

Evaluación *in vitro* del efecto virucida e interacciones *in silico* del Lupeol contra los cuatro serotipos del virus Dengue

AUTORES

Laura C. Restrepo-Mendez¹, Maria I. Zapata-Cardona¹, Escudero¹, Marlén M. Gutierrez ^{1*}

AFILIACIONES

1. Grupo de Investigación en Ciencias Animales-GRICA. Universidad Cooperativa de Colombia. Sedes Bucaramanga y Medellín

*Autor correspondencia: marlen.martinezg@campusucc.edu.co

FINANCIACIÓN

Este proyecto financiado por COLCIENCIAS No. 123171249665

Resumen

Introducción: No se encuentra hasta el momento disponible una terapia antiviral o vacuna específica contra el virus del Dengue (DENV). Debido a esto y a la necesidad de continuar con la búsqueda de agentes antivirales contra este virus, el objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* el efecto virucida e interacciones *in silico* del Lupeol, aislado de la planta de la Región Caribe colombiana *Chenopodium ambrosioides*, contra los cuatro serotipos del DENV.

Metodología: Mediante la técnica de MTT se evaluó la viabilidad de células VERO en presencia de Lupeol (7,3- 233,6 μ M). Se evaluó el efecto virucida del Lupeol contra DENV-1 a DENV-4 mediante el ensayo TRANS-tratamiento en células VERO, para lo cual se prepararon mezclas 1:1 de Lupeol (7,3 μ M) y de cada serotipo de DENV (MOI:1). Se utilizó Heparina como control positivo de inhibición y la cepa DENV-2/16681 como cepa de control de inhibición del Lupeol. Finalmente, se recolectaron los sobrenadantes para cuantificar las partículas virales infecciosas y copias genómicas por ensayo de plaqueo y RT-qPCR, respectivamente. Para establecer diferencias nucleotídicas y aminoácidas entre los serotipos de DENV utilizados en este estudio, se hizo secuenciación por Sanger para el gen que codifica para la proteína de Envoltura (E) y alineamiento de las secuencias por el método de Clustal W. Además, se evaluó la interacción del Lupeol con la proteína E de DENV 1-4 mediante docking molecular. Las diferencias estadísticas se identificaron usando t-Student o U de MannWhitney.

Resultados: La viabilidad celular en VERO fue del 94,0 % a concentraciones de 7,3 μ M del Lupeol. El porcentaje de infección en número de copias genómicas fue del 139,6% para DENV-1, 188,2% para DENV-2/16803, 15,6% para DENV-2/16681, 142,7 % para DENV-3 y DENV-4 126,5% respecto al control sin tratamiento. Por otra parte, el porcentaje de infección del número de partículas infecciosas fue del 91,3% para DENV-1, 16,2% para DENV-2/16803, 64,85 % para DENV-2/1668, del 64,8 % para DENV-3 y 35,0% para DENV-4 respecto al control de sobrenadantes de células VERO infectadas sin tratamiento. Se identificaron diferencias y sustituciones en la naturaleza de los aminoácidos que podrían estar relacionadas con el efecto antiviral del Lupeol diferencial para cada serotipo. En los resultados de Docking molecular se obtuvieron energías de unión favorables (-6,8 kcal/mol y 6,9 Kcal/mol) entre el Lupeol y la proteína E de los cuatro serotipos de DENV.

Conclusiones: El efecto antiviral del Lupeol usando la estrategia de TRANS-tratamiento fue dependiente de la cepa y serotipo viral. Lupeol inhibió el número de partículas virales infecciosas de DENV-2/16803, DENV-3 y DENV-4.

Palabras claves: DENV, Lupeol, antiviral, virucida

Introducción

El Dengue es una enfermedad viral aguda causada por el Virus del Dengue (DENV), el cual es transmitido por vectores del género *Aedes*, principalmente *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. Esta enfermedad representa un problema de salud pública, afectando principalmente áreas tropicales y subtropicales alrededor del mundo, en donde el vector se encuentra presente (1) (2) (3). El virus DENV pertenece a la familia Flaviviridae y género *Flavivirus*, y se clasifica en cuatro serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) de acuerdo con las variaciones en el gen de envoltura (E). A su vez, estos serotipos se pueden subdividir en genotipos: cinco para DENV-1, seis para DENV-2, cuatro para DENV-3 y tres para DENV-4 (4-6).

Desde el punto de vista clínico, el dengue se caracteriza por un periodo de incubación entre 3 y 14 días (7) (8) con un amplio espectro de manifestaciones clínicas que incluyen pacientes asintomáticos, pacientes que pueden auto-resolver la infección con un curso no severo o que, en algunos casos, progresan a una etapa grave de la enfermedad (4). En el año 2009, la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó la enfermedad en dengue (con o sin signos de alarma) y dengue grave (8). El dengue sin signos de alarma, común en personas que viven en zonas endémicas, es considerada una enfermedad incapacitante caracterizada por una sintomatología febril inespecífica (cefalea intensa, dolor retro-orbital, mialgias, artralgias y erupciones cutáneas)(9). Por otra parte, las manifestaciones del dengue con signos de alarma son dolor abdominal intenso y continuo, acumulación de líquidos, sangrado de mucosas, vómito y hepatomegalia (9) (4). Finalmente, el paciente puede evolucionar a dengue grave cursando con choque por extravasación del plasma y acumulación de líquido con dificultad respiratoria, sangrado profuso y compromiso grave de órganos, con complicaciones hepáticas y cardíacas (8).

De acuerdo con la OMS, más de cien países son endémicos para esta enfermedad (10). En las Américas se reportaron 2.733.635 casos de dengue y 1.206 muertes para la semana 42 del año 2019 (11). En Colombia, las características geográficas y climáticas, la circulación de los cuatro serotipos del virus del Dengue (DENV 1-4) y presencia del vector en la mayoría de las regiones, permite que la enfermedad sea endémica e hiperendémica para algunas regiones del país. Además, factores como el cambio climático, urbanización no planificada y falta de la calidad en los servicios públicos y

sanitarios, permite que el vector pueda crecer y propagarse a otras zonas geográficas (12). En este contexto, la incidencia del dengue en Colombia es de 103,8 casos por cada 100.000 habitantes (13). El 46,1 % de los casos notificados corresponden a dengue sin signos de alarma, un 52,8 % con signos de alarma, un 1,1 % a dengue grave y 6 defunciones confirmadas (13) (14); siendo Valle del Cauca, Meta, Tolima, Huila, Casanare, Cesar y Santander, los departamentos de Colombia con mayor incidencia, y DENV-1, el serotipo de DENV más predominante en el año 2020 (9) (20).

Por otro lado, DENV es un virus envuelto, con cápside icosaédrica y un genoma RNA (Ribonucleic Acid) monocatenario de polaridad positiva (RNA^{ss} (+)) de una longitud aproximada de 11 Kb. En su extremo 5' (5' UTR-Untranslated Region) tiene una región Cap y en su extremo 3' (3' UTR) no posee la terminación en poliadenilato (AAA). Este genoma codifica para una poliproteína que se cliva en tres proteínas estructurales: Cápside (15), la proteína precursora de Membrana (prM) y la proteína de Envoltura (E) que harán parte de la partícula viral, y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B, NS5) que van a participar en el ciclo replicativo viral (16, 17).

El ciclo replicativo del virus DENV comienza por la interacción de la proteína de Envoltura (E) viral con receptores presentes en la membrana de la célula hospedera. Algunos receptores sugeridos para este virus son el receptor de Manosa (presente en macrófagos), DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin), L- SIGN (Lectina tipo C) presente en hígado y nódulos linfáticos, Heparán-sulfato, receptor de lipopolisacárido (CD14/LPS), entre otros (18, 19). Posterior a esta unión, se da la internalización del virus, principalmente mediante endocitosis dependiente de clatrina (20); sin embargo, también se ha descrito otros mecanismo de entrada como los dependientes de dinámína, por medio de una vía no endocítica clásica, caveolas, independiente de clatrina, por balsas lipídicas y macropinocitosis. Estos mecanismos de entrada dependen del serotipo de DENV y de la célula infectada (21). Para el caso de la endocitosis mediada por clatrina, se forma un endosoma temprano, que posteriormente se transforma en un endosoma tardío, el cual se une con el lisosoma, acidificando el pH de la vesícula. Este cambio de pH permite que haya un cambio estructural en la proteína E favoreciendo la liberación de la nucleocápside al citoplasma (19). Una vez en el citoplasma, se comienza la etapa de replicación del RNA viral en el retículo endoplásmico (15) mediante la formación de complejos de replicación donde la RNA polimerasa dependiente de RNA de DENV (dominio RdRp de la proteína NS5) va a producir una cadena negativa complementaria que va a ser usada como plantilla para la formación del RNA de DENV (1). Además, y debido a que el RNA de

DENV es de cadena sencilla y polaridad positiva, es traducido directamente por los ribosomas en una poliproteína viral que va a ser clivada por proteasas celulares y virales (NS3pro) en tres proteínas estructurales (C, prM y E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B, NS5) (19). El proceso de ensamblaje se da en el retículo endoplásmico con la interacción del RNA genómico y la proteína C junto con pequeñas gotas de lípidos para darse la formación de la nucleocápside. Esta estructura se asocia con las proteínas prM/M y E (ubicadas dentro de la membrana del retículo endoplasmático) y, consecutivamente, se da la organización heterodimérica de las proteínas prM/M y E, dándole un aspecto rugoso a la envoltura viral (partícula viral inmadura). Luego, en la etapa de maduración, la partícula viral transita desde el retículo endoplasmático hasta el aparato de Golgi (regiones *cis* y *trans*), sitio donde producto de la acidificación del pH se induce un reordenamiento de las proteínas presentes en la superficie viral y, por la acción proteolítica de la furina celular sobre la proteína prM, se cliva la prM en pr y M, permitiendo que la proteína E forme homotrimeros que le dan una apariencia lisa a la superficie del virus (partícula viral madura)(19, 22). Finalmente, la partícula viral es liberada al medio extracelular por gemación, adquiriendo de esta forma su envoltura viral (19).

Actualmente, las estrategias de control para Dengue pueden abordarse de tres maneras: el control vectorial, la implementación de vacunas, y los medicamentos antivirales de baja toxicidad (23). Para el control vectorial se cuenta con campañas de fumigación y educación en la comunidad, además de intervenciones biológicas (24). La falta de actualización de las directrices y la no implementación de una evaluación o un seguimiento definido, hace que se desconozca el impacto que tiene actualmente este método de control, llevando que haya un escaso desarrollo de estrategias de control vectorial y por consiguiente la reaparición del mosquito vector y de la enfermedad de las zonas que previamente se había erradicado (23) (25). Además, ha sido autorizada una vacuna (Dengvaxia® CYD-TDV) contra el virus del DENV, aprobada en población de niños mayores de 9 años y adultos hasta la edad de 45 años; sin embargo, hasta el momento no hay suficientes estudios disponibles para soportar la eficacia a largo plazo de dicha vacuna, y la eficacia reportada (del 44,0 %) (26) se considera baja, si se compara con la eficacia de otras vacunas como la del virus de la fiebre amarilla o la del virus de hepatitis B que pueden llegar hasta una eficacia del 95,0 % (26). Sumado a lo anterior, la vacuna puede conllevar al desarrollo de dengue grave si la protección no es adecuada (23). Adicionalmente, hay cinco vacunas más en desarrollo clínico contra el DENV, entre ellas las vacunas propuestas por el Instituto Butantan y los Laboratorios Takeda (27). Por último, no hay un medicamento antiviral

específico disponible contra DENV (23), por lo que el tratamiento se limita a la atención clínica con analgésicos, reposición de líquidos y reposo absoluto del paciente (28, 29).

