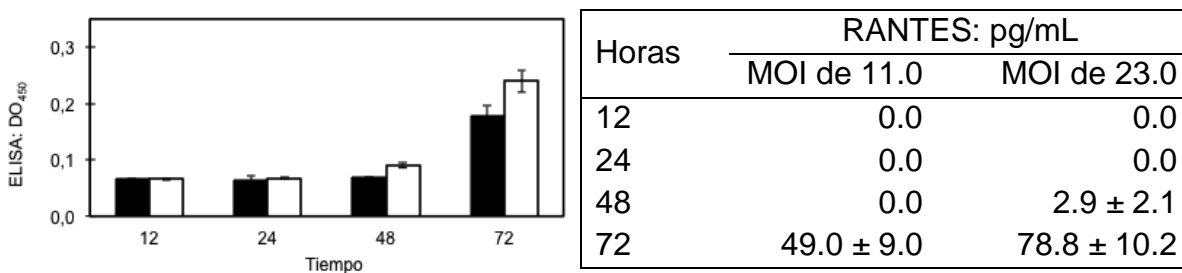
después de la adsorción del virus. VDEN-2 (MOI de 11.0) se adsorbió 1 h a los hepatocitos e inmediatamente después (tiempo 0), 4, 8, 12 y 24 h más tarde, el sobrenadante se colectó y se usó para infectar células de mosquito (C6/36) y al quinto día post-infección la células se analizaron por inmunofluorescencia indirecta para detectar la infección viral (protocolo del laboratorio: Ocazionez et al. 2006). Infección significativa se detectó con el sobrenadante colectado después de las 8 h (Figura 7). Los resultados sugieren que la internalización del virus y síntesis viral (proteína y ácido nucleico) se llevan a cabo en las primeras 4 h post-infección y a las 8 h se ha cumplido el ciclo viral dado que viriones infecciosos se recuperaron del medio de cultivo.



**Figura 7. Células de *Aedes albopictus* (C6/36) infectadas con sobrenadante del cultivo de hepatocitos humanos (HepG2) infectados con VDEN-2.** El sobrenadante se adicionó a los tiempos mostrados y al día 5to las células se analizaron para detección de virus. Se muestra el resultado de la inmunofluorescencia usando anticuerpo policlonal anti-dengue (Donado por el Instituto Evrando Chagas, Belén, Brasil).

## Ensayo para evaluar secreción de citoquina

Se realizaron experimentos para establecer el MOI y tiempo mínimo a usar en el ensayo. VDEN-2 (MOI de 11.0 y 23.0) se adsorbió 1 h a los hepatocitos y a las 12, 24, 48 y 72 h el sobrenadante se colectó para cuantificar RANTES mediante un estuche comercial de ELISA. Como se muestra en la Figura 8, la citoquina se detectó infectando las células con MOI de 11.0 durante 72 h, que son los mismos parámetros establecidos para el ensayo antiviral.



**Figura 8. Detección de la citoquina RANTES en hepatocitos humanos infectados con VDEN-2 de acuerdo al tiempo y al MOI.** VDEN-2 a MOI de 11.0 (■) y 23.0 (□) se adsorbió a hepatocitos humanos (células HepG2) y a los tiempos mostrados se determinó la concentración de RANTES en el medio de cultivo usando un estuche comercial del ELISA. Los datos son el promedio de dos ensayos independientes.

## 5.2 Toxicidad de los compuestos para célula humana

### Terpenos

La toxicidad de cada terpeno fue evaluada para establecer la CMNT a usar en el ensayo antiviral. Para esto, células HepG2 y HEK-293 se expusieron por 72 h a variadas concentraciones del terpeno y al término se evaluó la viabilidad. La Figura 9 muestra curvas dosis-respuesta representativas de ensayos de MTT. Los terpenos AF013NO, AG018OL, AN011LO, AT017OL, DC019NA, ES010OL,

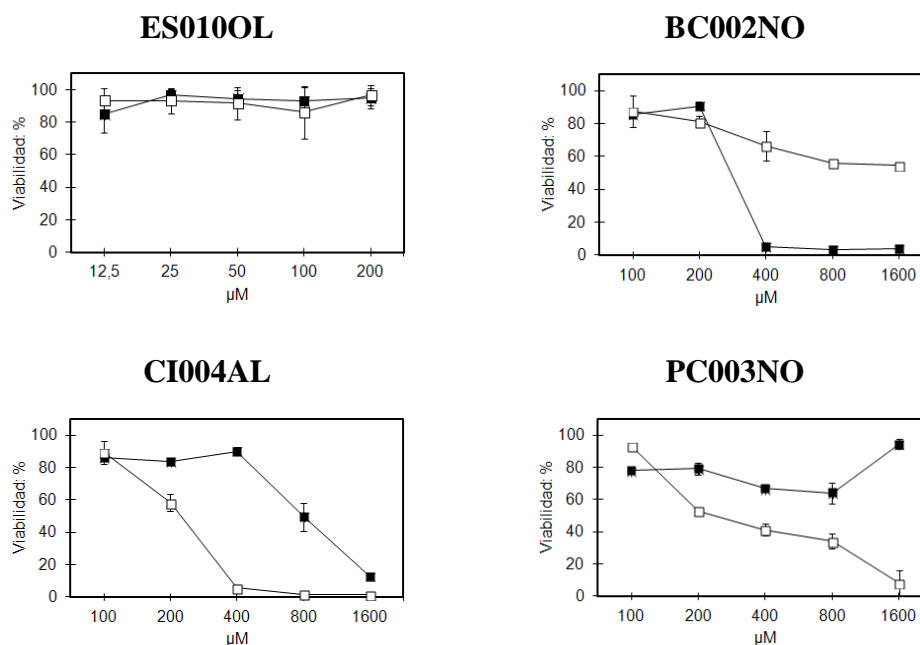
NE015OL, OL012NO, RC014NA y SC016NA se examinaron a concentraciones desde 12.5  $\mu\text{M}$  hasta 200  $\mu\text{M}$  y con ninguno se observó diferencia significativa de la viabilidad con respecto al control celular. Los terpenos BC002NO, CI004AL y PC003NO se examinaron desde 100  $\mu\text{M}$  hasta 1600  $\mu\text{M}$ . El PC003NO parece ser de muy baja toxicidad para hepatocitos, a concentración tan alta como 1600  $\mu\text{M}$  no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad. Un resultado similar se observó con BC002NO en célula renal, que a la misma concentración disminuyó en menos de 50% la viabilidad. Al contrario, el CI004AL a 1600  $\mu\text{M}$  disminuyó 100% la viabilidad de ambas células.

A partir del análisis estadístico de las curvas dosis respuesta, se determinó en 100  $\mu\text{M}$  la CMNT de cada terpeno. El valor de la  $\text{CC}_{50}$  para las dos células humanas se pudo calcular solo con los componentes examinados a alta concentración (Tabla 4), donde se observó disminución de la viabilidad en más del 50% a ciertas concentraciones. Con los otros, la  $\text{CC}_{50}$  se consideró  $> 200 \mu\text{M}$  debido a que fue la máxima utilizada en el ensayo que no afectó la viabilidad celular. Los resultados sugieren que los 13 terpenos examinados son de baja toxicidad para hepatocitos y célula renal bajo las condiciones que se examinaron.

**Tabla 4.** Concentración tóxica cincuenta ( $\text{CC}_{50}$ ) de terpenos para célula humana hepática y renal

Terpeno	Hepatocitos (HepG2)	Célula renal (HEK-293)
BC002NO	$346.9 \pm 39.8$	$> 1600^*$
CI004AL	$863.6 \pm 65.3$	$239.7 \pm 0.8$
PC003NO	$> 1600^*$	$574.2 \pm 271.5$

\*: Máxima concentración usada en el ensayo que no afectó la viabilidad celular o la disminuyó en menos del 50%. Datos expresados en  $\mu\text{M}$ .



**Figura 9. Curvas dosis-respuesta representativas de ensayos de MTT para evaluar citotoxicidad de terpenos sobre célula humana.** Hepatocitos [HepG2 (■)] y célula de riñón [HEK-293 (□)] se expusieron a las concentraciones mostradas del terpeno y la viabilidad se evaluó a las 72 h. Los datos son el promedio de dos ensayos independientes por duplicado.

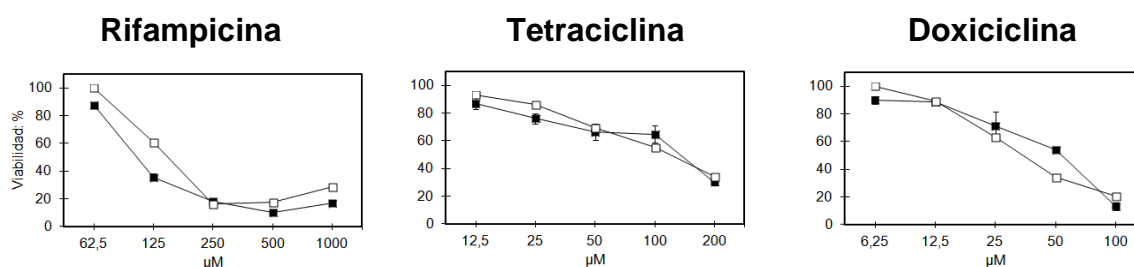
### Antibióticos

La toxicidad de cada antibiótico para hepatocitos y célula renal se evaluó como fue descrito para los terpenos. La Figura 10 muestra las curvas dosis-respuesta obtenidas en ensayos de MTT. Con los tres antibióticos la CMNT para hepatocitos estuvo entre 13 – 63 µM y la CC<sub>50</sub> fue < 220 µM con las dos células humanas (Tabla 5). Bajo los criterios adoptados en este estudio (Cos et al. 2006, Amoros et al. 1992), los antibióticos presentan notoria toxicidad para las células humanas examinadas. La doxicilina fue el antibiótico más tóxico (CMNT de 13 µM) seguido por tetraciclina (CMNT de 25 µM) y rifampicina (CMNT de 63 µM).

