

# Evaluación del efecto virucida *In vitro* e interacción *In silico* de la Voacangina contra los cuatro serotipos del Virus del Dengue

Nombres: Estiven Hernández-Mira<sup>1</sup>, Marlen Martínez-Gutiérrez<sup>2</sup>, Laura Milena Monsalve-Escudero<sup>3</sup>.

Grupo de Investigación en Ciencias Biológicas y Animales (GRICA) - Universidad Cooperativa de Colombia / estudiante de Microbiología y bioanálisis, Universidad de Antioquia, Medellín - Colombia.

e-mail: [marlen.martinezg@campusucc.edu.co](mailto:marlen.martinezg@campusucc.edu.co)

## RESUMEN

**Introducción:** El virus Dengue (DENV) se clasifica en cuatro serotipos antigénicamente diferentes y es transmitido por la picadura de mosquitos hembra del género *Aedes*, las cuales se encuentran distribuidas en áreas tropicales y subtropicales. Actualmente, no existe un antiviral específico licenciado para el tratamiento del Dengue enfermedad producida por este virus por lo que la búsqueda de compuestos de origen natural que puedan tener un efecto antiviral, se ha convertido en una línea de investigación importante en los últimos años. Recientemente se ha demostrado la actividad antiviral de la Voacangina aislada de *Tabernaemontana cymosa* (*T. cymosa*) sobre la cepa NG del DENV serotipo 2 (DENV-2) por lo que el objetivo en este trabajo fue evaluar la actividad virucida frente a los otros serotipos *in vitro* y determinar las interacciones *in silico* con la proteína estructural de envoltura (E).

**Objetivo General:** Evaluar el potencial virucida *in vitro* e interacciones *in silico* de la Voacangina contra cuatro serotipos del DENV.

**Metodología:** Se evaluó la citotoxicidad de la Voacangina por la técnica de MTT en células VERO. Se determinó el posible efecto virucida a través de la estrategia de TRANS tratamiento en una proporción de 1:1 de compuesto y virus a MOI 1 frente a cepas de referencia OMS DENV-1/WestPac, DENV-2/S16803, DENV-3/16562 y DENV-4/Indonesia – 1976; la cepa DENV-2/NG se usó como virus control positivo de inhibición. Se cuantificó el número de partículas virales infecciosas liberadas por técnica de plaqueo y copias genómicas liberadas con RT-qPCR. *In silico* se evaluó la interacción mediante acoplamiento molecular de Voacangina (PubChem ID: 73255) y la proteína de envoltura (E) de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 con ID PDB 4FFY, 3UZV, 3VTT y 3WE1 respectivamente. Se realizó un análisis de secuencias nucleotídicas codificantes de proteína E de los diferentes serotipos DENV mediante alineamiento y estimaciones de divergencia.

**Resultados:** Se obtuvo una viabilidad en células VERO de 84,8% a la mínima concentración evaluada (8,4  $\mu\text{M}$ ) del alcaloide indólico, la cual decreció hasta 34,9% a la máxima concentración evaluada (271,4  $\mu\text{M}$ ). La Voacangina a 17,4  $\mu\text{M}$  inhibió partículas virales infecciosas de DENV-2/NG en 81,5%; para las cepas OMS se obtuvo una inhibición dependiente de serotipo, siendo para DENV-1 de 51,54%, para DENV-2 de 67,61%, para DENV 3 y DENV-4 no hubo inhibición significativa. Los porcentajes de inhibición de copias genómicas liberadas para cepas OMS DENV-1 fue de 7,4%, mientras que para DENV-2, DENV-3 y DENV-4 fueron de 0%, y para DENV-2/NG de 52,4%. Los resultados *in silico* arrojaron energías libres de unión favorables para la proteína E de cada serotipo de DENV que oscilaron entre -5,6 y -6,4 Kcal/mol. Se determinaron divergencias de secuencias codificantes cercanas al 30% para la proteína E de cada serotipo viral y se identificaron múltiples cambios de naturaleza aminoacídica para la secuencia codificante de la proteína E de cada Serotipo de DENV.

**Conclusión:** Los resultados obtenidos demuestran un posible efecto virucida de la Voacangina selectiva dependiendo del serotipo (siendo antiviral solo para DENV-1 y DENV-2), lo que puede ser debido a los cambios aminoácidos de la proteína E. Se confirma el posible efecto virucida del alcaloide frente DENV-2/NG, previamente reportado. Las diferencias nucleotídicas de la proteína E de cada serotipo de DENV 1-4 aún conservan cerca del 70% de similitud entre las secuencias y un 30% y que el porcentaje diferencia entre el mismo serotipo puede ir desde un 3-8% aproximadamente de según dictan estudios previos.

**Perspectivas:** Futuros estudios podrían complementar los resultados aquí mostrados al cuantificar genoma intracelular para tener un mejor panorama del posible mecanismo de acción de la Voacangina y extrapolar los hallazgos a células de origen humano.