Por tal razón, durante los últimos años se han realizado investigaciones enfocadas en la búsqueda e identificación de antivirales contra DENV, incluyendo compuestos derivados de plantas (20). Frente a este panorama, y teniendo en cuenta que Colombia presenta una gran variedad de especies vegetales con propiedades farmacológicas, el laboratorio de Investigaciones Fitoquímicas y Farmacológicas de la Universidad de Cartagena, aisló e identificó el Lupeol a partir de *Chenopodium ambrosioides*, una planta recolectada de la Región Caribe colombiana (30) a la que se le ha descrito actividades biológicas como antihelmíntica, antimicrobiana y antifúngica (31) (32). Por su parte, el Lupeol es un triterpeno pentacíclico con una actividad farmacológica demostrada en condiciones *in vitro* e *in vivo* como actividad antiinflamatoria, anticancerígena, antiparasitaria (33) (34) y antiviral contra DENV-2, VHS tipo I y HBV (35, 36). Miembros de nuestro equipo de trabajo previamente han identificado efectos antivirales a partir de extractos de plantas (37) (38) (39), incluyendo el posible efecto virucida *in vitro* del Lupeol contra DENV-2/NG, DENV-2/16681 y CHIKV (40). Con base en estos hallazgos y en la necesidad de identificar un compuesto con actividad antiviral contra los cuatro serotipos de DENV, nos propusimos el objetivo de evaluar *in vitro* el efecto virucida, y las interacciones *in silico* del Lupeol, aislado de la planta de la Región Caribe colombiana *Chenopodium ambrosioides*, contra los cuatro serotipos del virus DENV.

Metodología

Mantenimiento de células

Las células VERO se utilizaron para evaluar la toxicidad y actividad antiviral del Lupeol contra DENV 1 a DENV-4. Esta línea celular, derivada de riñón de *Cercopithecus aethiops*, fue adquirida de American Type Culture Collection (ATCC® CRL-1587™) y se mantuvo en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 2 %, incubada a 37 °C en una concentración de 5 % de CO₂ con humedad relativa.

Virus

Se usaron para las infecciones cuatro cepas de referencia de DENV (DENV 1-4) de la OMS. Para el serotipo DENV-1, se utilizó la cepa WestPac (perteneciente al genotipo IV), para DENV-2 se utilizó la

cepa S16803 (genotipo V), para DENV-3 se utilizó la cepa 16562 (genotipo V) y, por último, para el DENV-4, se utilizó una cepa de Indonesia (genotipo II). Como cepa control DENV-2/16681

Compuesto

El compuesto evaluado fue Lupeol, aislado a partir del extracto de la planta de la Región Caribe colombiana *Chenopodium ambrosioides* por parte del Laboratorio de Investigaciones Fitoquímicas y Farmacológicas de la Universidad de Cartagena (LIFFUC). El stock de trabajo del Lupeol se preparó disolviendo 1 mg en 300 µl de DMSO que fue sometido a sonicación por 4 horas y finalmente se obtuvo una concentración final de 3333 µg/mL (7810,5 µM). El compuesto derivado de la planta *C. ambrosioides* L. está sujeto al Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados No. 130 of 2016 (RGE0176) del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de la República de Colombia.

Ensayo de citotoxicidad en VERO

La citotoxicidad en células VERO se determinó mediante la técnica de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Se sembraron 30.000 células VERO en placas de 96 pozos durante 24 h a 37°C y 5 % de CO₂. Luego, se evaluaron concentraciones de 7,3 a 234,3 µM de Lupeol, que se dejaron en contacto con las células VERO durante 48 horas. Después de este período de incubación, se añadió 0,5 mg/mL de la solución de MTT a las células y se incubó durante 2 h adicionales a 37 ° C. Luego, se añadió dimetilsulfóxido (DMSO) y se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de ELISA. El porcentaje de viabilidad se calculó comparando la absorbancia obtenida de las células expuestas al compuesto con relación a los cultivos de células VERO sin compuesto (control del 100 % de viabilidad). Se realizaron dos unidades experimentales independientes cada uno con 3 réplicas (n=6).

Producción Viral

La producción de los stocks virales de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 se realizó infectando 1,0 x 10⁶ células VERO en botellas de cultivo de 25 cm² con un inóculo de 1 mL de cada serotipo viral y completando a 2 mL con DMEM al 2 % de SBF. Luego, se llevaron a incubación durante 2 h, a 37°C, 5 % CO₂, para después completar a 5 mL con DMEM al 2 % SBF, e incubar nuevamente las células infectadas a a 37°C, 5 % CO₂ durante 7 días en el caso de DENV-1, 8 días para DENV-2, 5 días para DENV-3 y 9 días para DENV-4 hasta evidenciar como efecto citopático, la formación de proyecciones

citoplasmáticas. Para la obtención del sobrenadante de cada serotipo viral, se llevó a centrifugar el contenido de la botella a 2000 rpm, 4°C, durante 10 minutos y luego, el sobrenadante se mezcló con 30% de SBF, y finalmente se almacenaron a -80°C. Se cuantificó el número de partículas virales infecciosas mediante ensayo de plaqueo y el número de copias genómicas por RT-qPCR

Ensayo de la estrategia TRANS-tratamiento

La actividad antiviral del Lupeol contra los cuatro serotipos de DENV se evaluó mediante la estrategia de TRANS-tratamiento en células VERO. Para este ensayo se sembraron 60.000 células VERO/pozo en placa de 48 pozos. Posteriormente se llevó a incubar a 37°C, 5 % CO₂ durante 24h. Luego, se prepararon mezclas 1:1 de Lupeol (7,3 µM) y cada serotipo de DENV (1-4) (MOI:1) y se dejaron incubando una hora a 4°C. Se utilizó la cepa de referencia DENV-2/16681 como control de inhibición del Lupeol, de acuerdo con los resultados obtenidos previamente (40) (artículo en proceso de publicación). Se utilizó además la Heparina (281,6 µM) como control positivo de inhibición de DENV. Luego, se añadieron las mezclas a la monocapa celular y se llevaron a incubar a 37°C, 5 % CO₂ durante 2h. Una vez se completó el tiempo, se remueve el inoculo viral y se agrega medio DMEM al 2 % SFB y se llevó a incubar por 48 horas para finalmente, recolectar los sobrenadantes y almacenarlos a -80 °C. Los sobrenadantes se procesaron por ensayo de plaqueo y RT- qPCR. Para cada caso, se realizaron dos unidades experimentales independientes cada una con tres réplicas (n=6). Los porcentajes de inhibición se calcularon comparando el número de partículas virales infecciosas y número de copias genómicas respecto a sobrenadantes de células infectadas que no fueron tratadas (100,0 % de infección).

Cuantificación viral

Ensayo de plaqueo. Las partículas virales infecciosas de cada serotipo de DENV se cuantificaron mediante ensayo de plaqueo. Para esto se sembraron 100.000 células VERO con medio DMEM al 2 % SFB en 2 placas de 48 pozos y se llevó a incubación a 37° C y 5 % CO₂ por 24 horas. Luego se realizaron las diluciones seriadas de los sobrenadantes de cada condición experimental y se inocularon a las células durante 2 h. Pasado el tiempo de incubación se eliminaron los sobrenadantes y las células se incubaron con 1,5 % de carboximetilcelulosa preparada con DMEM al 2 % de SFB durante 12 días a 37° C+ 5% CO₂. Luego de este tiempo, las monocapas se fijaron con

paraformaldehído al 4,0 % y posteriormente se tiñeron con cristal violeta. Finalmente, las placas se contaron para determinar el número de unidades formadoras de placas (UFP/mL). Cada una de las réplicas se tituló por duplicado.

Cuantificación por RT-qPCR. Los sobrenadantes para cada condición se cuantificaron por RT-qPCR. Para esto, se realizó la extracción y purificación del RNA viral de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante del kit con un kit de extracción Zymo reseach- Quick-RNA™ viral Kit. La calidad y cantidad de RNA se determinó en un espectrofotómetro NANODROP™ ONE/ONEC (Thermo Fisher Scientific®). La síntesis de cADN se realizó con un kit de síntesis de ADNc con el Kit High Capacity cDNA reverse transcription (Thermo Fisher Scientific) según las instrucciones del fabricante. Finalmente, para la amplificación del cDNA de cada uno de los serotipos de DENV se utilizó el kit para la RTq-PCR fue PowerUp™ SYBR r Green Master Mix (Thermofisher Scientific) con los primers específicos dirigidos a la región C-prM de cada uno de los serotipos de DENV (un fragmento de 208 pb para DENV-1, un fragmento de 119 pb para DENV-2, un fragmento de 288 pb para DENV-3, y de 260 pb para DENV- 4). Posteriormente, se corrieron las muestras usando el termociclador QuantStudio 3 Real Time con el siguiente protocolo: 1 ciclo (95°C 5 m), 35 ciclos (95°C 30 s,55°C 45s,72°C 45s), 72 °C (10m), 4 °C (∞) (41).

Alinamiento de las secuencias de la proteína de envoltura de los cuatro serotipos de DENV y DENV-2/16681

Para encontrar similitudes o diferencias que explicaran los resultados obtenidos *in vitro* entre los serotipos de DENV evaluados, se realizó la amplificación y secuenciación del gen que codifica para la proteína de envoltura mediante PCR convencional usando primers previamente reportados (42) y el Kit SuperScript™ III One-Step Rt-PCR System whith Platinum™ Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific). El perfil térmico utilizado fue una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, 40 ciclos de 94°C durante 15 segundos para desnaturalización, entre 50°C a 56°C durante 30 segundos para la hibridación de oligonucleótidos (DENV-1 5X°C, DENV-2 5X°C, DENV-3 5X°C Y DENV-4 5X°C) y 72°C durante 2 minutos, y una extensión final adicional a 72°C por 10 min. Los amplicones obtenidos se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %, posteriormente se purificaron y secuenciaron en Macrogen Inc. (Korea) por el método de Sanger.

Las secuencias obtenidas fueron ensambladas y editados por Seqman PRO (DNASTAR Inc. Software, Madison, WI, USA.) y luego confirmadas en BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) comparando con las referencias de cada serotipo de DENV (LC410183 DENV-1 Th17-087DV1; DENV-2 NC 001474 THA 1964; LC410195 DENV-3 Th17-059DV3; LC410202 DENV-4 Th17-091DV4) depositadas en el GenBank. Esto permitió que se construyera un conjunto de datos que fue alineado mediante el programa CLUSTAL W (43) que se encuentra en el software MEGA (44)

Metodología *in silico*

Se realizó docking molecular para evidenciar las interacciones del Lupeol con la proteína E de DENV-1 a DENV-4. Este proceso inició con la búsqueda de las estructuras cristalográficas de las proteínas virales en la plataforma Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org/>) usando para DENV-1 la cepa 16007 (PDB:4FFY) con una resolución de 2,5 Å, para DENV-2 la cepa Jamaica/1409/1983 (PDB:3UZV) con una resolución de 2.1 Å, para DENV-3 la cepa Filipina/H87/1956 (PDB: 3VTT) con una resolución de 1.7 Å y para DENV-4 la cepa /814669/1981 (PDB:3WE1) con una resolución de 2.278 Å. Las estructuras químicas del Lupeol y Heparina (control positivo de la interacción, reportada previamente contra DENV (45) fueron buscadas en PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). El acondicionamiento de las proteínas blanco se realizó en el Sistema de visualización molecular PyMOL (<https://pymol.org/2/>), en un comienzo para elegir la cadena con la que va a interactuar el ligando (Lupeol) y posteriormente un segundo acondicionamiento en AutoDock Vina para remover aguas (H₂O) y adicionar los Hidrógenos. Por otra parte, el tratamiento del ligando (Lupeol) se realizó en PYMOL y consistió en agregarle torsión a la molécula para que adquiriera flexibilidad. El sitio de interacción se definió utilizando el servidor PeptiMap (<https://peptimap.cluspro.org/>) (tabla 1) y el docking molecular se corrió usando el software AutoDock Vina (<http://autodock.scripps.edu/>). Las energías libres (ΔG) entre cero (0) y -16 Kcal/mol correspondieron a los puntajes de las poses interacción, siendo los mejores puntajes aquellos cercanos a -16 Kcal/mol. Se registraron los puntajes de energías de unión, y los puentes de Hidrógeno que participaron en el acoplamiento usando Ligplot.