**Tabla 5.** Toxicidad de antibióticos para célula humana

Antibiótico	CMNT: $\mu\text{M}$	CC <sub>50</sub> : $\mu\text{M}$	
		Hepatocitos (HepG2)	Célula renal (HEK-293)
Rifampicina	63	157.3 $\pm$ 2.3	215.8 $\pm$ 0.3
Tetraciclina	25	131.3 $\pm$ 13.6	137.8 $\pm$ 0.1
Doxiciclina	13	53.2 $\pm$ 3.7	51.5 $\pm$ 1.0

CMNT: concentración máxima no toxica para hepatocitos. CC<sub>50</sub>: concentración que redujo la viabilidad celular en 50%.



**Figura 10.** Curvas dosis-respuesta de ensayos de MTT para evaluar citotoxicidad de antibióticos sobre célula humana. Hepatocitos [HepG2 (■)] y célula renal [HEK-293 (□)] se expusieron a las concentraciones mostradas del antibiótico y la viabilidad se evaluó a las 72 h. Los datos son el promedio de dos ensayos independientes por duplicado.

### 5.3 Actividad antiviral

Para este estudio la actividad antiviral se consideró como inhibición de la replicación *in vitro* del VDENV-2, medida como porcentaje de reducción de NS1 en el sobrenadante del cultivo tratado con respecto al no-tratado. Bajo este contexto, la actividad antiviral se evaluó con tres propósitos:

#### *Selección de compuestos con actividad promisorio*

VDENV-2 (MOI de 11.0) se adsorbió a los hepatocitos y la replicación se llevó a cabo en medio de cultivo que contenía 30  $\mu\text{M}$  del terpeno. Se escogió esta

concentración por ser cercana a la máxima inhibitoria (25  $\mu\text{M}$ ) para un compuesto puro con actividad antiviral promisorio (Cos et al. 2006, Amoros et al. 1992). De los 13 terpenos evaluados, tres redujeron la replicación viral entre 49 y 63%, cuatro entre 27 y 32% y los restantes seis en menos de 22% (Tabla 6). El BC002NO resultó el más activo (reducción en 63.5%) seguido por el ES010OL (50.1%) y el CI004AL (49.0%). Estos tres terpenos se seleccionaron para análisis más detallado de la actividad antiviral. El PC003NO, aunque redujo la replicación viral en 28.2%, se seleccionó también por ser de baja toxicidad para hepatocitos.

Los terpenos BC002NO, ES010OL, CI004AL y PC003NO se examinaron a variadas concentraciones por debajo de la CMNT, con el fin de establecer la  $\text{CI}_{50}$  y calcular el IS para hepatocitos y célula renal. VDEN-2 (MOI de 11.0) se adsorbió a los hepatocitos y la replicación se llevó a cabo por 72 h en medio de cultivo que contenía terpeno. La Figura 11 muestra las curvas dosis-respuesta y la Tabla 7 los valores de la  $\text{CI}_{50}$  y el IS. Los cuatro terpenos presentaron  $\text{IS} > 7.0$  tanto en hepatocitos como en célula renal. El BC002NO y ES010OL fueron activos a  $\text{CI}_{50} < 30 \mu\text{M}$  y en consecuencia se pueden considerar activos. El CI004AL mostro una  $\text{CI}_{50}$  de 31.3  $\mu\text{M}$  y presentó el mayor IS (27.5) para hepatocitos, considerándose promisorio. El PC003NO fue activo pero a  $\text{CI}_{50}$  tres veces mayor a la máxima establecida ( $73.0 \pm 8.4 \mu\text{M}$  versus 30.0  $\mu\text{M}$ ) aunque el IS fue  $> 7.0$ .

La actividad de los antibióticos se evaluó de la misma manera que los terpenos usando la CMNT establecida en el ensayo del MTT. A MOI de 11.0 la rifampicina redujo en 25% la replicación viral, mientras que la tetraciclina y doxiciclina no tuvieron efecto. A MOI de 6.0 se observó reducción en 69.1% por tratamiento con rifampicina y nuevamente tetraciclina y doxiciclina no tuvieron efecto (Tabla 8). La rifampicina se examinó a variadas concentraciones por debajo de la CMNT (Figura 12A). La  $\text{CI}_{50}$  resulto en  $49.7 \pm 8.9 \mu\text{M}$  y el IS en 3.2 y 4.3 para hepatocitos y célula renal respectivamente.

**Tabla 6.** Efecto inhibitorio de terpenos sobre la replicación del VDEN-2

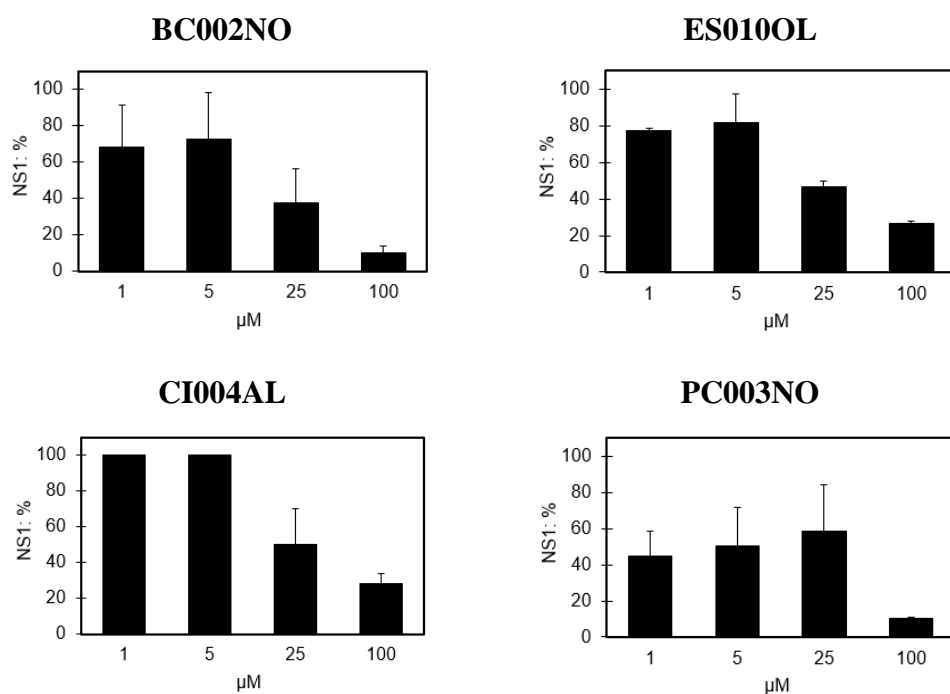
Terpeno	Virus: NS1 (UP)	Reducción: %
BC002NO	20.6 ± 3.5	63.5
ES010OL	30.7 ± 11.7	50.1
CI004AL	28.8 ± 3.4	49.0
AN011LO	42.1 ± 18.8	32.0
OL012NO	44.8 ± 30.8	29.7
PC003NO	40.5 ± 7.0	28.2
AF013NO	45.4 ± 22.2	27.1
RC014NA	48.9 ± 25.3	21.7
NE015OL	48.4 ± 20.0	21.5
SC016NA	50.3 ± 19.2	18.2
AG018OL	50.2 ± 12.4	17.1
DC019NA	51.5 ± 20.7	16.5
AT017OL	52.7 ± 21.2	14.5
Ninguno	60.4 ± 13.2	-
Ribavirina: 100 µM	9.5 ± 3.3	84.6

VDEN-2 (MOI de 11.0) se adsorbió a hepatocitos humanos (células HepG2) y la replicación se llevó a cabo en presencia de 30 µM de cada terpeno. El nivel (Unidades PanBio: UP) de proteína viral NS1 en el sobrenadante del cultivo se determinó a las 72 h pos-infección. Los datos corresponden al promedio de dos experimentos independientes. Ribavirina como medicamento de referencia.

**Tabla 7.** Potencial antiviral de terpenos

Terpeno	CI <sub>50</sub>	Hepatocitos (HepG2)		Célula renal (HEK-293)	
		CC <sub>50</sub>	IS	CC <sub>50</sub>	IS
BC002NO	22.5 ± 5.6	346.9 ± 39.8	15.4	> 1600*	> 71.1
ES010OL	23.2 ± 4.0	> 200*	> 8.6	> 200*	> 8.6
CI004AL	31.3 ± 4.5	863.6 ± 65.3	27.5	239.7 ± 0.8	7.7
PC003NO	73.0 ± 8.4	> 1600*	> 21.9	574.2 ± 271.5	7.9

CI<sub>50</sub>: concentración (µM) inhibitoria 50 en hepatocitos. CC<sub>50</sub>: concentración (µM) que redujo la viabilidad celular en 50%. IS: índice de selectividad (CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>). \*Concentración (µM) máxima evaluada en el ensayo.