**PALABRAS CLAVE:**

Alcaloide indólico, DENV, *Tabernaemontana cymosa*, Virucida, Voacangina.

## 1. INTRODUCCIÓN

El dengue es una arbovirosis que ha provocado epidemias en zonas tropicales y subtropicales del mundo (Arredondo-García et al., 2016). La enfermedad viral es causada por el Virus Dengue (DENV) perteneciente a la familia *Flaviviridae* y al género *flavivirus*, el cual es transmitido de un huésped vertebrado a otro por la picadura de los mosquitos hematófagos hembras (Franz et al., 2015; Kean et al., 2015), siendo *Ae. aegypti* el vector más común, ya que éste se encuentra más adaptado a áreas urbanizadas. Sin embargo, *Ae. Albopictus* es el vector principal en Asia y se ha reportado en algunas zonas en nuestro territorio (Nuckols et al., 2015).

A nivel mundial, el Dengue es la arbovirosis más importante, con epidemias registradas en más de 100 países en Asia, África y América (Villar et al., 2015). Entre los años 1779 a 1780 se registraron las primeras epidemias del Dengue en estas regiones y en el año 1907 se demostró la etiología viral del Dengue (Acosta et al., 2014). En el continente Americano, el 99% de los casos de Dengue se presenta en el cono sur (PAHO/WHO, 2019). De acuerdo al consolidado de los reportes de casos, entre el año 2019 en el continente americano, Colombia ocupa el cuarto lugar en incidencia y en mortalidad por casos sospechosos de Dengue presentando circulación de los serotipos DENV 1, DENV-2 y DENV-3 (PAHO/WHO, 2019). En Colombia, la presencia de la enfermedad en los últimos años se ha intensificado y para la semana epidemiológica 01 de 2020 se notificaron 1069 casos probables de dengue, 522 (48,9 %) sin signos de alarma, 536 (50,1 %) con signos de alarma y 11 (1,0%) de dengue grave (INS, 2020). Estudios indican que aproximadamente 25 millones de personas de las áreas urbanas están en riesgo de contraer la enfermedad, siendo Medellín una de las ciudades colombianas catalogadas como hiperendémica para el Dengue, debido a que en ella circulan los cuatro serotipos del virus, lo que ha conllevado a un registro constante de casos en los últimos cinco años con una tendencia al incremento. De igual forma, el número de personas afectadas menores de 15 años ha aumentado, reportándose a su vez casos de Dengue grave; tanto así que, en el 2016, ocurrió en la ciudad una epidemia comparable con la del 2010, en la cual se reportaron algo más de 17.000 casos de Dengue.

A nivel estructural, el DENV es un virus envuelto con simetría icosaédrica, posee un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva (longitud aproximada de 10.7 Kb) (Kuhn et al., 2002). El genoma codifica para una única poliproteína viral que da lugar a tres proteínas estructurales, Cápside (C), Pre-Matrix / Matrix (prM / M) y Envoltura (E) y a siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). Cada una de estas proteínas cumple funciones importantes durante la entrada y la replicación viral en la célula

huésped (Perera and Kuhn, 2008). Se han descrito cuatro serotipos antigénicamente diferentes que pueden co-circular en una misma zona (zonas hiperendémicas)(Nisalak et al., 2003; Villar et al., 2015; Wang et al., 2000). Esta situación aumenta el riesgo de desarrollar Dengue grave, enfermedad que incluye signos de alarma como hemorragias, fuga plasmática y daño multiorgánico, lo cual, si no se controla adecuadamente, puede llevar a la muerte.

Para el proceso de infección de DENV se han descrito cuatro rutas de entrada bien definidas: fagocitosis, macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolinas (Acosta et al., 2008). La interacción del virus - célula se da por diferentes receptores descritos en la literatura (DC-SIGN, Manosa, GRP78, Laminina, Heparan sulfato, Hsp: proteína de choque térmico, los cuales varían según el tipo celular al cual se adhiera el virus (Acosta et al., 2008; Hidari and Suzuki, 2011; Velandia and Castellanos, 2011). El ciclo replicativo del virus inicia cuando los receptores celulares interactúan con la proteína E, promoviendo una endocitosis, las variaciones de pH desencadenan la fusión de la membrana endosomal con fusión de la envoltura viral, generando así la liberación de la nucleocápside que contiene el ARN viral unido a la proteína C en el citoplasma. (Perera and Kuhn, 2008; Rodenhuis-Zybert et al., 2010; Velandia and Castellanos, 2011). Después de las interacciones tempranas y su posterior liberación al citoplasma, se lleva a cabo un ciclo replicativo completo, que termina con la liberación de la progenie viral por gemación (Perera and Kuhn, 2008; Rodenhuis-Zybert et al., 2010; Velandia and Castellanos, 2011).