Análisis estadístico

Se determinó la normalidad de los datos usando la prueba de Shapiro Wilk, Luego según la normalidad, para los datos con una distribución normal se usó t-Student. Si los datos presentaron una

distribución no normal se hizo U de Mann Whitney. En todos los análisis estadísticos se consideró que $p < 0.05$ tenía una diferencia estadísticamente significativa.

Resultados

Viabilidad de células VERO en presencia de Lupeol

Los porcentajes de viabilidad de células VERO con el Lupeol fueron evaluados a concentraciones de 7,3 a 234,3 μM con la técnica MTT. La concentración de 234,3 μM provocó una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad celular (63,3 %) al compararse con el control de células sin compuesto. Se obtuvo un porcentaje de viabilidad del 94,0 % de células VERO a concentraciones de 7,3 μM del Lupeol. Esta viabilidad fue dependiente de la concentración del compuesto. Se identificó una viabilidad mayor o igual al 80,0 % a concentración de 29,3 μM del Lupeol (figura 1B). Se evaluó además la viabilidad de VERO en presencia de concentraciones de 17,6 a 563,2 μM de Heparina, obteniendo 84,0 % de viabilidad celular para la concentración más alta y una viabilidad celular del 94,30% para la menor concentración (figura 2B).

Actividad antiviral del Lupeol sobre las partículas virales infecciosas de los cuatro serotipos de DENV.

En la estrategia TRANS-tratamiento con Lupeol para DENV-1 se obtuvo un porcentaje de infección del 91,3 % del número de partículas infecciosas sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, t Student) respecto a un control de sobrenadante de células infectadas sin tratamiento (figura 3A). Para DENV-2/16803 se obtuvo un porcentaje de infección del 16,2 % del número de partículas infecciosas, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, t Student) respecto al control de infección sin tratamiento (figura 4A). Para la cepa DENV-2/16681 (cepa de referencia utilizada como control positivo de inhibición) se obtuvo un porcentaje de infección del 64,8 % del número de partículas virales infecciosas con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, t Student) respecto al control de sobrenadante de células infectadas que no recibieron tratamiento (figura 4A). Para DENV-3, el porcentaje de infección fue de 83,1 % del número de partículas virales infecciosas con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, t Student) respecto al control de infección sin tratamiento (figura 5A).

Para el caso de DENV-4, el porcentaje de infección fue de 35,0 % del número de partículas virales infecciosas con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, t Student) respecto al control de infección sin tratamiento (figura 6A).

Se evaluó Heparina mediante la estrategia de TRANS-tratamiento como control positivo de inhibición de DENV. Para DENV-1 se obtuvo un porcentaje de infección del 39,1 % del número de partículas virales infecciosas con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$, t Student) (figura 3A). Para DENV-2/16681, el porcentaje de infección fue del 68,6 % del número de partículas virales infecciosas con diferencias estadísticamente significativa ($p < 0,05$, t Student) (figura 4A). Para DENV-2/16803, el porcentaje de infección fue del 0,0 % con diferencias estadísticamente significativa ($p < 0,05$, t Student) (figura 4A). Para DENV-3, el porcentaje de infección fue de 58,5 % del número de partículas virales infecciosas con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (figura 5A) y finalmente para DENV-4, el porcentaje de infección fue de 25,0 % del número de partículas virales infecciosas con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (figura 6A).

El efecto antiviral del Lupeol fue dependiente de serotipo y cepa viral de DENV en células VERO

En la estrategia de TRANS-tratamiento con Lupeol contra el serotipo DENV-1 se obtuvo un porcentaje de infección del 139,6 % del número de copias genómicas de DENV-1, sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, t Student), respecto al control de sobrenadantes de células infectadas sin tratamiento (figura 3C).

Además, mediante la misma estrategia, para la cepa de DENV-2/16803 se obtuvo un porcentaje de infección del 188,1 % (figura 4D) del número de copias genómicas sin diferencias estadísticamente significativa, mientras que, por el contrario, para la cepa DENV-2/16681 (control de inhibición del virus DENV-2) se obtuvo un porcentaje de infección del 32,4 % con diferencias estadísticamente significativas respecto al control de infección sin tratamiento (figura 4D).

Para el caso de DENV-3, mediante la estrategia de TRANS-tratamiento con Lupeol se obtuvo un porcentaje de infección del 142,7 % del número de copias genómicas, sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, t Student) respecto al control de sobrenadantes de células infectadas sin tratamiento (figura 5C). Finalmente, mediante el tratamiento con Lupeol contra el serotipo DENV-4 se obtuvo un porcentaje de infección del 126,5% del número de copias genómicas, sin diferencias

estadísticamente significativas ($p < 0,05$, t Student), respecto al control de sobrenadantes de células infectadas sin tratamiento (figura 6C).

La Heparina fue utilizada como control positivo de inhibición del número de copias genómicas para los cuatro serotipos de DENV mediante la estrategia de TRANS-tratamiento. Para DENV-1 se obtuvo un porcentaje de infección del 3,0 % del número de copias genómicas (figura 3C). Para DENV-2/16681, el porcentaje de infección fue del 26,7 % (figura 4C), para DENV-2/16803 el porcentaje de infección fue del 8,9 % (figura 4C), para DENV-3, el porcentaje de infección fue de 3,9 % del número de copias genómicas (figura 5C) y para DENV-4 el porcentaje de infección fue del 1,2 %, del número de copias genómicas (figura 6C) con diferencias estadísticamente significativas para todos los virus evaluados ($p < 0,05$, t Student) respecto al control de infección sin tratamiento.

Las interacciones obtenidas por docking molecular entre el Lupeol y las proteínas E de DENV 1 a DENV-4 fueron favorables

Cuando se evaluó la interacción del Lupeol y la proteína E de los cuatro serotipos de DENV, mediante docking molecular, se obtuvo una afinidad de unión del -6.8 ± 0.29 Kcal/mol entre el Lupeol y la proteína E de DENV-1, interacción en la que se formaron interacciones hidrófobas con los aminoácidos Thr359, Thr353, Ile357, Ile352, Asn366, Asn355, Leu321, Val365, Glu368 (tabla 2 y figura 7A). Para la proteína E de DENV-2 se obtuvo una afinidad de unión -6.8 ± 0.0 Kcal/mol con el Lupeol, interacción en la que se formaron dos puentes de Hidrógenos con los residuos del aminoácido Phe337 a una distancia de 2.97 Å y 2,94 Å (tabla 2 y figura 7B). Con la proteína E de DENV-3 y Lupeol se obtuvo una afinidad de unión de -6.9 ± 0.0 Kcal/ mol con la formación de un puente de Hidrógeno con los residuos del aminoácido Leu629 con una distancia de 3.09 Å (tabla 2 y figura 7C). Finalmente, para la proteína E de DENV-4 y Lupeol la afinidad de unión es de -6.9 ± 0.0 Kcal/ mol con formación de un puente de Hidrógeno con los residuos del aminoácido de Ile616 a una distancia de 2.70 Å (tabla 2 y figura 7D).

Alinamiento de la secuencia de la proteína de Envoltura de los cuatro serotipos de Dengue

Al comparar los fragmentos del gen que codifica para la proteína de envoltura de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 que fueron secuenciados respecto a secuencias de referencia para cada serotipo, se obtuvo un porcentaje de identidad del 99.8 % y una cobertura del 100 % para el caso de DENV-1 con la secuencia de referencia (ID de secuencia: U88535.1), un porcentaje de identidad del 97.3 % y una cobertura del 100 % para DENV-2 con relación a la secuencia de referencia (ID de secuencia: GU289914.1). El porcentaje de identidad de serotipo DENV-3 que se envió a secuenciar respecto a la secuencia de referencia (ID de secuencia: KU725665.1) fue del 99.9 %, con una cobertura del 100 % y finalmente, el porcentaje de identidad de serotipo DENV-4 que se envió a secuenciar con la secuencia de referencia (ID de secuencia: KX812530.1) fue del 100 %, con una cobertura del 100%

Al comparar las secuencias de aminoácidos de la proteína de Envoltura de los cuatro serotipos de DENV con secuencias de referencias para cada serotipo viral se obtuvo una variación del 50,1 % de los aminoácidos, para la misma posición de los cuatro serotipos de DENV. Al compararse DENV-1 con los demás serotipos incluyendo la cepa DEN-2/16681, se evidenció que para el dominio I de la proteína de envoltura se obtuvieron 96 cambios en la naturaleza de los aminoácidos (77,4 %), para el dominio II hubo 86 cambios (54,4 %) y para el dominio III, 116 cambios en la naturaleza de los aminoácidos (58,8 %) (figura 9).

De la misma manera al compararse DENV-2/16803 con los demás serotipos se obtuvieron 86 (69,3 %) cambios en la naturaleza de los aminoácidos en el dominio I. Para el dominio II, se obtuvieron 104 (65,8 %) cambios en la naturaleza de los aminoácidos y finalmente para el dominio III, se obtuvieron 97 (49,2 %) cambios en los aminoácidos que generaron cambios en la naturaleza de los aminoácidos. Los anteriores cambios incluyen un aminoácido apolar por un aminoácido polar, aminoácidos aromáticos a aminoácidos polares y viceversa (figura 9)

Para DENV-3, es importante resaltar la presencia de una región GAP desde la posición 155 hasta la posición 157 perteneciente al dominio I, la cual se compartió también con la secuencia de DENV-3 utilizado como referencia (figura 9)

Cuando se comparó DENV-4 con los demás serotipos se obtuvieron 111 (89,5 %) cambios en la naturaleza de los aminoácidos en el dominio I. Para el dominio II, se obtuvieron 120 (75,9 %) cambios

en la naturaleza de los aminoácidos y finalmente para el dominio III, se obtuvieron 153 (79,7 %) cambios en los aminoácidos que generaron cambios en la naturaleza de los aminoácidos (figura 9). Los anteriores cambios incluyen aminoácidos apolares por aminoácidos polares, aminoácidos aromáticos a aminoácidos apolares y viceversa.

Discusión

El comportamiento epidemiológico del Dengue ha venido aumentando a finales del 2019 y comienzos del 2020, reportándose para la primera semana epidemiológica en Colombia un 48,8 % de casos para Dengue, de los cuales el 50,1 % correspondieron a Dengue con signos de alarma y un 1,1 % a Dengue grave (INS,2019). Además, en un estudio publicado recientemente se confirmó la alta y frecuente circulación de DENV en Colombia, una amplia tasa de infección/reinfección y la presencia de los cuatro (4) serotipos de DENV en el país (46). Con base en lo anterior, se ha demostrado la importancia de la evaluación de compuestos comprometedores contra los cuatro serotipos de DENV, línea en la que nuestro grupo de investigación ha incursionado en varios estudios, principalmente enfocados en compuestos derivados de plantas del Caribe colombiano (23).

En este estudio se encontró que el Lupeol, un compuesto aislado de la planta *Chenopodium ambrosioides*, provocó una citotoxicidad en células VERO inferior o igual al 20,0 % a concentraciones menores o iguales a 29,3 μ M (Figura 1B); y en concordancia con lo reportado para otras líneas celulares (células mononucleares de sangre periférica) (47) se obtuvo con Lupeol una disminución de la viabilidad celular dependiente de la concentración (figura 1B).