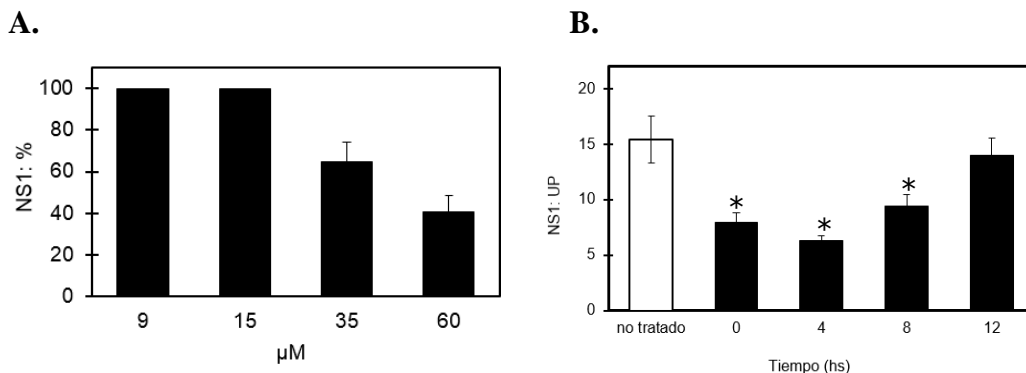


**Figura 11. Actividad antiviral de terpenos dependiendo de la concentración.**VDEN-2 (MOI de 11.0) se adsorbió a hepatocitos humanos (células HepG2) y la replicación se llevó a cabo en presencia del terpene a las concentraciones mostradas. El nivel (UP) de NS1 en el sobrenadante del cultivo se determinó a las 72 h post-infección. Los datos corresponden al porcentaje de NS1 y son el promedio de dos experimentos independientes por duplicado.

**Tabla 8.** Reducción de la replicación del VDEN-2 en presencia de antibiótico en el medio de cultivo.

Antibiótico	μM	MOI: 11.0		MOI: 6.0	
		NS1 (UP)	%	NS1 (UP)	%
Rifampicina	60.0	47.9	25.1	5.2	69.1
Tetraciclina	20.0	84.9	0.0	18.0	0.0
Doxiciclina	20.0	82.8	0.0	19.8	0.0
Ninguno	-	64.0	-	16.7	-
Ribavirina	100.0	5.8	91.0	3.8	77.1

VDEN-2 al MOI señalado se adsorbió a hepatocitos humanos (células HepG2) y la replicación se llevó a cabo en presencia del antibiótico a concentración no-tóxica (CMNT). El nivel (Unidades PanBio: UP) de NS1 en el sobrenadante del cultivo se determinó a las 72 h pos-infección. Ribavirina como antiviral de referencia.



**Figura 12. Actividad antiviral de rifampicina. A: curva dosis-respuesta:** VDEN-2 (MOI de 6.0) se adsorbió a hepatocitos humanos (células HepG2) por 1 h y la replicación se llevó a cabo en presencia de rifampicina a las concentraciones mostradas. **B: modo de acción.** Virucidal: -0 h, virus (158 CCID<sub>50</sub>) se incubó 2 h con el antibiótico (60 μM) antes de ser adsorbido a hepatocitos humanos (células HepG2). Antiviral: 0 – 24 h, virus (MOI de 6.0) se adsorbió a la célula por 1 h y al término el antibiótico (60 μM) se adicionó a los tiempos mostrados. 0: inmediatamente después de la adsorción. En todos los casos, el nivel (Unidades PanBio: UP) de NS1 en el sobrenadante se determinó a las 72 h pos-adsorción. Los datos corresponden al porcentaje de reducción de NS1 con respecto al control (infectado no-tratado: 15.4 ± 0.7 UP). \*: p < 0.008 con respecto al control. Los datos son el promedio de dos experimentos independientes por duplicado.

#### *Modo de acción antiviral de compuestos activos*

Se realizaron experimentos para evaluar el efecto virucidal de cada terpeno y para inferir cuál etapa del ciclo viral podría ser afectada por el tratamiento con el mismo. Los resultados se presentan en la Figura 12, 13 y Tabla 9.

VDEN-2 (158 CCID<sub>50</sub>) se incubó con C1004AL (100 μM) o PC003NO (100 μM) y la mezcla se usó para infectar hepatocitos por 72 h. Con ninguno de los dos se observó actividad, esto es, la incubación previa del virus con el terpeno no afectó su subsecuente replicación. El nivel de NS1 en cultivos infectados con virus-

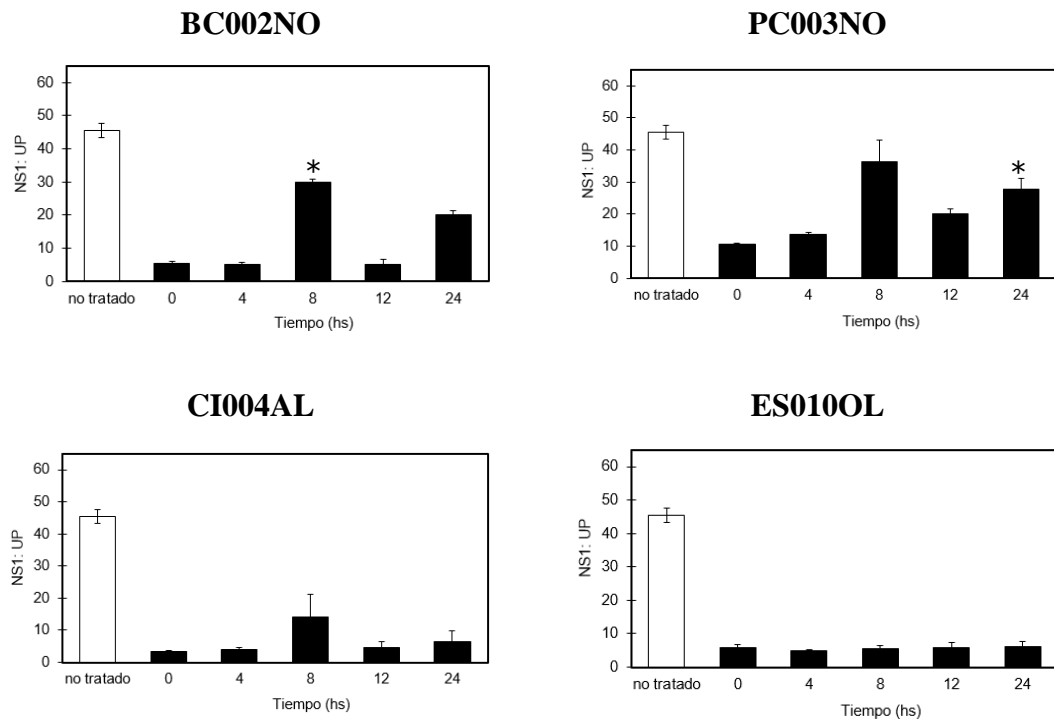
tratado no fue significativamente diferente del nivel con virus no-tratado (56.2 – 66.9 versus 43.9 UP;  $p > 0.07$ ).

Otros experimentos se realizaron adicionando terpeno a distintos tiempos después de la adsorción del virus. VDEN-2 (MOI de 11.0) se adsorbió 1 h a los hepatocitos y la replicación se llevó a cabo por 72 h. El terpeno (100  $\mu$ M) se adicionó inmediatamente (tiempo 0) y 4 h post-adsorción cuando estaría ocurriendo la internalización de la partícula viral; y las 8, 12 y 24 h cuando NS1 y viriones infecciosos están presentes en el medio de cultivo (Figura 4). El tratamiento con BC002NO en las primeras 4 h redujo en 88% la replicación viral (5.3 versus 45.4 UP de NS1 del control;  $p < 0.001$ ); a las 8 h en 34% (29.9 versus 45.4 UP;  $p < 0.05$ ); a las 12 h nuevamente en 88% (5.3 versus 45.4 UP;  $p < 0.001$ ); y las 24 h en 56% (20.1 versus 45.4 UP;  $p < 0.001$ ). El mismo patrón de respuesta a los tratamientos se observó con CI004AL y PC003NO, el primero con reducción más notoria para todos los tiempos y el segundo con menos (Tabla 8). Con respecto al ESO10OL, el patrón de respuesta fue distinto: el tratamiento a cada uno de los tiempos seleccionados produjo inhibición significativa con respecto al no-tratado (4.8 – 6.3 versus 49.0 UP de NS1).

**Tabla 9.** Reducción de la replicación del VDEN-2 por terpenos por tratamiento en tiempos distintos después de la adsorción.