Los compuestos triterpenoides han sido evaluados como antivirales previamente (48) (32) (35, 49) (50, 51) y, específicamente el Lupeol es un compuesto con actividad antiviral reportada contra DENV-2 (52). El efecto antiviral de este compuesto podría estar relacionado con su similitud estructural con el colesterol, dado que ambos son isoprenoides, que comparten su ruta de biosíntesis hasta el intermediario 2,3- Oxidoescualeno, molécula que de acuerdo con la conformación que adopta puede formar esteroides (como el colesterol) o triterpenoides pentacíclicos (como es el caso del Lupeol) (53). Específicamente, estudios previos han señalado que el Lupeol reduce los niveles de colesterol en forma de LDL en pacientes sanos (54, 55) y, disminuye la secreción de triglicéridos y colesterol en células HepG2 (56). De acuerdo con lo anterior, se podría inferir que el mecanismo antiviral de Lupeol podría relacionarse con la alteración de los niveles de colesterol durante el ciclo replicativo de DENV,

afectando etapas iniciales y posteriores a la entrada de DENV a la célula hospedera (20) en las cuales esta molécula es necesaria.

Para ilustrar esta idea, luego de la unión y la entrada de las partículas virales de DENV se incrementan los niveles de colesterol y la presencia del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLr) en la superficie de la célula infectada (20). Estos receptores se encuentran ubicados en las balsas lipídicas de la membrana plasmática para la entrada de DENV-2 (57). Además, en el proceso de internalización la proteína de envoltura de DENV necesita sitios de unión a la membrana del endosoma que contengan lípidos aniónicos como monoacilglicerol y fosfatidilserina (20). En los complejos de replicación (CR) hay producción de ácidos grasos y síntesis de colesterol, sugiriendo que son necesario para la replicación y ensamblaje de la partícula viral inmadura (20) (58). Además, se ha reportado que el exceso de colesterol en la partícula viral podría aumentar la rigidez de la envoltura, disminuyendo de esta forma, la capacidad infectiva de DENV (57).

En este trabajo se obtuvo un efecto antiviral del Lupeol contra DENV dependiente de serotipo y cepa viral (figuras 3, 4, 5 y 6). Específicamente, mediante la cuantificación del número de copias genómicas presentes en sobrenadantes de células VERO tratadas con Lupeol, se obtuvo un posible efecto virucida contra la cepa DENV-2/16681 (cepa usada como control de inhibición de DENV) mediante la estrategia de TRANS-tratamiento, mientras que para DENV-2/16803, DENV-1, DENV-3 y DENV-4 no se obtuvo inhibición de número de copias genómicas con la misma estrategia antiviral (figura 3C, 4D, 5C, 6C). En contraparte, se obtuvo un efecto antiviral del Lupeol contra DENV-2/16681, DENV-2/16803, DENV-3 y DENV-4 al cuantificar el número de partículas virales infecciosas (figura 4A, 5A, y 6A). Al comparar los resultados para la inhibición de las copias genómicas y partícula viral infecciosa (figuras 3,4,5 y 6), se podría sugerir que el Lupeol podría estar afectando etapas posteriores a la replicación que afectan su capacidad infecciosa, tales como la traducción, ensamblaje, maduración y liberación de partículas virales con capacidad infecciosa de DENV-2/16803, DENV-3 y DENV-4. Teniendo en cuenta estos hallazgos, la hipótesis sugerida para el mecanismo de acción del Lupeol contra DENV podría estar relacionado con la alteración de etapas del ciclo replicativo en que el colesterol es importante (57) y la estrategia antiviral usada durante este estudio, se podría sugerir que, la presencia de Lupeol podría estar provocando un incremento en la rigidez de la envoltura viral, disminuyendo de esta forma, la capacidad infectiva de DENV-2, DENV-3 y DENV-4.

A pesar de que el Lupeol provocó una inhibición de la liberación de partículas virales infecciosas contra DENV-2/16881 y DENV-2/16803, la diferencia en los resultados obtenidos para las copias genómicas entre cepas virales de DENV-2 sugiere que el Lupeol utiliza mecanismos antivirales diferentes para cada cepa viral (figura 4D). Esto se correlaciona con lo reportado previamente en que se ha demostrado que el efecto antiviral *in vitro* de un mismo tratamiento puede variar de acuerdo con la cepa de DENV-2 (39). Además, se ha reportado que la enfermedad causada por la infección por las diferentes cepas de DENV-2 puede diferir. En este sentido, la cepa DENV-2/16681 está relacionada con el desarrollo de dengue grave (59) mientras que otras cepas de este serotipo viral, como DENV-2/NG se relaciona con presentaciones clínicas menos severas (60). Lo anterior se podría correlacionar con lo reportado previamente, quienes identificaron que cambios en la secuencia de nucleótidos entre las diferentes cepas del serotipo DENV-2 podrían estar asociadas con diferencias en el curso de la enfermedad (61). También se ha reportado que en clones distintos de la cepa mexicana de DENV-2 cuando hay un cambio en el aminoácido Asp por His en la posición E-390 genera un cambio estructural en el dominio III de la proteína E, lo que sugiere que este cambio podría estar afectando el tropismo y la virulencia de la cepa infectante (62). Sin embargo, y a pesar de esta información previa, se hace necesario realizar estudios complementarios que permitan establecer las diferencias en el mecanismo antiviral del Lupeol contra las cepas de DENV-2 utilizadas en este trabajo, implementando estrategias como la cuantificación del RNA viral presente en monocapas de VERO tratadas con Lupeol, que ayude a dilucidar un efecto antiviral sobre la replicación viral dependiente de cepa.

Por otro lado, en este trabajo se identificó la actividad antiviral del Lupeol dependiente de serotipo viral (figuras 3,4,5 y 6), lo que se podría relacionar con estudios antivirales contra DENV que han reportado que la actividad antiviral puede variar según el serotipo y célula evaluada (63). Cabe mencionar que, entre los serotipos de DENV existen diferencias en aspectos como las manifestaciones clínicas de la enfermedad, mecanismos de internalización viral y variaciones genéticas (62, 64, 65). Para ilustrar esta idea, clínicamente, se ha establecido que DENV- 2 y DENV-3 tienen un potencial mayor para causar dengue grave, y dentro de estos serotipos el subtipo III de DENV-2 y el subtipo III de DENV-3 son los que más se aíslan de casos severos (64, 65) . Por otra parte, y con relación al mecanismo de internalización, un estudio realizado previamente, se demostró que en células VERO el serotipo DENV-1 ingresa por endocitosis mediada por clatrina, mientras que, DENV-2 utiliza endocitosis no clásica independiente de clatrina, caveolas y balsas lipídicas (66). Además, estudios previos han demostrado variaciones genéticas y por ende cambios aminoacídicos en la proteína E pueden estar

involucrados a la respuesta antiviral, y aspectos en la naturaleza de la infección (62). Similar a lo reportado, en este trabajo, se realizó una comparación de las secuencias de aminoácidos para la proteína E de DENV de los cuatro serotipos, donde se encontraron diferencias y sustituciones en la naturaleza de los aminoácidos que podrían estar implicados en la interacción del Lupeol con DENV, y de esta manera, afectar el efecto antiviral para cada serotipo (figura 9).

Desde otra perspectiva, el docking molecular permite predecir afinidades de unión y la formación de enlaces entre ligandos y proteínas, por lo que se ha convertido en una herramienta útil para estudiar nuevos compuestos con posibles efectos terapéuticos (67). De acuerdo con lo anterior, y de manera complementaria a las estrategias utilizadas *in vitro*, en este trabajo se obtuvieron afinidades de unión favorables para el Lupeol y el dominio III de la proteína E de los cuatro serotipos de DENV usando docking molecular (figura 7, tabla 2). Específicamente, para las interacciones con DENV-2, DENV-3 y DENV-4 se formaron interacciones hidrofóbicas y puentes de Hidrógeno con el Lupeol (figura 6, tabla 1), estas últimas interacciones con una distancia entre 2.5 y 3.5 Å, lo que indica una relevancia biológica (38). La naturaleza de las interacciones formadas podría relacionarse con la estructura del Lupeol (figura 1A) (68) dado que este compuesto tiene una naturaleza apolar que le permite interactuar de manera hidrofóbica con la cadena variable de cada uno de los aminoácidos presentes en la proteína de Envoltura, además de una región polar (OH) que le permite formar interacciones tales como la formación de puentes de Hidrógeno (69).

Cabe mencionar que el dominio elegido para evaluar la interacción del Lupeol con la proteína E de DENV, fue el dominio III, el cual cumple un papel en el reconocimiento e interacción de los virus con los receptores celulares como el receptor de Heparan sulfato o DC-SIGN, por lo que un efecto antiviral sobre este dominio podría afectar el tropismo y la infectividad viral (10). De acuerdo con lo anterior, las afinidades de unión favorables obtenidas mediante docking molecular (figura 7 y tabla 1) se podrían correlacionar con el mecanismo antiviral del Lupeol contra DENV-2, DENV-3 y DENV-4 evidenciado mediante las estrategias *in vitro* (figuras 3,4,5 y 6), sugiriendo como un posible mecanismo antiviral la interacción de este compuesto con el dominio III de la proteína E de DENV-2, DENV-3 y DENV-4, afectando de esta manera la infectividad de la partícula viral de estos serotipos de DENV. Sin embargo, y a pesar de obtenerse una energía de unión favorable por docking molecular en la interacción de DENV-1 con Lupeol (6.8 Kcal/mol) (Tabla 2) y de la formación de interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos de la proteína de Envoltura no se evidenció una actividad antiviral frente a este serotipo,

lo que podría sugerir la importancia de la formación de enlaces tipo puentes de Hidrógeno para establecer un posible efecto antiviral del Lupeol frente a los serotipos de DENV en células VERO.

Es importante mencionar que los ensayos *in vitro* realizados no fueron con partículas virales purificadas, por lo que, aunque los resultados obtenidos sugieren un posible efecto virucida, se hace necesario complementar los resultados obtenidos en este trabajo con otras estrategias antivirales que permitan la identificación del efecto antiviral del Lupeol directamente sobre la partícula viral. Además, se podrían realizar estudios para la evaluación del compuesto sobre etapas iniciales del ciclo replicativo o posteriores a la entrada en células VERO para los cuatro serotipos de DENV evaluados (39, 70). De igual manera, extrapolarlo en otras líneas celulares susceptibles a la infección de los cuatro serotipos como LL-MK2 (células derivadas del riñón de *Macaca mulatta*) o utilizar líneas celulares proveniente de humanos como U937 (línea linfocítica) o Hep-G2 (Línea celular derivada de hepatocarcinoma) (71), ya que se ha descrito que la infección por DENV tiene un comportamiento distinto según el serotipo y la célula blanco (72). Además, se debe complementar con otras metodologías más específicas en la búsqueda del mecanismo antiviral como la evaluación de genoma viral en monocapas, western-blot, microscopía de fluorescencia, entre otros (70).

Conclusiones

Mediante la estrategia de TRANS-tratamiento con Lupeol contra los cuatro serotipos de DENV en células VERO hubo un posible efecto virucida dependiente de cepa y serotipo viral. Lupeol inhibió el número de copias genómicas de DENV-2 /16681 pero no para la DENV-1, DENV-2/16803, DENV-3 y DENV-4, sin embargo, al evaluar las partículas virales con capacidad infectante por medio del ensayo de plaqueo, se obtuvo un efecto antiviral del Lupeol contra DENV-2/16681, DENV-2/16803, y DENV-4. Se hace necesario realizar estudios complementarios para dilucidar el mecanismo de acción diferencial de este compuesto contra los cuatro serotipos de DENV.

TABLAS

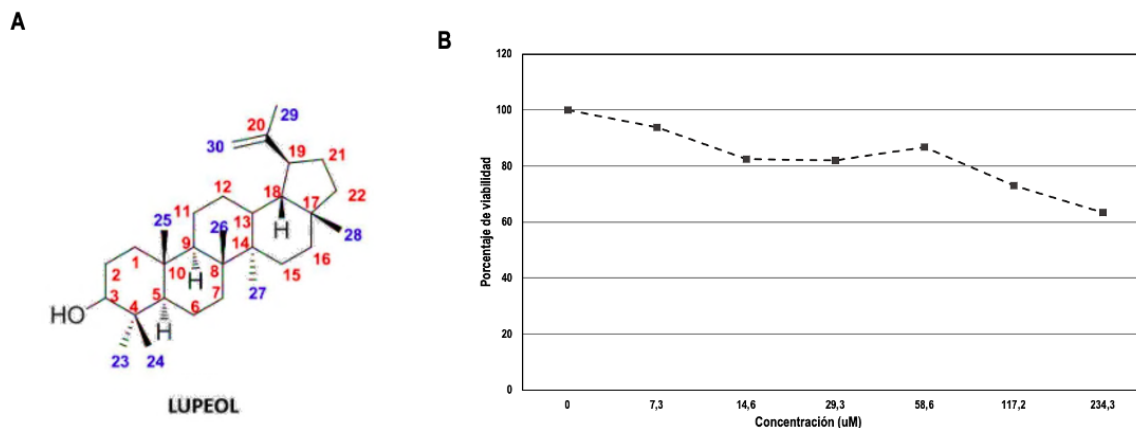
Tabla 1: Sitios de unión predichas por PeptiMap Server y Coordenadas de interacción para las proteínas E.

VIRUS	Sitio de unión (PeptiMap) para la proteína de Envoltura (E)	Coordenadas del sitio de unión en Autodock Vina
DENV-1	Phe337, Ser338, Thr339, Thr346, Gln347, Asn348, Gly349, Arg350, Leu351, Ala369, Glu370, Pro371, Pro372	X: 0.973; Y: -28.531; Z: -1.523
DENV-2	Pro336, Phe337, Glu338, Ile379, Ile380, Gly381, Val382, Gln386	X: -15.6; Y: -3.56; Z: -5.73
DENV-3	Cys580, Lys612, Ile613, Pro614, Phe615, Leu629, Ala632, Asn633, Pro634	X: -22.09; Y: 0.863; Z: 4.998
DENV-4	Met580, Lys613, Val614, Pro61, Ile616, Ile630, Thr634, Pro635	X: 72.32; Y: 60.89; Z: 25.09

Tabla 2: Proteínas blanco utilizadas para evaluar la interacción del Lupeol y Heparina con la proteína E de DENV 1-4 por docking molecular

Serotipo - Cadena A	Ligando	Kcal/mol	Puentes de hidrógeno	Interacción con aminoácidos
DENV-1 (4FFY)	Lupeol	-6.8 ± 0.29	No aplica	Thr359, Thr353 Ile352, Ile357 Asn366, Asn355, Leu321, Val365, Glu368
	Heparina	-5,67 ± 0.096	Phe337 Ile 335 Lys334 Gly349 Thr353 Ser338 Ala354	Pro336 Met301 Phe337 Ile335 Lys334 Arg350 Leu351 Gly349 Thr346 Val379 Ser338
DENV-2 (3UZV)	Lupeol	-6.8 ± 0.0	2 (Phe337)	Pro336, Leu351, Ile335, Lys334, Arg350, Gly349, Val347, Glu338, Phe337, Met301
	Heparina	-4,87 ± 0.095	Glu338 Phe337 Leu351 Val354 Ile352 Lys334	Glu338 Phe337 Met301 Pro336 Arg350 Arg350 Leu351 Val354 Ile352 Pro356 Lys334
DENV-3 (3VTT)	Lupeol	-6.9 ± 0.0	1 (Leu629)	Arg628, Ala632, Leu629, Asn633, Lys612, Met579, Pro634, Phe615, Ile613
	Heparina	-5,67 ± 0.05	Phe615 Gly627 Thr617 His625	Arg628 Leu629 Phe615 Ala632 Pro614 Ile660 Val657 Gly661 Thr617 Ser616 Ala624 Asn626 His625
DENV-4 (3WE1)	Lupeol	6.9 ± 0.0	1 (Ile616)	Ile630, Ile616, Ile631 Val627, Gly628, Ser633, Ser632 Thr634
	Heparina	-6,07 ± 0.12	Thr634 Ser633 Arg629 Lys625 Ile616 Met580 Gly628 Ile 630	Thr634 Lys625 Ile616 Glu617 Met580 Pro615 Ile618 Val626 Gly628 Val627 Ile630 Val627 Ile631

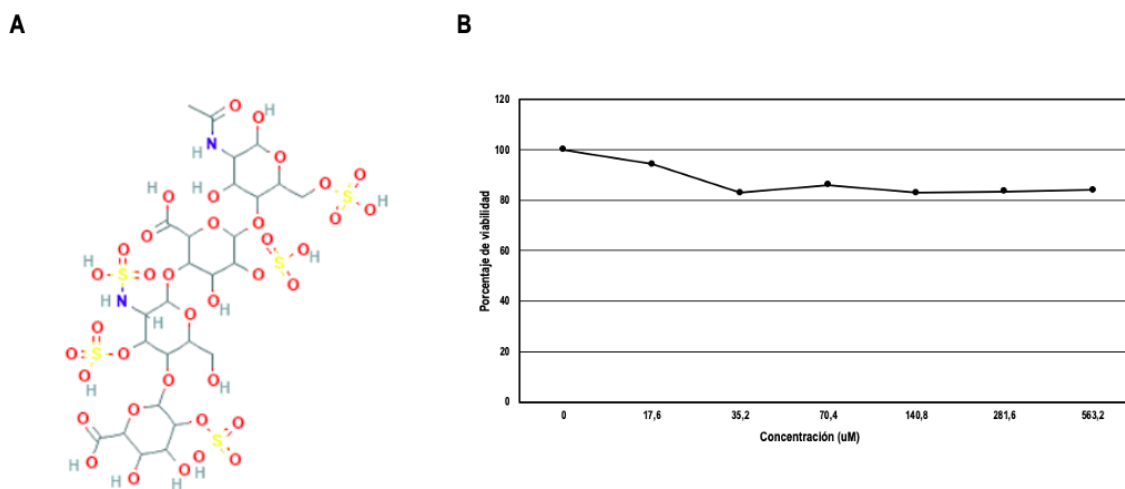
Figura 1



Porcentaje de viabilidad celular del Lupeol en células VERO.

En la figura **A** se representa la estructura del Lupeol diseñado por el Laboratorio de Investigaciones Fitoquímicas y Farmacológicas de la Universidad de Cartagena – LIFFUC. La figura **B** representa los porcentajes de viabilidad de células VERO a concentraciones de 7,3 uM hasta 234,3 uM de Lupeol y de 17,6 uM hasta 553,2 uM de Heparina en comparación con la viabilidad obtenida para el control de células sin compuesto, durante 48 horas de exposición al compuesto

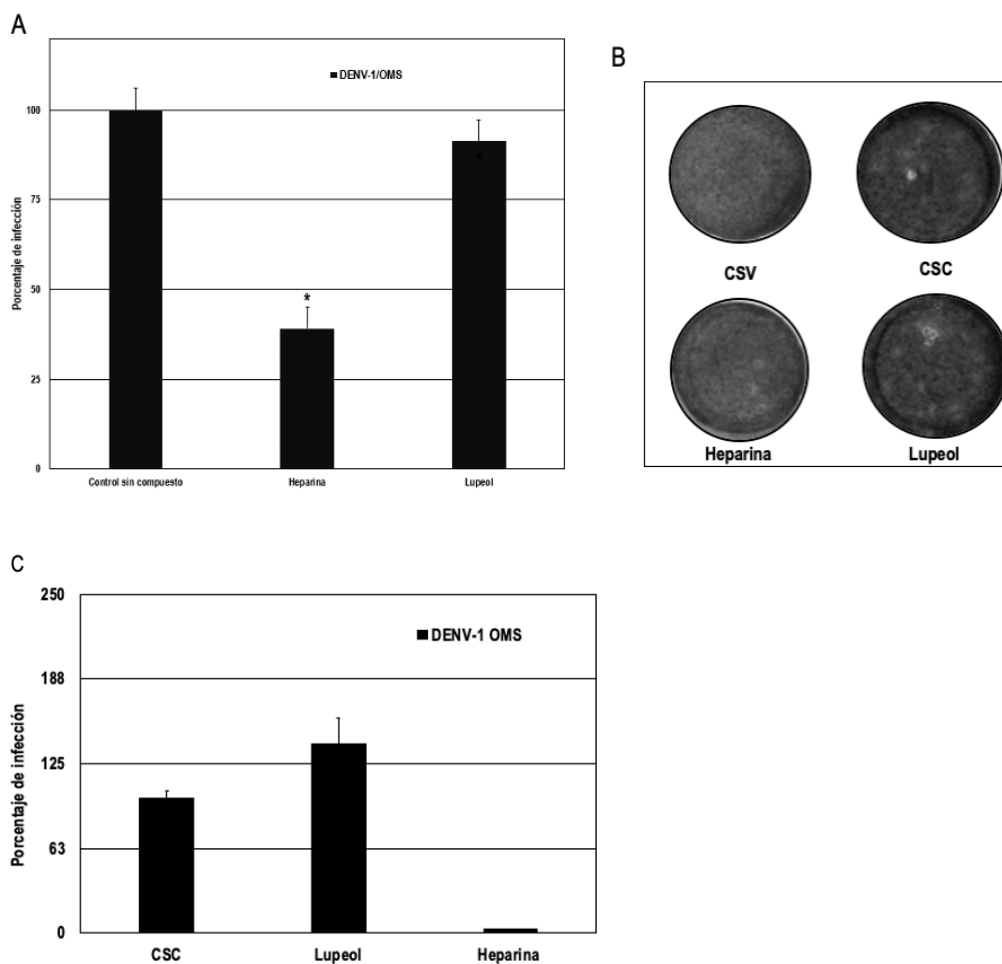
Figura 2



Porcentaje de viabilidad celular del Heparina en células VERO.

En la figura **A** se representa la estructura de Heparina tomada de PubChem. La figura **B** representa los porcentajes de viabilidad de células VERO a concentraciones de 7,3 uM hasta 234,3 uM de Lupeol y de 17,6 uM hasta 553,2 uM de Heparina en comparación con la viabilidad obtenida para el control de células sin compuesto, durante 48 horas de exposición al compuesto