Control (no-tratado): 45.4 – 49.0 Unidades PanBio (UP) de NS1				
Horas	BC002NO: UP / R:% <sup>¶</sup>	ESO10OL: UP / R:% <sup>¶</sup>	CI004AL: UP / R:% <sup>¶</sup>	PC003NO: UP / R:% <sup>¶</sup>
0	5.3 ± 2.6 (88.2)	5.9 ± 0.8 (88.0)	3.5 ± 0.2 (92.2)	10.6 ± 1.0 (76.6)
4	5.2 ± 1.7 (88.6)	4.8 ± 0.5 (90.1)	4.0 ± 0.7 (91.2)	13.8 ± 2.7 (69.7)
8	29.9 ± 7.8* (34.2)	5.4 ± 1.0 (89.0)	14.2 ± 7.0* (68.6)	36.2 ± 7.8* (20.1)
12	5.3 ± 2.0 (88.4)	5.8 ± 1.5 (88.1)	4.7 ± 1.8 (89.7)	20.0 ± 5.6 (55.9)
24	20.1 ± 2.8* (55.7)	6.3 ± 1.4 (87.2)	6.5 ± 3.3 (85.8)	27.8 ± 6.9* (38.8)

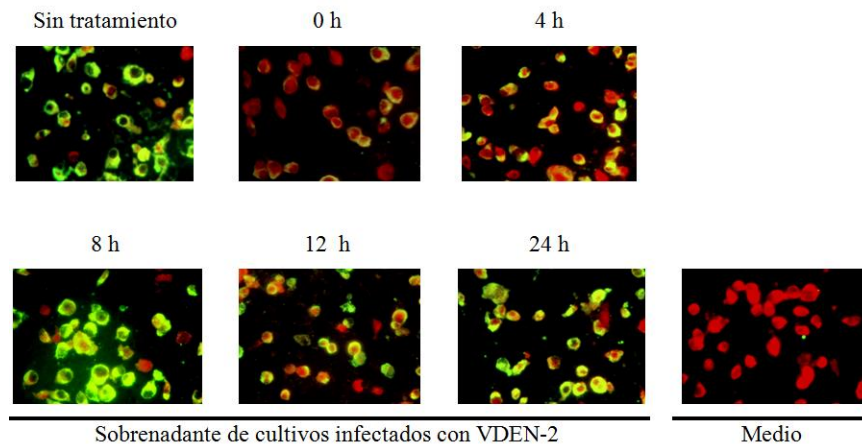
\* $p < 0.05$  (prueba t) para cada tiempo con respecto a la hora 0. <sup>¶</sup>: porcentaje de reducción de NS1. Los datos son el promedio de dos experimentos independientes por duplicado.



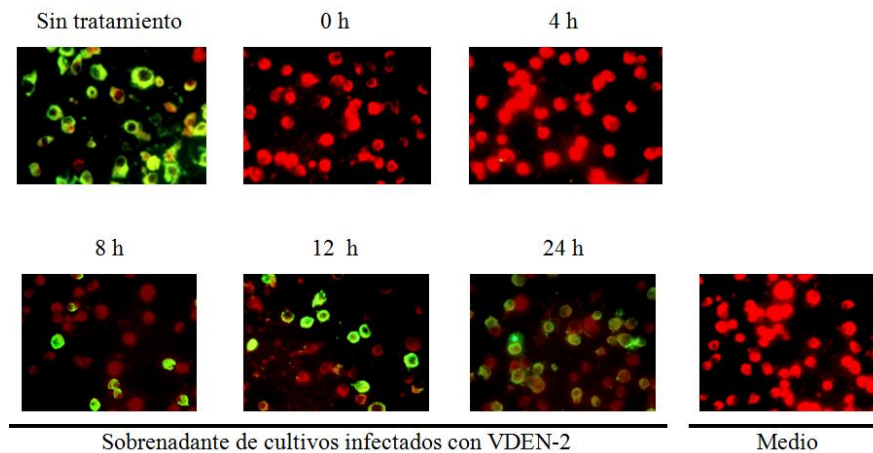
**Figura 13. Actividad inhibitoria de terpenos sobre el VDEN-2 en tiempos después de la adsorción.** Virucidal: -0 h, virus (158 CCID<sub>50</sub>) se incubó 2 h con el terpeno antes de ser adsorbido a hepatocitos humanos (células HepG2). Antiviral: 0 – 24 h, virus (MOI de 11.0) se adsorbió a la célula por 1 h y al término el terpeno (100 µM) se adicionó a los tiempos mostrados. 0: inmediatamente después de la adsorción. En todos los casos, el nivel (Unidades PanBio: UP) de NS1 en el sobrenadante se determinó a las 72 h pos-adsorción. Los datos corresponden al porcentaje de reducción de NS1 con respecto al control (infectado no-tratado: 45.4 ± 1.8 para BC002NO, CI004AL, PC003NO y 49.0 ± 1.8 para ES0100L). Resultados promedio de dos experimentos independientes por duplicado. \*: p < 0.05 con respecto al control.

Para confirmar si la reducción de NS1 debida a los tratamientos con terpeno era también reducción de progenie de virus infeccioso, el sobrenadante de los cultivos procesado por ELISA-NS1 se usó simultáneamente para infectar células de mosquito (C6/36) por 5 días. La presencia del virus en estas células se confirmó por inmunofluorescencia indirecta. La Figura 14 muestra el resultado con BC002NO: no se recuperó virus infeccioso del sobrenadante del tiempo 0 h, con el

de las 4 h menos del 10% de las células se infectaron y con el de las 8, 12 y 24 h el virus fue fácilmente recuperado (> 90% de células infectadas). Resultados similares se observaron con C1004AL y PC003NO (no mostrado). La figura 15 muestra el resultado con el ES010OL: no se recuperó virus infeccioso del sobrenadante del tiempo 0 y 4 h, con el de las 8 h menos del 5% de las células se infectaron y con el de las 12 y 24 h el virus fue recuperado (60% de células infectadas). Los resultados de experimentos time-in-addition evidencian reducción significativa de la replicación del VDEN-2 debida a tratamiento en las primeras 4 h después de la adsorción, lo que sugiere que BC002NO, ES010OL, C1004AL y PC003NO podrían actuar como inhibidores de entrada. La reducción de NS1 por tratamiento entre 8 – 12 h después de la adsorción, cuando ya se detectan viriones infecciosos en el sobrenadante del cultivo (Figura 7), se discute adelante.



**Figura 14. Recuperación de VDEN-2 de hepatocitos humanos (células HepG2) infectados y tratadas con BC002NO.** El sobrenadante de los cultivos del experimento mostrado en la Figura 3 se usó para infectar células del mosquito *Aedes albopictus* (C6/36) y al 5to día las células se examinaron por inmunofluorescencia para confirmar la presencia del virus. Se muestran los tiempos (horas) después de la adsorción cuando se hizo el tratamiento con el terpeno.



**Figura 15. Recuperación de VDEN-2 de hepatocitos humanos (células HepG2) infectados y tratadas con ES010OL.** El sobrenadante de los cultivos del experimento mostrado en la Figura 3 se usó para infectar células del mosquito *Aedes albopictus* (C6/36) y al 5to día las células se examinaron por inmunofluorescencia para confirmar la presencia del virus. Se muestran los tiempos (horas) después de la adsorción cuando se hizo el tratamiento con el terpeno.

El modo de acción de la rifampicina se evaluó como fue descrito para los terpenos. (Figura 12 B). No se observó efecto virucidal: 40.8 versus 43.9 UP ( $p = 0.820$ ) en tratado versus no-tratado. El tratamiento en las primeras 4 h redujo en 48 - 59% la replicación viral (8.0 – 6.3 versus 15.4 UP de NS1 del control;  $p < 0.001$ ); a las 8 h en 39% (9.5 UP versus 15.4 UP;  $p = 0.008$ ); y a las 12 h en 9% (14 versus 15.4 UP;  $p = 0.083$ ). Cuando se comparó la reducción debida a los tratamientos en el tiempo 0 (no virus infeccioso) y 12 h (virus infeccioso en el sobrenadante del cultivo), las diferencias fueron significantes (8.0 versus 14.0 UP;  $p = 0.008$ ), pero lo mismo no se vio con el tratamiento a las 8 h (9.5 versus 14.0 UP;  $p = 0.042$ ). Los resultados no permiten concluir con precisión cuál etapa del ciclo viral podría ser inhibida por la rifampicina.

#### 5.4 Efecto de compuestos activos sobre citoquinas

Se evaluó el efecto sobre la secreción de IL-8 y RANTES en hepatocitos infectados con VDEN-2 por tratamiento con BC002NO, ES010OL, CI004AL, PC003NO y rifampicina. El terpeno (100  $\mu$ M) y el antibiótico (60  $\mu$ M) se adicionaron inmediatamente después de la adsorción del virus y la citoquina se cuantificó en el sobrenadante colectado a las 72 h por ELISA. La Tabla 10 muestra los resultados. De los terpenos, el CI004AL fue el que mayormente redujo ( $p < 0.01$ ) el nivel de las dos citoquinas, esto es  $> 78\%$ ; el BC002NO redujo ( $p = 0.01$ ) notoriamente ( $> 80\%$ ) IL-8 pero no tuvo efecto sobre RANTES ( $43.2 \pm 20.8$  Vs  $56.3 \pm 2.9$  pg/mL;  $p = 0.46$ ); el PC003NO redujo el nivel de las dos citoquinas ( $p < 0.02$ ) aunque el porcentaje fue menor a  $65\%$  en ambos casos; y el ES010OL redujo ( $p = 0.03$ ) IL-8 en menos de  $65\%$  pero tampoco tuvo efecto sobre RANTES ( $49.0 \pm 20.8$  Vs  $56.3 \pm 2.9$  pg/mL;  $p = 0.69$ ). La rifampicina fue el compuesto más activo: redujo ( $p < 0.02$ ) ambas citoquinas en  $83\%$ .

**Tabla 10.** Efecto inhibitorio de los compuestos activos para VDEN-2 sobre la secreción de citoquinas pro-inflamatorias

Compuesto	IL-8		RANTES	
	pg/mL	Inhibición:%	pg/mL	Inhibición: %
Ninguno	$69.1 \pm 11.2$	-	$56.3 \pm 2.9$	-
CI004AL	$7.6 \pm 2.9$	89.0	$12.1 \pm 1.1$	78.5
BC002NO	$9.0 \pm 2.4$	87.0	$43.2 \pm 20.8^*$	23.4
PC003NO	$26.0 \pm 2.9$	62.4	$24.7 \pm 6.1$	56.2
ES010OL	$25.9 \pm 3.2$	62.5	$49.0 \pm 22.6^*$	13.0
Rifampicina	$11.6 \pm 3.8$	83.2	$9.1 \pm 3.9$	83.8

VDEN-2 (MOI de 11.0) se adsorbió a hepatocitos humanos (células HepG2) y la replicación se llevó a cabo en presencia de 100  $\mu$ M de cada terpeno ó 60  $\mu$ M de rifampicina. La concentración de IL-8 y RANTES en el sobrenadante del cultivo se determinó a las 72 h pos-infección. Los datos corresponden al promedio de dos experimentos independientes. \*: no-significante con respecto al no-tratado (ninguno):  $p > 0.4$ , prueba t; los otros valores fueron significantes, valor de  $p$  entre 0.02 y 0.002

## 6. DISCUSIÓN

En dengue, la viremia y la respuesta inmune inflamatoria juegan papel determinante del desenlace clínico (Yacoub et al. 2013). A las citoquinas IL-8 y RANTES se les atribuye parte del efecto sobre el epitelio vascular que lleva a incremento de la permeabilidad vascular y en consecuencia al choque hipovolémico (Sun et al. 2013; Rathakrishnan et al. 2012; Medin et al 2005). Dado que la respuesta de citoquinas se desencadena por la presencia del virus, un compuesto que disminuya estas proteínas y simultáneamente inhiba la replicación del virus podría considerarse un buen candidato promisorio para la invención de un medicamento para el dengue (Pooja et al. 2014). Los resultados de este trabajo demuestran que algunos terpenos tienen efecto inhibitorio *in vitro* sobre la replicación del VDEN y sobre el nivel de IL-8 y RANTES secretadas por la célula infectada.

### *Validez del ensayo in vitro*

Una amplia variedad de ensayos basados en célula se usan para evaluar actividad antiviral de compuestos sobre el VDEN. Un sinnúmero de moléculas activas se han descubierto en ensayos con células de animales y en menor proporción de humanos (Teizeria et al. 2013; Lim et al. 2013; Noble et al. 2010). Hay acuerdo que los resultados son más confiables cuando se usan células blanco de la infección natural del virus. En este trabajo se usaron hepatocitos humanos (HepG2), que son células comprometidas en la patogénesis del virus y han sido ampliamente utilizadas para estudiar el ciclo de replicación viral, la secreción de la proteína NS1 y la asociación entre infección y expresión de citoquinas (Tsai YT et al. 2011; Conceição et al. 2010; Le-Poder et al. 2005).

La reducción de progenie viral cuantificada por plaqueo y/o la reducción de placas de infección son los procedimientos más aceptados para evaluar el efecto antiviral de compuestos (Cos et. al, 2006; Crance et al. 2003). Si bien estos procedimientos son altamente confiables, se realizan en célula de origen animal (Vero, BKH-21, C6/36), son técnicamente difíciles y por lo mismo inapropiados para tamizaje rápido de un número significativo de compuestos. En consecuencia, en este estudio se implementó y optimizó un ensayo de reducción de proteína viral NS1 secretada que, como se demostró (figura 5), concordó con reducción de partículas virales. Con este ensayo, el resultado se puede obtener en cuatro días y usando placas de 96 pozos se pueden evaluar simultáneamente varios compuestos. Con las otras técnicas convencionales no habría sido posible estudiar los 13 terpenos seleccionados para este estudio, en el tiempo destinado para la experimentación. En proyectos de investigación de otros estudiantes de posgrado vinculados al grupo, solo fue posible evaluar 4 - 6 compuestos usando plaqueo.

Los indicadores de actividad antiviral *in vitro* son variados y los resultados son difíciles de comparar debido a las diferencias entre ensayos. No obstante, hay acuerdo que un compuesto es promisorio cuanto mayor el IS y que éste valor sea al menos mayor que 4, esto es, que la concentración inhibitoria sea una cuarta parte de la concentración citotóxica (Cos et al, 2006, Amoros et al. 1992). En este estudio se adoptó un criterio adicional: reducción de la replicación viral (NS1) en al menos 50% a 30.0  $\mu\text{M}$  o a la máxima concentración no-tóxica del antibiótico. Este valor se estableció con base en que decenas de compuestos sintéticos promisorios, son activos a concentraciones cercanas o por debajo de 30.0  $\mu\text{M}$  (Teixeria et al. 2013, Lim et al. 2013; Abubakr et al. 2013; Abd-Kadir et al. 2013; Julander et al. 2011; Canard et al. 2010). El ensayo del MTT es el procedimiento más usado para determinar la citotoxicidad de un compuesto. Se conoce que el resultado para un mismo compuesto varía según el tipo de célula. Así, se recomienda que la toxicidad se evalúe sobre células humanas de hígado y riñón y

una célula de origen murino (Xia et al. 2008). En este estudio la  $CC_{50}$  se determinó sobre hepatocitos de tejido canceroso (HepG2) y célula de riñón humano embrionario (HEK-293) proveniente de tejido normal. Se consideró terpeno no-toxico cuando: i) la viabilidad de ambas células se mantuvo en al menos 90% a cualquier concentración de terpeno evaluada y ii) la  $CC_{50}$  fue al menos cuatro veces más con respecto a la  $CI_{50}$ . El segundo criterio fue propuesto por Amoros et al. (1992) y Tsuchiya et al. (1985).

El modo de acción antiviral de los compuestos seleccionados se trató de elucidar en este estudio. Para esto se usó un ensayo en hepatocitos, adicionando el terpeno a distintos tiempos después de la adsorción del virus. Como se demostró, la progenie viral en cultivos no-tratados se recuperó en células de mosquito (C6/36) a las 8, 12 y 24 hs post-infección. De acuerdo a este resultado, se asumió que el ciclo viral se había completado a las 8 h y que a las 12 y 24 h había suficientes viriones infecciosos en el sobrenadante del cultivo. Fink et al. (2007) y Theparit et al. (2004) encontraron progenie viral de VDEN-2 en las mismas células a las 12 y 24 hs pero no desde las 8 h. La diferencia podría radicar en la concentración de inóculo viral utilizado para infectar las células y en la cepa viral.

#### *Actividad de terpenos*

Los terpenos analizados en este estudio se pueden considerar no-tóxicos para las células humanas examinadas. El tratamiento con 10 de ellos no modificó la viabilidad celular, aun usando concentraciones tan altas como 200  $\mu$ M. Más aún, los 13 terpenos se analizaron en nuestro Laboratorio en ensayos de MTT usando célula renal de mono (Vero), melanocitos de ratón (B16F10), carcinoma humano de mama (MCF17) y de cervix (Hela). Con todos la  $CC_{50}$  fue mayor que 150  $\mu$ M y esto confirma la baja toxicidad *in vitro* adoptando el criterio de Cos et al. (2006), esto es: la  $CC_{50}$  de un compuesto no-toxico deberá ser mayor que 100  $\mu$ M. En un

estudio previo realizado por el grupo (Gómez et al, 2013), se evaluó la toxicidad del citral sobre célula Vero y Hela. Este terpeno se consideró tóxico ya que la  $CI_{50}$  fue solo 1.5 veces mayor que la  $CC_{50}$ , entretanto, para este estudio fue 27.5 usando hepatocitos. Astani et al. (2009 y 2011) reportaron baja toxicidad de terpenos para célula RC-37 ( $CC_{50}$  entre 171 y 475  $\mu M$ ).

Los terpenos BC002NO, ES010OL, CI004AL y PC003NO resultaron promisorios. Esto es, la  $CI_{50}$  fue 7 a 71 veces menor que la  $CC_{50}$  (30.0 versus 239.7 y 1600  $\mu M$ ). Estos cuatro terpenos también resultaron activos por análisis *in silico*, que realizaron investigadores del Grupo de Química Computacional de la Universidad de Cartagena (Pajaro-Castro et al. 2014). De 53 terpenos analizados el BC002NO, ES010OL, CI004AL y PC003NO presentaron uno de los más altos índices de afinidad con varias de las proteínas del VDEN-2, entre estas las de la envoltura (E y prM). Varios terpenos también han resultado con actividad inhibitoria ( $CI_{50}$  entre 1.5 a 120.0  $\mu M$  e  $IS > 4.0$ ) sobre el Virus Herpes Simplex, el cual al igual que el VDEN posee envoltura (Astani et al. 2009 y 2011).