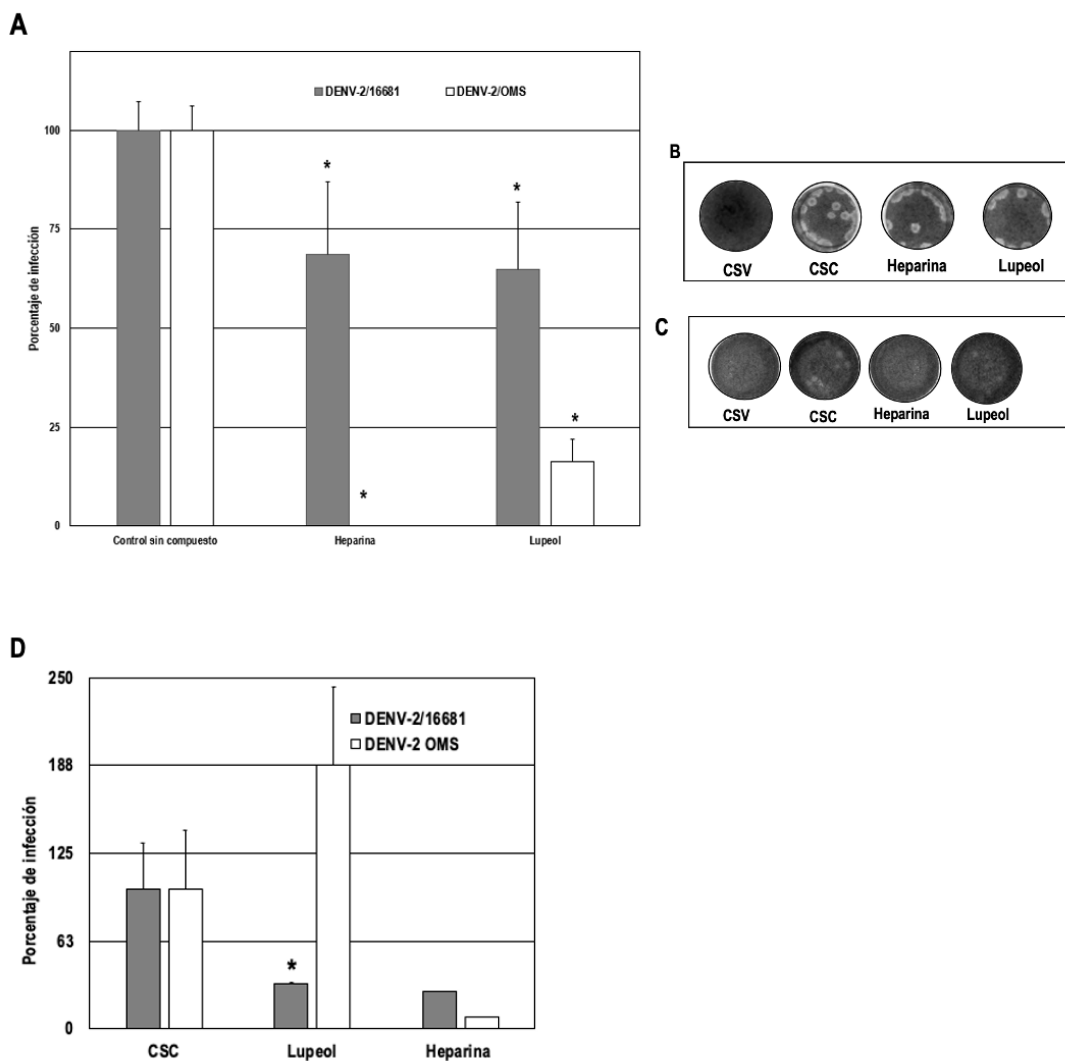
Figura 3



Resultados de la estrategia TRANS-tratamiento de Lupeol contra DENV-1 en células VERO, mediante la cuantificación de partículas virales infecciosas y copias genómicas.

La figura **A** representa los porcentajes de infección del número de partículas virales infecciosas de DENV-1 (cepa WestPac) en células VERO mediante el TRANS-tratamiento del Lupeol. La figura **B** se encuentran las placas representativas de la titulación en células VERO mediante la estrategia TRANS-tratamiento del Lupeol contra DENV-1 (cepa WestPac) (CSV: Control sin virus, CSC: control sin compuesto). La figura **C** representa los porcentajes de infección obtenidos de la cuantificación por RT-qPCR del número de copias genómicas de DENV-1. Los porcentajes se calcularon en comparación con un control de sobrenadantes de células infectadas sin compuesto. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas usando la prueba de t Student.

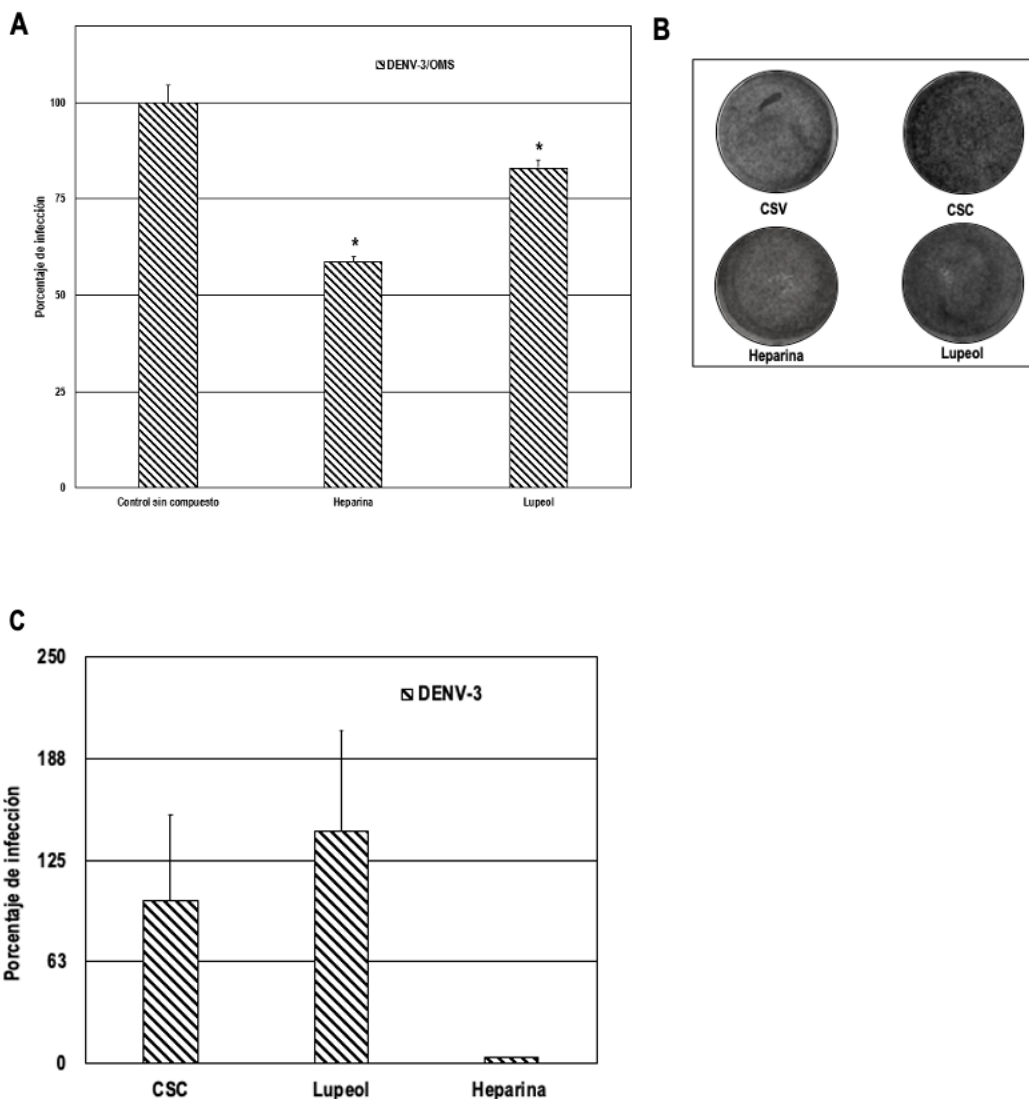
Figura 4



Resultados de la estrategia TRANS-tratamiento de Lupeol contra DENV-2 en células VERO, mediante la cuantificación de partículas virales infecciosas y copias genómicas.

La figura **A** representa los porcentajes de infección del número de partículas virales infecciosas de las cepas DENV-2/16803 y DENV-2/16681 en células VERO mediante el TRANS-tratamiento del Lupeol. La figura **B** se encuentran las placas representativas de la titulación en células VERO mediante la estrategia TRANS-tratamiento del Lupeol contra las cepas DENV-2/16681 y la figura **C** se encuentran las placas representativas de la titulación en células VERO mediante la estrategia TRANS-tratamiento del Lupeol contra las cepas DENV-2/16803 (CSV: Control sin virus, CSC: control sin compuesto). La figura **D** representa los porcentajes de infección obtenidos de la cuantificación por RT-qPCR del número de copias genómicas de las cepas DENV-2/16803 y DENV-2/16681. Los porcentajes se calcularon en comparación con un control de sobrenadantes de células infectadas sin compuesto. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas usando la prueba de t Student.

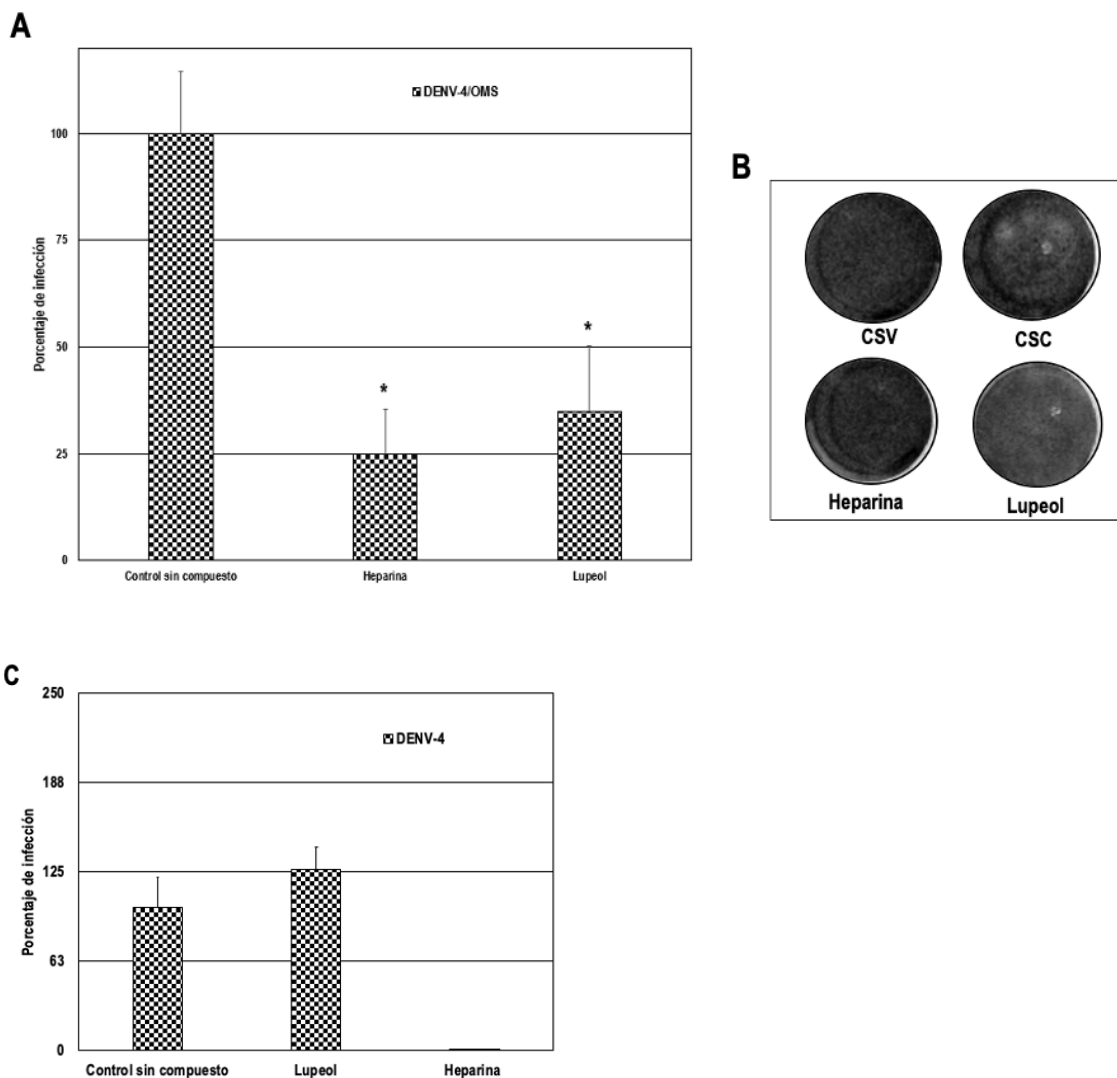
Figura 5



Resultados de la estrategia TRANS-tratamiento de Lupeol contra DENV-3 en células VERO, mediante la cuantificación de partículas virales infecciosas y copias genómicas.

La figura **A** representa los porcentajes de infección del número de partículas virales infecciosas de DENV-3 (cepa 16562) en células VERO mediante el TRANS-tratamiento del Lupeol. La figura **B** se encuentran las placas representativas de la titulación en células VERO de la estrategia TRANS-tratamiento del Lupeol contra DENV-3 (CSV: Control sin virus, CSC: control sin compuesto). La figura **C** representa los porcentajes de infección obtenidos de la cuantificación por RT-qPCR del número de copias genómicas de DENV-3 (cepa 16562). Los porcentajes se calcularon en comparación con un control de sobrenadantes de células infectadas sin compuesto. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas usando la prueba de t Student.