Según los criterios adoptados en este estudio, 10 terpenos resultaron inactivos contra el VDEN-2. Esto en consideración a que redujeron en menos de 50% la replicación viral cuando se usaron a 30.0  $\mu M$ . No obstante, no pueden ser excluidos ya que el resultado podría ser distinto a mayor concentración y con otro tipo de ensayo. Como se presentó en los resultados, el PC003NO fue activo a 73.0  $\mu M$  con  $IS$  entre 7.9 y 21.9 dependiendo de la célula usada para el MTT, y estos valores sugieren actividad promisoriosa *in vitro*.

Los resultados de los ensayos de adición en el tiempo, demostraron que el tratamiento con BC002NO y PC003NO inmediatamente y 4 h después de la adsorción afecta notoriamente la subsecuente replicación del virus comparado con

el tratamiento a las 8 y 24 h. Estos resultados respaldan el concepto que los terpenos podrían inhibir etapas muy tempranas del ciclo viral (adsorción, penetración o síntesis de genoma y proteína). Aún más, el tratamiento a las 8 h post-infección no redujo la subsecuente replicación del virus, pero a las 12 y 24 h se observó efecto inhibitorio con respecto al no-tratado siendo más notorio con el ES010OL y CI004AL (Figura 12). Como se mencionó, desde las 8 h se recuperaron viriones infecciosos en células de mosquito. El resultado de estos tratamiento podría explicarse por uno o más de los siguientes eventos: i) a las 8 h post-infección se inicia la liberación del virus al sobrenadante del cultivo y en esta etapa el terpeno no actúa; ii) a las 12 – 24 h, cuando el título de viriones extracelulares se ha incrementado, el terpeno podría ligarse al virus impidiendo la adsorción; y iii) el terpeno podría formar complejos con la proteína NS1 o inactivarla y esto impide que se detecte en el ensayo del ELISA. Como se mencionó, los terpenos tienen alta afinidad *in silico* por proteínas virales. Si los dos últimos eventos ocurrieron simultáneamente, podrían explicar en parte el resultado del tratamiento con ES010OL y CI004AL. Estos terpenos redujeron notoriamente a cualquier tiempo después de la adsorción (Figura 12). La actividad inhibitoria de terpenos sobre el VFA y Virus Herpes Simplex, ha sido también explicada como interrupción de etapas tempranas del ciclo viral (Gómez et al., 2013, Astani et al. 2009 y 2011).

La actividad virucidal de los terpenos activos se intentó evaluar en este estudio. Con ninguno se observó reducción de la replicación, cuando el virus se incubó con el terpeno por 2 h antes de ser adsorbido a la célula. Este resultado fue contrario al observado en un estudio previo con el Virus de la Fiebre Amarilla (Gómez et al. 2013). La diferencia podría explicarse por el virus mismo y porque en el otro estudio se usó reducción de placa. Así, para descartar o confirmar más precisamente efecto virucidal de los terpenos, se requiere hacer la evaluación usando el ensayo de reducción de placa.

Los resultados de la Tabla 10 demuestran que los terpenos activos redujeron la secreción de IL-8 y RANTES en hepatocitos infectados con el VDEN. No se encontraron trabajos publicados para comparar y discutir estos resultados. El mecanismo de acción inhibitoria sobre citoquinas no se investigó en este estudio. Se podría presumir que esto pueda deberse a: i) el compuesto se ligue a la citoquina presente en el sobrenadante y esto impida que sea detectada en el ensayo del ELISA como pudo haber ocurrido con NS1; ii) el compuesto señalice el hepatocito sobre la superficie celular y esto resulte en activación de inhibidores de la vía NF $\kappa$ B y AP-1 que dirige la respuesta inflamatoria (Tsai et al. 2011; Conceição et al. 2010); y iii) el efecto inhibitorio del terpeno sobre el VDEN, resulte en que la célula no es señalizada de manera tal que lleve a síntesis y secreción de las citoquinas. Para confirmar el mecanismo del efecto inhibitorio de los terpenos sobre las citoquinas, se requieren experimentos más detallados de biología celular.

#### *Actividad de antibióticos*

Se evaluaron tres antibióticos de uso licenciado para tratamiento de enfermedades como tuberculosis, acné, dermatitis, neumonía, entre otras. La rifampicina resultó con actividad antiviral aunque no-promisoria (CI<sub>50</sub> de 49.7  $\mu$ M e IS entre 3.2 y 4.0) según los parámetros adoptados en este estudio. Al igual que los terpenos, podría actuar en etapas tempranas de la replicación, es decir, ser un inhibidor de entrada o de la síntesis viral. No se encontraron estudios similares para comparar y discutir estos hallazgos. La rifampicina redujo simultáneamente el nivel extracelular de IL-8 y RANTES. El efecto inmunomodulador de este antibiótico es controversial. Se ha planteado que activa receptores de glucocorticoides generando un efecto inmunosupresivo (Tauber & Nau 2008). Al contrario, Yuhas et al. (2011) reportaron que induce mediadores de la inflamación como óxido nítrico e IL-8 en

células HepG2. Se requieren estudios detallados para conocer más precisamente el mecanismo de acción de la rifampicina sobre citoquinas.

La tetraciclina y doxiciclina resultaron no-activos ya que no redujeron la replicación viral a la máxima concentración no-tóxica. La inactividad de tetraciclina también fue reportada por Yang et al. (2007). Al contrario con la doxiciclina, Rothan et al. (2013) y Yang et al. (2007) reportaron actividad a  $CI_{50}$  entre 50 - 55.6  $\mu\text{M}$  en un ensayo con célula animal. Esta concentración resultó tóxica para los hepatocitos humanos usados en este estudio (Tabla 5), por lo que se usaron concentraciones menores que fueron inactivas. Esto podría explicar en parte la diferencia de actividad entre los dos estudios. En el estudio clínico realizado por Castro et al. (2011), se concluyó que el efecto del tratamiento con tetraciclina y doxiciclina se debió a reducción del nivel sérico de IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ . El efecto sobre citoquinas de estos antibióticos no se evaluó en este estudio, esto debido a que resultaron sin actividad antiviral.

La rifampicina y tetraciclina resultaron de baja toxicidad ( $CC_{50}$  entre 131.3 y 215.8  $\mu\text{M}$ ), mientras que la doxiciclina de alta ( $CC_{50}$  menor a 53.2  $\mu\text{M}$ ). No obstante la doxiciclina que resultó tóxica *in vitro* se ha usado ampliamente para tratar enfermedades por varios tipos bacterianos. Así, este es un ejemplo que sugiere la necesidad de confirmar en modelo animal el grado de toxicidad *in vitro* de un compuesto.

## 7. CONCLUSIONES

Los terpenos BC002NO, ES010OL, CI004AL y PC003NO presentaron actividad promisorio contra la infección por el VDEN-2. Redujeron la replicación del virus en hepatocitos humanos ( $CI_{50}$  entre 22.5 y 73.0  $\mu\text{M}$  e IS entre 7.7 y 71.1) y simultáneamente el nivel extracelular de IL-8 (62.4 – 89 %) y RANTES (13.0 – 83.8 %). Estos resultados sugieren que los terpenos podrían ser seleccionados como compuestos base para la invención de un medicamento efectivo para tratamiento del dengue.

La rifampicina inhibió la replicación in vitro del VDEN-2 ( $CI_{50}$  de 49.7  $\mu\text{M}$  e IS de 3.2 y 4.3) y simultáneamente redujo el nivel extracelular de IL-8 (83.2%) y RANTES (83.8%). En consecuencia, ensayos clínicos bien conducidos sobre la eficacia de este antibiótico, podrían aportar al descubrimiento del tratamiento farmacológico efectivo del dengue.

Los resultados sugieren que los terpenos activos podrían interrumpir la entrada del virus al interior de la célula o etapas muy tempranas del ciclo viral. Al parecer, no tienen efecto en etapas tardías como el ensamblaje y la liberación. Se requieren más estudios para precisar en el modo de acción antiviral de la rifampicina.

Los terpenos AF013NO, AG018OL, AN011LO, AT017OL, DC019NA, NE015OL, OL012NO, RC014NA, SC016NA y los antibióticos tetraciclina y doxiciclina fueron inactivos sobre el VDEN-2 según los parámetros adoptados en el estudio. A concentración de 30  $\mu\text{M}$  o menos no redujeron la replicación del virus en hepatocitos humanos o tan solo lo hicieron en máximo 32 %. Se requieren

análisis con otros tipos de ensayos para descartar o confirmar actividad antiviral de estos compuestos.