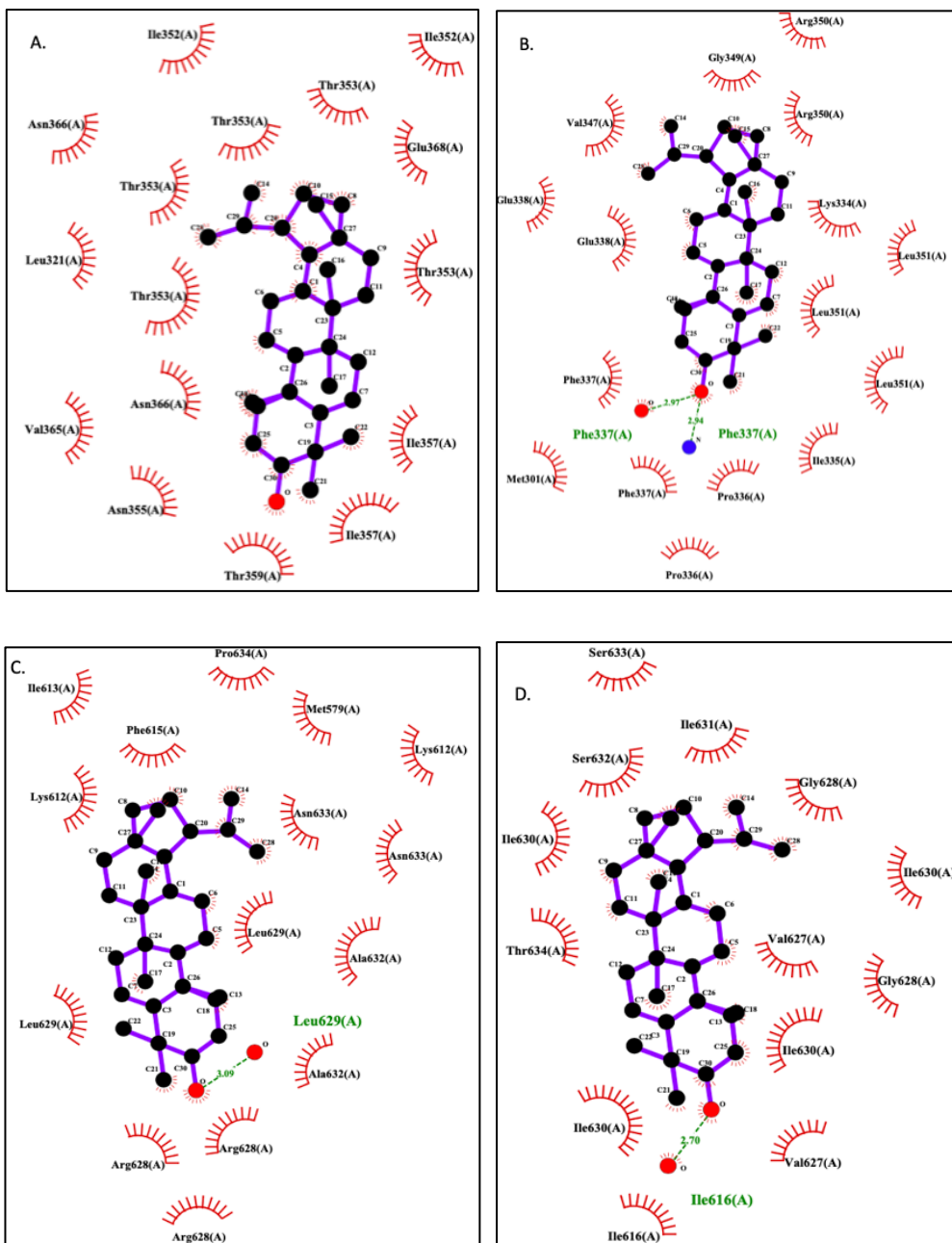
Figura 6



Resultados de la estrategia TRANS-tratamiento de Lupeol contra DENV-4 en células VERO, mediante la cuantificación de partículas virales infecciosas y copias genómicas.

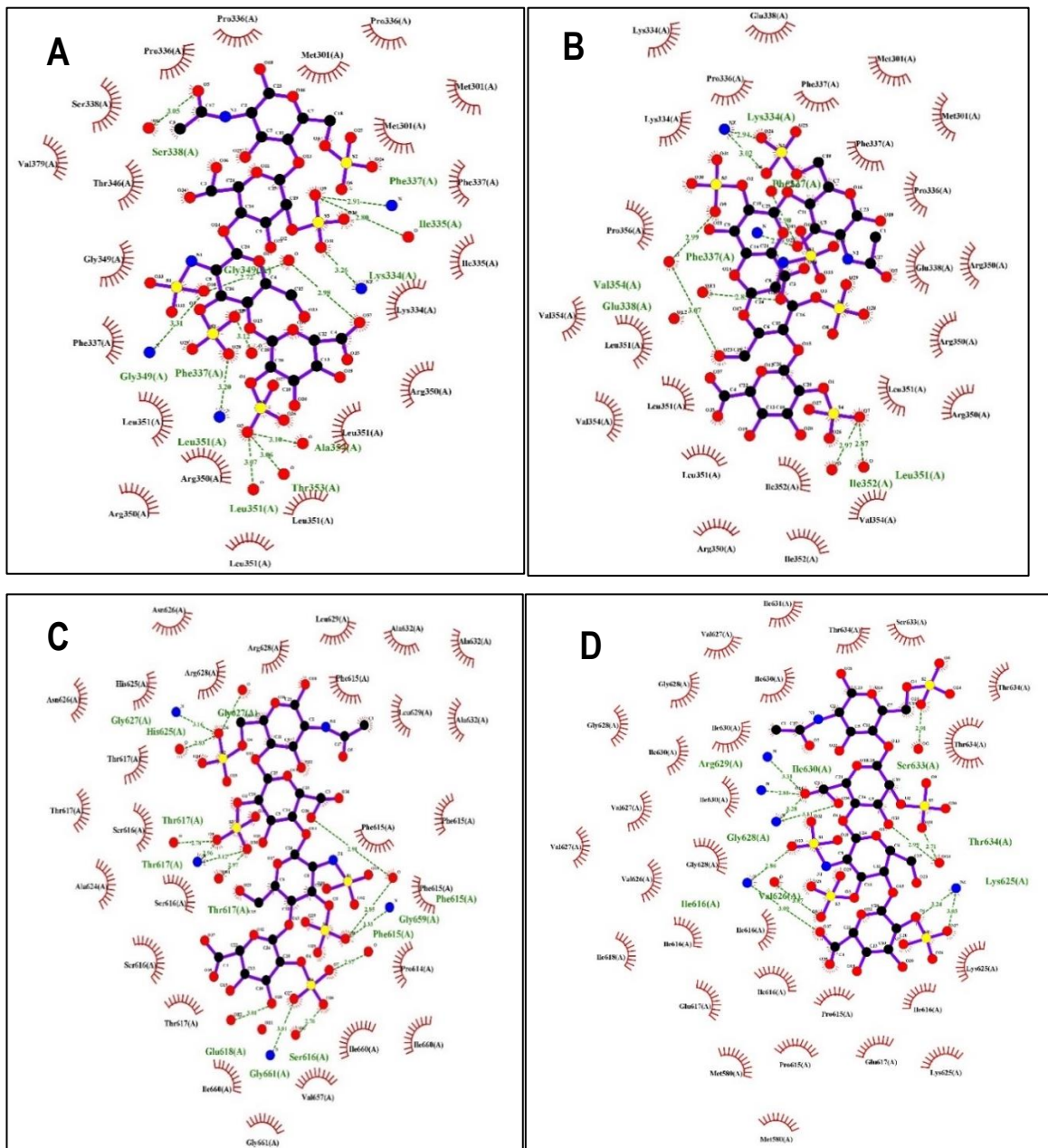
La figura **A** representa los porcentajes de infección del número de partículas virales infecciosas de DENV-4 (cepa Indonesia) en células VERO mediante el TRANS-tratamiento del Lupeol. La figura **B** se encuentran las placas representativas de la titulación de DENV-4 en células VERO mediante la estrategia TRANS-tratamiento con Lupeol (CSV: Control sin virus, CSC: control sin compuesto) La figura **C** representa los porcentajes de infección obtenidos de la cuantificación por RT-qPCR del número de copias genómicas de DENV-1. Los porcentajes se calcularon en comparación con un control de sobrenadantes de células infectadas sin compuesto. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas usando la prueba de t Student.

Figura 7



Resultados de la interacción de la proteína E de DENV 1-4 con Lupeol, por docking molecular. La figura 4 corresponde a la visualización en la interfaz gráfica de Ligplot (vista de representaciones esquemáticas en 2-D de complejos de la proteína E de DENV que participan en la interacción con Lupeol). La figura A corresponde a la interacción de la proteína E de DENV-1 y Lupeol; la figura B corresponde a la interacción de la proteína E de DENV-2 y Lupeol; la figura C corresponde a la interacción de la proteína E de DENV-3 y Lupeol y, finalmente, la figura D corresponde a la interacción de la proteína E de DENV-3 y Lupeol. Los puentes de Hidrógeno se visualizan con un punteado color verde.

Figura 8



Resultados de la interacción de la proteína E de DENV 1-4 con Heparina, por docking molecular. La figura 4 corresponde a la visualización en la interfaz gráfica de Ligplot (vista de representaciones esquemáticas en 2-D de complejos de la proteína E de DENV que participan en la interacción con Lupeol). **La figura A** corresponde a la interacción de la proteína E de DENV-1 y Heparina; **la figura B** corresponde a la interacción de la proteína E de DENV-2 y Heparina; **la figura C** corresponde a la interacción de la proteína E de DENV-3 y Heparina y, finalmente, **la figura D** corresponde a la interacción de la proteína E de DENV-3 y Heparina . Los puentes de Hidrógeno se visualizan con un punteado color verde.

Resultados del alinamiento de la secuencia de la proteína de Envoltura para los cuatro serotipos de Dengue con sus respectivas secuencias de referencias. La figura 5 corresponde a los resultados obtenidos del alinamiento de las secuencias de Envolturas para los cuatro serotipos de DENV por medio del software MEGA X, se observan las posiciones donde hay diferencias entre los aminoácidos presenten en la secuencia de Envoltura para los cuatro serotipos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tamayo Escobar OE, García Olivera TM, Escobar Yéndez NV, González Rubio D, Castro Peraza O. La reemergencia del dengue: un gran desafío para el sistema sanitario latinoamericano y caribeño en pleno siglo XXI. *MediSan*. 2019;23(2):308-24.
2. Moral M. Enfermedades infecciosas Dengue Diagnóstico de Dengue GUIA PARA EL EQUIPO DE SALUD [sitio en internet]. Argentina: Msal. gob. ar; 2013 [Actualizada en 2013; acceso el 01 de mayo de 2016]. 2013.
3. MSPS MDSypS. DENGUE 2017 [Available from: <https://www.minsalud.gov.co/salud/publica/PET/Paginas/dengue.aspx>].
4. Gómez Calderón C. Evaluación in vitro del efecto antiviral de compuestos derivados de plantas de la Región Caribe Colombiana sobre la infección por Virus Dengue y Virus Chikungunya. 2016.
5. MSPS MdSypS. DENGUE 2017 [Available from: <https://www.minsalud.gov.co/salud/publica/PET/Paginas/dengue.aspx>].
6. Amarilla AA, de Almeida FT, Jorge DM, Alfonso HL, de Castro-Jorge LA, Nogueira NA, et al. Genetic diversity of the E protein of dengue type 3 virus. *Virology journal*. 2009;6(1):113.
7. MSPS-FMC MdSyPS-FMC. Dengue Memorias 2013.
8. OPS. Dengue: información general [Available from: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4493:2010-informacion-general-dengue&Itemid=40232&lang=es].
9. INS INDS. Protocolo de vigilancia en Salud publica: DENGUE. 2017.
10. Rodríguez Cruz R. Estrategias para el control del dengue y del *Aedes aegypti* en las Américas. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2002;54(3):189-201.
11. OMS-OPS. Actualización Epidemiológica Dengue 2019 [Available from: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=dengue-2158&alias=50965-11-de-noviembre-de-2019-dengue-actualizacion-epidemiologica-1&Itemid=270&lang=es].
12. INS INDS. Boletín Epidemiológico Semanal 2019:31
13. (OPS) OPdIS. Actualización Epidemiológica: Dengue - 23 de marzo de 2020. 2020.
14. INS INDS. Reporte Epidemiológico de Dengue 2019 [Available from: <https://www.ins.gov.co/Noticias/Paginas/Dengue.aspx>].
15. Németh AH, Kwasniewska AC, Lise S, Parolin Schneckenberg R, Becker EB, Bera KD, et al. Next generation sequencing for molecular diagnosis of neurological disorders using ataxias as a model. *Brain*. 2013;136(10):3106-18.
16. Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Current opinion in microbiology*. 2008;11(4):369-77.
17. Beita Jiménez J, Salazar Arias N, Valverde Gómez M. Patogénesis de la enfermedad por virus del dengue. Revisión de la literatura. *Revista Clínica de la Escuela de Medicina de la Universidad de Costa Rica*. 2016;6(2):11-7.
18. Cruz-Oliveira C, Freire JM, Conceição TM, Higa LM, Castanho MARB, Da Poian AT. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology Reviews*. 2015;39(2):155-70.
19. Velandia M, Castellanos JE. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*. 2011;15(1).
20. Osuna-Ramos JF, Reyes-Ruiz JM, del Ángel RM. The role of host cholesterol during flavivirus infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2018;8.