Los terpenos analizados presentaron baja toxicidad para célula humana hepática y renal ( $CC_{50}$  entre 239.7 y 1600  $\mu\text{M}$ ), bajo los parámetros adoptados en este estudio. Los antibióticos rifampicina y tetraciclina también presentaron baja toxicidad para las mismas células ( $CC_{50}$  entre 131.3 y 215.8  $\mu\text{M}$ ), por el contrario la doxiciclina se consideró tóxica ( $CC_{50}$  entre 51.5 y 53.2  $\mu\text{M}$ ) Se requieren estudios en animales para confirmar la actividad tóxica de estos compuestos.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Abd Kadir SL, Yaakob H, Mohamed Zulkifli R. (2013). Potential anti-dengue medicinal plants: a review. *J Nat Med.* 67(4), 677-689
- Aguilar A, Amin N, Morier L, Pérez EM (2005). Evaluación de la infectividad de cepas de dengue 1 en las líneas celulares HepG2 y Vero. *Rev Cubana Med Trop.* 57(2), 105-110
- Ajariyakhajorn C, Mammen MP, Endy TP, et al. (2005). Randomized, placebo-controlled trial of nonpegylated and pegylated forms of recombinant human alpha interferon 2a for suppression of dengue virus viremia in rhesus monkeys. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(11), 4508-4514
- Alcon-LePoder S, Drouet MT, Roux P, et al. (2005). The secreted form of dengue virus nonstructural protein NS1 is endocytosed by hepatocytes and accumulates in late endosomes: implications for viral infectivity. *J. Virol.* 79(17), 11403-11411
- Alen MM & Schols D (2012). Dengue virus entry as target for antiviral therapy. *J Trop Med.* 2012:628475
- Allard PM, Leyssen P, Martin MT, et al. (2012). Antiviral chlorinated daphnane diterpenoid orthoesters from the bark and wood of *Trigonostemon cherrieri*. *Phytochemistry* (84), 160-168
- Amorim JH, Alves RP, Boscardin SB, Ferreira LC (2014). The dengue virus non-structural 1 protein: risks and benefits. *Virus Res.* 6(181), 153-160

- Astani A, Reichling J, Schnitzler P (2009). Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011:253643
- Astani A, Reichling J, Schnitzler P (2010). Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. *Phytother Res.* 24(5), 673-679
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008). Biological effects of essential oils a review. *Food Chem Toxicol* 46(2), 446-475
- Bente DA & Roco-Hesse R (2006). Models of dengue virus infection. *Drug Discov Today Dis Models.* 3(1), 97-103
- Bente DA, Melkus MW, Garcia JV, Rico-Hesse R (2005). Dengue fever in humanized NOD/SCID mice. *J Virol.* 79(21), 13797-13809
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, et al. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496(7446), 504-507
- Bosch I, Xhaja K, Estevez L, et al. (2002). Increased production of interleukin-8 in primary human monocytes and in human epithelial and endothelial cell lines after dengue virus challenge. *J. Virol.* 76(11), 5588-5597
- Bourjot M, Leyssen P, Eydoux C, et al. (2012). Chemical constituents of *Anacolosa pervilleana* and their antiviral activities. *Fitoterapia* 83(6), 1076-1080
- Brathwaite O, San Martín JL, Montoya RH, et al. (2012). Review: The History of Dengue Outbreaks in the Americas. *Am J Trop Med Hyg.* 87(4), 584-593
- Buret AG. (2010). Immuno-modulation and anti-inflammatory benefits of antibiotics: the example of tilmicosin. *Can J Vet Res.* 74(1), 1-10.

- Canard B (2010). Antiviral Research and Development Against Dengue Virus. Available: [http://denguedrugs.com/docs/Full\\_Length\\_Report.pdf](http://denguedrugs.com/docs/Full_Length_Report.pdf). (Acceso 01 de Julio de 2014)
- Castañeda-Orjuela C, Díaz H, Alvis-Guzman N, et al. (2012). Burden of disease and economic impact of dengue and severe dengue in Colombia, 2011. *Value in health regional issues* 1, 123-128
- Castro JE, Vado-Solis I, Perez-Osorio C, Fredeking TM. (2011). Modulation of cytokine and cytokine receptor/antagonist by treatment with doxycycline and tetracycline in patients with dengue fever. *Clin Dev Immunol.* 2011:370872.
- Clyde K, Kyle JL, Harris E (2006). recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol* 80(23), 11418-11431
- Conceição TM, El-Bacha T, Villas-Boas CS, et al. (2010). Gene expression analysis during dengue virus infection in HepG2 cells reveals virus control of innate immune response. *J. Infect.* 60(1), 65-75
- Cortes FM, Gómez SY, Ocazonez RE (2007). Subtypes of dengue virus serotypes 2, 3 and 4 isolated in Santander District, Colombia. *Rev Cubana Med Trop.* 59(3), 186-192
- Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J. Ethnopharmacol.* 106(3), 290-302
- Crance JM, Scaramozzino N, Jouan A, Garin D (2003). Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic Flaviviruses. *Antiviral Res.* 58(1), 73-79

- De Burghgraeve T, Kaptein SJ, Ayala-Nunez NV, et al. (2012). An Analogue of the Antibiotic Teicoplanin Prevents Flavivirus Entry In Vitro. *Plos One* 7(5), e37244.
- De Clercq E (2010). Strategies for the treatment of dengue virus infections: a narrative account. *Future Med Chem.* 2(4), 601-608
- Diamond MS, Roberts TG, Edgil D, et al. (2000). Modulation of Dengue Virus Infection in Human Cells by Alpha, Beta, and Gamma Interferons. *J Virol.* 74(11), 4957-4966
- Diamond MS, Roberts TG, Edgil D, et al. (2000). Modulation of Dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons. *J Virol.* 74(11), 4957-4966.
- Espada-Murao LA & Morita K (2011). Dengue and Soluble Mediators of the Innate Immune System. *Trop Med Health.* 39(4 Suppl), 53-62
- Fink J, Gu F, Ling L, et al. (2007). Host Gene Expression Profiling of Dengue Virus Infection in Cell Lines and Patients. *PLoS Negl Trop Dis* 1(2), e86.
- Gómez LA, Stashenko E, Ocazonez RE. (2013). Comparative study on in vitro activities of citral, limonene and essential oils from *Lippia citriodora* and *L. alba* on yellow fever virus. *Nat Prod Commun.* 8(2), 249-252.
- Green S & Rothman AL (2006). Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis.* 19(5), 429-436
- Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, et al. (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol,* 8(12 Suppl), S7-16
- Halstead SB, (2012). Controversies in dengue pathogenesis. *Pediatr Int Child Health* 32(1), 5-9.

- Hess C, Means TK, Autissier P, et al. (2004). IL-8 responsiveness defines a subset of CD8 T cells poised to kill. *Blood*. 104(12), 3463-3471
- Igarashi A (1978). Isolation of a single Aedes albopictus cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. *J Gen Virol*. 40(3), 531-544
- Instituto Nacional de Salud (2012). Dengue (Fecha de acceso: 2014, Marzo 4) [en red]. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/paginas/dengue.aspx>
- Julander JG, Perry ST, Shresta S, (2011). Important advances in the field of anti-dengue virus research. *Antivir Chem Chemother*. 21(3),105-116
- Kaptein SJ, De Burghgrave T, Froeyen M, et al. (2010). A Derivate of the Antibiotic Doxorubicin Is a Selective Inhibitor of Dengue and Yellow Fever Virus Replication In vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 12(54), 5269-5280
- Khabar KS, Al-Zoghaibi, Al-Ahdal MN, et al. (1997). The alpha chemokine, interleukin 8, inhibits the antiviral action of interferon alpha. *J Exp Med*. 186(7), 1077-1085
- Kularatne SA (2005). Survey on the management of dengue infection in Sri Lanka: opinions of physicians and pediatricians. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 36(5), 1198-1200
- Kuruvilla JG, Troyer RM, Devi S, Akkina R (2007). Dengue virus infection and immune response in humanized RAG2(-/-)gamma(c)(-/-) (RAG-hu) mice. *Virology*. 369(1), 143-152
- Lei HY, Yeh TM, Liu HS, et al. (2001). Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J Biomed Sci*. 8(5), 377-388
- Lim SP, Wang KY, Noble CG, et al, (2013). Ten years of dengue drug discovery: Progress and prospects. *Antiviral Res*. 100(2), 500-519

- Lin YL, Liu CC, Chuang JI, et al. (2000). Involvement of Oxidative Stress, NF-IL-6, and RANTES Expression in Dengue-2-Virus-Infected Human Liver Cells. *Virology*. 276(1), 114-126
- Linde K, Jonas WB, Melchart D, Willich S (2001). The methodological quality of randomized controlled trials of homeopathy, herbal medicines and acupuncture. *Int J Epidemiol*. 30(3), 526-531
- Lindenbach BD. (2009). Measuring HCV Infectivity Produced in Cell Culture and In Vivo. *Methods in Molecular Biology* (510), 329-336
- Low JS, Wu KX, Chen KC, et al. (2011). Narasin, a novel antiviral compound that blocks dengue virus protein expression. *Antiviral Therapy* 16, 1203-1218.
- Ludert JE, Mosso C, Ceballos-Olvera I, del Angel RM (2008). Use of a commercial enzyme immunoassay to monitor dengue virus replication in cultured cells. *Viol J*. 5:51
- Malavige GN & Ogg G. (2012). Pathogenesis of severe dengue infection. *Ceylon Med J*. 57(3), 97-100
- Marianneau P, Mégret F, Olivier R, et al. (1996). Dengue 1 virus binding to human hepatoma HepG2 and simian Vero cell surfaces differs. *J Gen Virol*. 77(Pt 10), 2547-25554
- Medin CL & Rothman AL (2006). Cell type-specific mechanisms of interleukin-8 induction by dengue virus and differential response to drug treatment. *J Infect Dis*. 193(8), 1070-1077
- Medin CL, Fitzgerald KA, Rothman AL. (2005). Dengue Virus Nonstructural Protein NS5 Induces Interleukin-8 Transcription and Secretion. *J Virol*. 79(17), 11053-11061.

- Meneses R, Ocazonez RE, Martínez JR, Stashenko EE. (2009). Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication in vitro. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 6, 8:8.
- Meneses R, Ocazonez RE, Martínez JR, Stashenko EE. (2009). Essentials oils from seven aromatic plants grown in Colombia: chemical composition, cytotoxicity and in vitro virucidal effect on the dengue virus. *Int. J of Essential Oil Therapeutics* 3, 2 - 7
- Morrey JD, Smee DF, Sidwell RW, Tseng C (2002). Identification of active antiviral compounds against a new york isolate of West Nile virus. *Antiviral Res.* 55(1), 107-116
- Mosso C, Galván-Mendoza IJ, Ludert JE, del Angel RM (2008). endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. *Virology* 378(1), 193-199
- Mota J & Rico-Hesse R (2009). Show clinical signs of dengue fever according to infecting virus genotype. *J Virol.* 83(17), 8638-8645
- Muller DA & Young PR (2013). The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res.* 98(2), 192-208
- Natarajan S (2010). NS3 protease from flavivirus as a target for designing antiviral inhibitors against dengue virus. *Genet Mol Biol.* 33(2), 214-9
- Noble CG, Chen YL, Dong H, et al. (2010). Strategies for development of Dengue virus inhibitors. *Antiviral Res.* 85(3), 450-462
- Ocazonez RE, Cortés FM, Villar LA, Gómez SY (2006). Temporal distribution of dengue virus serotypes in Colombian endemic area and dengue incidence. Re-introduction of dengue-3 associated to mild febrile illness and primary infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 101(7), 725-731

- Ocazonez RE, Meneses R, Torres FA, Stashenko E. (2010). Virucidal activity of Colombian Lippia essential oils on dengue virus replication in vitro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 105(3), 304-309.
- Pajaro-Castro N, Flechas MC, Oliveros-Verbel J, et al. (2014). Acoplamiento molecular in silico de los componentes de aceites esenciales con las proteínas del virus del dengue. BLACPMA. En proceso de publicación.
- Panpanich R, Sornchai P, Kanjanaratanakorn K. (2010). Corticosteroids for treating dengue shock syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. (3), CD003488
- Pearson T, Greiner DL, Shultz LD (2008). Humanized SCID mouse models for biomedical research. *Curr Top Microbiol Immunol*. 324, 25-51
- Pooja C, Amrita Y, Viney C (2014). Clinical implications and treatment of dengue. *Asian Pac J Trop Med*. 7(3), 169-178
- Premaratna R, Jayasinghe KG, Liyanaarachchi EW, et al. (2011). . Effect of a single dose of methyl prednisolone as rescue medication for patients who develop hypotensive dengue shock syndrome during the febrile phase: a retrospective observational study. *Int J Infect Dis*. 15(6), e433-4
- Pushpa R, Nishant R, Navin K, Pankaj G (2013). Antiviral potential of medicinal plants: an overview. *Res. J. Pharm* 4(6), 8 - 16
- R Core Team (2013) [R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.]
- Rajapakse S, Ranasinghe C, Rodrigo C. (2010). Corticosteroid therapy in Dengue Infection – Opinion of Junior Doctors. *J Glob Infect Dis*. 2(2), 199 – 200
- Rathakrishnan A, Wang SM, Hu Y, et al. (2012). Cytokine expression profile of dengue patients at different phases of illness. *PLoS One* 7(12), e52215

- Reed LJ, Muench H. (1938). A simple methods of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 27(3), 493-497
- Reis SR, Sampaio AL, Henriques Md, et al. (2007). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(8), 983-990
- Rothan HA, Mohamed Z, Paydar M, et al. (2013). Inhibitory effect of doxycycline against dengue virus replication in vitro. *Arch Virol.* [Epub ahead of print]
- Rothman AL (2009). T lymphocyte responses to heterologous secondary dengue virus infections. *Ann N Y Acad Sci. Sep*;1171 Suppl 1:E36-41
- Rothman AL, (2010). Cellular immunology of sequential dengue virus infection and its role in disease pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* (338), 83-98
- Sampath A & Padmanabhan R (2009). Molecular targets for flavivirus drug discovery. *Antiviral Res.* 81(1), 6-15
- San Martin JL, Brathwaite O, Zambrano B, et al. (2010). The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg.* 82(1), 128-135.
- Sayce AC, Miller JL, Zitzmann N (2010). Targeting a host process as an antiviral approach against dengue virus. *Trends Microbiol.* 18(7), 323-330
- Shepard DS, Coudeville L, Halasa YA, Zambrano B, Dayan GH, (2011). Economic impact of dengue illness in the Americas. *Am J Trop Med Hyg.* 84(2), 200-207
- Srikiatkachorn A, Wichit S, Gibbons RV, Green S, Libraty DH, et al, (2012). Dengue Viral RNA Levels in Peripheral Blood Mononuclear Cells Are Associated with Disease Severity and Preexisting Dengue Immune Status. *PLoS ONE* 7(12), e51335.

- Stevens AJ, Gahan ME, Mahalingam S, Keller PA (2009). The medicinal chemistry of dengue fever. *J Med Chem.* 52(24), 7911-7926
- Sukathida U & Halstead SB (2010). How Innate Immune Mechanisms Contribute to antibody-Enhanced Viral Infections. *Clin Vaccine Immunol.* 17(12), 1829-1835
- Suksanpaisan L, Cabrera-Hernandez A, Smith DR (2007). Infection of human primary hepatocytes with dengue virus serotype 2. *J Med Virol.* 9(3), 300-307
- Sun P, Kochel TJ (2013). The battle between infection and host immune responses of dengue virus and its implication in dengue disease pathogenesis. *Scientific World Journal.* 2013:843469
- Suttitheptumrong A, Khunchai S, Panaampon J, et al. (2013). Compound A, a dissociated glucocorticoid receptor modulator, reduces dengue virus-induced cytokine secretion and dengue virus production. *Biochem Biophys Res Commun.* 436(2): 283-288
- Talavera D, Castillo AM, Dominguez MC, et al. (2004). IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *J Gen Virol.* 85(Pt 7), 1801-1813
- Tauber SC & Nau R. (2008). Immunomodulatory properties of antibiotics. *Curr Mol Pharmacol.* 1(1), 68-79.
- Teixeira RR, Pereira WL, Oliveira AF, et al. (2014). Natural Products as Source of Potential Dengue Antivirals. *Molecules* 19(6), 8151-8176
- Thomas SJ, Nisalak A, Anderson KB, et al. (2009). Dengue plaque reduction neutralization test (PRNT) in primary and secondary dengue virus infection: how alteration in assay conditions impact performance. *Am J Trop Med Hyg* 81(5), 825-833

- Tsai YT, Chen YH, Chang DM, Chen PC, Lai JH (2011). Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway is crucial in chemokine production from hepatocytes infected by dengue virus. *Exp. Biol Med (Maywood)*, 236(10), 1156-1165
- Watanabe S, Tan KH, Rathore AP, et al. (2012). The magnitude of dengue virus NS1 protein secretion is strain dependent and does not correlate with severe pathologies in the mouse infection model. *J Virol.* 86(10), 5508-5514
- Weaber SC & Vasilakis N (2009). Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol.* 9(4), 523-540
- Whitehorn J., Simmons CP. (2011). The pathogenesis of dengue. *Vaccine* 29, 7221-7228
- World Health Organization (2009). Dengue: guidelines for treatment, prevention and control. (Fecha de acceso: 2014, Marzo 4) [En red]. Disponible en: <http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>
- World Health Organization (2011). Dengue and severe dengue. (Fecha de acceso: 2014, Marzo 4) [En red]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
- Xia M, Huang R, Witt KL, et al. (2008). Compound Cytotoxicity Profiling Using Quantitative High-Throughput Screening. *Environ Health Perspect.* 116(3), 284-291
- Yacoub S., Mongkolsapaya J., Screaton G. (2013). The pathogenesis of dengue. *Curr Opin Infect Dis.* 26(3), 284-289

- Yang JM, Chen YF, Tu YY, et al. (2009). Combinatorial computational approaches to identify tetracycline derivatives as flavivirus inhibitors. *PLoS ONE*. 2(5), e428.
- Zhang XG, Mason PW, Dubovi EJ, et al. (2009). Antiviral activity of geneticin against dengue virus. *Antiviral Res.* 83(1), 21-27.
- Zhang Y, Corver J, Chipman PR, et al. (2003). Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J.* 22(11), 2604-2613
- Castro-Mussot ME, Machain-Williams C, Loroño-Pino MA, Salazar MI. (2013). Respuesta inmune e inmunopatogénesis en las infecciones con el virus del dengue. *Gaceta medica de México* 149(5), 531-540