21. Cruz-Oliveira C, Freire JM, Conceição TM, Higa LM, Castanho MA, Da Poian AT. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS microbiology reviews*. 2015;39(2):155-70.
22. Kostyuchenko VA, Zhang Q, Tan JL, Ng T-S, Lok S-M. Immature and mature dengue serotype 1 virus structures provide insight into the maturation process. *Journal of virology*. 2013;87(13):7700-7.
23. Martínez Gutierrez M. Antiviral effect of compounds derived from the seeds of *Mammea americana* and *Tabernaemontana cymosa* on Dengue and Chikungunya virus infections. 2017.
24. OMS. Estrategias de lucha antivectorial [Available from: https://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/es/]
25. OMS-OPS. Estrategia de Gestión Integrada para la prevención y control del dengue en la Región de las Américas. 2017.
26. da Silveira LTC, Tura B, Santos M. Systematic review of dengue vaccine efficacy. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):750-.
27. OMS. Inmunización, Vacunas y Productos Biológicos [Available from: https://www.who.int/immunization/research/development/dengue_q_and_a/es/]
28. Social MdIP, Salud INd, Salud OPdl. Guía para la atención clínica integral del paciente con dengue. Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional de Salud ...; 2010.
29. Martínez RA. Tratamiento del dengue durante su etapa aguda: revisión sistemática de la literatura. *Infectio*. 2011;12(4).
30. Zavala R, Herrera J, Lara AS, Garzón DL. Evaluación de la toxicidad aguda de un extracto alcohólico de hojas de epazote (*Chenopodium ambrosioides*). *Spei Domus*. 2016;12(24).
31. Jaramillo BE, Duarte E, Delgado W. Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* colombiano. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2012;17(1):54-64.
32. Arboleda D, CAÑAS AL, López A, FORERO JE. Evaluación de la actividad antiviral in vitro de cuatro extractos de las especies *Caryodendron orinocense* y *Phyllanthus niruri* de la familia Euphorbiaceae contra los virus Herpes Bovino tipo 1 y Herpes Simplex tipo 2. *Vitae*. 2007;14(1):55-60.
33. Mbaveng AT, Hamm R, Kuete V. Harmful and protective effects of terpenoids from African medicinal plants. *Toxicological survey of African medicinal plants: Elsevier*; 2014. p. 557-76.
34. Saleem M. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer letters*. 2009;285(2):109-15.
35. Navid MH, Laszczyk-Lauer M, Reichling J, Schnitzler P. Pentacyclic triterpenes in birch bark extract inhibit early step of herpes simplex virus type 1 replication. *Phytomedicine*. 2014;21(11):1273-80.
36. Parvez MK, Rehman MT, Alam P, Al-Dosari MS, Alqasoumi SI, Alajmi MF. Plant-derived antiviral drugs as novel hepatitis B virus inhibitors: Cell culture and molecular docking study. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2019;27(3):389-400.
37. Gómez-Calderón C, Mesa-Castro C, Robledo S, Gómez S, Bolivar-Avila S, Diaz-Castillo F, et al. Antiviral effect of compounds derived from the seeds of *Mammea americana* and *Tabernaemontana cymosa* on Dengue and Chikungunya virus infections. *BMC complementary and alternative medicine*. 2017;17(1):57.
38. Trujillo-Correa AI, Quintero-Gil DC, Diaz-Castillo F, Quiñones W, Robledo SM, Martínez-Gutierrez M. In vitro and in silico anti-dengue activity of compounds obtained from *Psidium guajava* through bioprospecting. *BMC complementary and alternative medicine*. 2019;19(1):298.
39. Hernández-Castro C, Diaz-Castillo F, Martínez-Gutierrez M. Ethanol extracts of *Cassia grandis* and *Tabernaemontana cymosa* inhibit the in vitro replication of dengue virus serotype 2. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2015;5(2):98-106.

40. Zapata MI. Actividad antiviral in vitro e interacciones In silico de Triterpenos pentacíclicos aislados de *Chenopodium ambrosioides* frente a la infección por virus Zika, Chicungunya y Dengue. Universidad Cooperativa de Colombia 2020.
41. Quintero-Gil DC, Uribe-Yepes A, Ospina M, Díaz FJ, Martínez-Gutiérrez M. Differences in the replicative capacities of clinical isolates of dengue virus in C6/36 cells and in urban populations of *Aedes aegypti* from Colombia, South America. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2018;22(4):257-72.
42. Domingo C, Niedrig M, Teichmann A, Kaiser M, Rumer L, Jarman RG, et al. 2nd International external quality control assessment for the molecular diagnosis of dengue infections. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4(10).
43. Larkin M, Blackshields G, Brown N, Chenna R, McGettigan P, McWilliam H. Clustal W and Clustal X version 2.0 *Bioinformatics* 2007; 23: 2947–2948. PMID.
44. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*. 2013;30(12):2725-9.
45. Talarico LB. La entrada del virus dengue a la célula como un potencial blanco antiviral: estudio de polisacáridos sulfatados como antivirales. *Química Viva*. 2008;7(2):113-33.
46. Velandia-Romero ML, Coronel-Ruiz C, Castro-Bonilla L, Camacho-Ortega S, Calderón-Peláez MA, Castellanos A, et al. Prevalence of dengue antibodies in healthy children and adults in different Colombian endemic areas. *International Journal of Infectious Diseases*. 2020;91:9-16.
47. Dupuy OA, Bonilla JA, Murillo R, Taylor P, Abad MJ, González L, et al. Efecto in vitro de los terpenos lupeol y casearina G sobre células sanguíneas y tumorales. *Revista médica de Chile*. 2013;141(9):1150-7.
48. Villamizar VEM, Caballero JMÁ, Gómez HS. Terpenos con actividad biológica anti-VIH. *Duazary*. 2010;7(2):257-73.
49. Tabares P, Avila L, Torres F, Cardona D, Quiñones W, Forero JE, et al. Metabolitos secundarios y efectos antivirales de algunas especies de la familia Euphorbiaceae. *Scientia et Technica*. 2007;1(33).
50. Joycharat N, Greger H, Hofer O, Saifah E. Flavaglines and triterpenoids from the leaves of *Aglaia forbesii*. *Phytochemistry*. 2008;69(1):206-11.
51. Cichewicz RH, Kouzi SA. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Medicinal research reviews*. 2004;24(1):90-114.
52. Silva FC, RODRIGUES VG, Duarte LP, Lula IS, Sinisterra RD, Vieira-Filho SA, et al. Antidiarrheal activity of extracts from *Maytenus gonoclada* and inhibition of Dengue virus by lupeol. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2017;89(3):1555-64.
53. Zhao L, Chang W-c, Xiao Y, Liu H-w, Liu P. Methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Annual review of biochemistry*. 2013;82:497-530.
54. Sudhahar V, Kumar SA, Sudharsan PT, Varalakshmi P. Protective effect of lupeol and its ester on cardiac abnormalities in experimental hypercholesterolemia. *Vascular pharmacology*. 2007;46(6):412-8.
55. Sudhahar V, Kumar SA, Varalakshmi P. Role of lupeol and lupeol linoleate on lipemic-oxidative stress in experimental hypercholesterolemia. *Life sciences*. 2006;78(12):1329-35.
56. Itoh M, Hiwatashi K, Abe Y, Kimura F, Toshima G, Takahashi J, et al. Lupeol reduces triglyceride and cholesterol synthesis in human hepatoma cells. *Phytochemistry Letters*. 2009;2(4):176-8.
57. Lee C-J, Lin H-R, Liao C-L, Lin Y-L. Cholesterol effectively blocks entry of flavivirus. *Journal of virology*. 2008;82(13):6470-80.

58. Soto-Acosta R, Mosso C, Cervantes-Salazar M, Puerta-Guardo H, Medina F, Favari L, et al. The increase in cholesterol levels at early stages after dengue virus infection correlates with an augment in LDL particle uptake and HMG-CoA reductase activity. *Virology*. 2013;442(2):132-47.
59. Wu-Hsieh BA, Yen YT, Chen HC. Dengue hemorrhage in a mouse model. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009;1171:E42-E7.
60. Snow GE, Haaland B, Ooi EE, Gubler DJ. Research on dengue during World War II revisited. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2014;91(6):1203-17.
61. Pandey BD, Igarashi A. Severity-related molecular differences among nineteen strains of dengue type 2 viruses. *Microbiology and immunology*. 2000;44(3):179-88.
62. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, Ramos C, et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *Journal of virology*. 1999;73(6):4738-47.
63. Talarico L, Pujol C, Zibetti R, Faria P, Nosedá M, Duarte M, et al. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antiviral research*. 2005;66(2-3):103-10.
64. Cortés FM, Gómez SY, Ocazone RE. Subtipos de virus dengue serotipos 2, 3 y 4 aislados en el Departamento de Santander, Colombia. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2007;59(3):0-.
65. Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Advances in virus research*. 2003;59:315.
66. Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. *Cellular microbiology*. 2009;11(10):1533-49.
67. Velásquez M, Drosos J, Gueto C, Márquez J, Vivas-Reyes R. Método acoplado Autodock-PM6 para seleccionar la mejor pose en estudios de Acoplamiento Molecular. *Revista Colombiana de Química*. 2013;42(1).
68. Gallo MB, Sarachine MJ. Biological activities of lupeol. *Int J Biomed Pharm Sci*. 2009;3(1):46-66.
69. Britannica TEoE.
Hydrogen bonding [Available from: <https://www.britannica.com/science/hydrogen-bonding>.
70. Jung E, Nam S, Oh H, Jun S, Ro H-J, Kim B, et al. Neutralization of Acidic Intracellular Vesicles by Niclosamide Inhibits Multiple Steps of the Dengue Virus Life Cycle In Vitro. *Scientific reports*. 2019;9(1):1-12.
71. Barr KL, Anderson BD, Heil GL, Friary JA, Gray GC, Focks DA. Dengue serotypes 1–4 exhibit unique host specificity in vitro. *Virus Adaptation and Treatment*. 2012;4(1):65-73.
72. Alen MM, Schols D. Dengue virus entry as target for antiviral therapy. *Journal of tropical medicine*. 2012;2012.