Hasta la fecha, las estrategias de control se centran en tres frentes (WHO, 2012). El primero es el control vectorial a través de la educación comunitaria, eliminando los sitios de reproducción con fumigación e intervención biológica, entre otros (Achee et al., 2015). El segundo es la implementación de vacunas, algunas están en las fases II y III de desarrollo (Abrão et al., 2015), en países de América Latina y Asia. En ese contexto, se generó así, la primera vacuna CYD-TDV-Dengvaxia Sanofi Pasteur (Commissioner FDA, 2019), cuyo recomendación de uso es para población de 9 a 45 años que vive en áreas endémicas (Hadinegoro et al., 2015). El tercer frente, incluye la búsqueda de compuestos antivirales rentables y de baja toxicidad (ya sean medicamentos de uso secundario o componentes de productos naturales) que logren un efecto profiláctico y/o terapéutico (WHO, 2012). En este campo se han logrado muchos avances para diferentes arbovirus y en especial para el Dengue (Lim et al., 2013).

Algunos de los fármacos con actividad anti-DENV evaluados anteriormente son inhibidores de los pasos iniciales del ciclo replicativo, con ciertas sustancias polianiónicas y lectinas que afectan la fusión viral (Talarico, 2008). A su vez, hay estudios que muestran que compuestos como la Heparina son capaces de unirse a receptores específicos en la membrana celular, actuando como inhibidores en pasos iniciales de la infección por DENV, sin embargo, la capacidad inhibitoria de este tipo de compuestos está relacionada con el grado y tipo de distribución de las cargas negativas y su peso molecular elevado lo que puede representar una seria desventaja para su uso clínico en forma sistémica (Dalrymple and Mackow, 2011; Damonte, 2006; Lee et al., 2006).

Los productos naturales son una fuente inagotable de principios activos, algunos de los cuáles se usan de forma tradicional para la prevención y tratamiento del dengue (Talarico, 2008). Por ende, la búsqueda de compuestos de origen natural que tengan un efecto inhibitorio frente a la infección por DENV es un campo de gran valor actual. Nuestro grupo de investigación ha reportado previamente el efecto antiviral de extractos derivados de plantas de la región caribe colombiana (Hernández-Castro et al., 2015), así como de compuestos derivados de dichos extractos (Gómez-Calderón et al., 2017; Trujillo-Correa et al., 2019). Una de las plantas estudiadas por nuestro grupo de investigación es la *T. cymosa*. Su efecto inhibitorio sobre la replicación de DENV-2 NG y DENV-2/16681 se evaluó en líneas celulares VERO y U937, allí se encontró una citotoxicidad de extractos baja ( $CC_{50} > 300 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) con un porcentaje de inhibición del 99.9% en ambas líneas celulares (Hernández-Castro et al., 2015).

*T. cymosa* es originaria de Colombia, Venezuela y Trinidad, con una distribución en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Achenbach et al., 1997). La clasificación de dicha planta es: Clase: Equisetopsida; Subclase: Magnoliidae; Superorden: Asteranae; Orden: Gentianales; Familia: Apocynaceae; Género: Tabernaemontana; Especie: *T. cymosa* (Jacq, 2019). Las actividades biológicas que se han descrito del género incluyen actividad antimicrobiana, antiparasitarias, antitumorales, antifebriles y analgésicas antivirales (Abubakar and Loh, 2016; Yang et al., 2005), así como su efecto contra las larvas y adultos de *A. aegypti* (Obico and Ragragio, 2014). Además, las especies que pertenecen a la familia Apocynaceae son plantas ricas en alcaloides indólicos, los cuales son compuestos nitrogenados producto del metabolismo secundario del aminoácido triptófano (Shao et al., 2015).

En el presente estudio se evaluó el potencial virucida contra cuatro serotipos de DENV del compuesto

Voacangina, el cual fue obtenido por el laboratorio de Investigaciones Fitoquímicas y Farmacológicas la universidad de Cartagena a partir de la planta *T. cymosa*, el compuesto cuenta con el permiso de MINAMBIENTE con el contrato de acceso genético 130 de 2016 RGE0176. Para ello, se determinó el efecto citotóxico del compuesto en la línea celular VERO y se evaluó mediante la estrategia de trans-tratamiento, el posible efecto virucida del compuesto sobre partículas virales infecciosas y sobre el número de copias genómicas liberadas de cada uno de los cuatro serotipos de DENV. Además, mediante herramientas bioinformáticas se determinaron las diferencias aminoacídicas entre las proteínas de envoltura de los cuatro serotipos evaluados para plantear posibles mecanismos de acción.

## **2. METODOLOGÍA**

### **Mantenimiento celular**

Se utilizaron células VERO adquiridas de American Type Culture Collection (ATCC® CRL-1587™), derivadas de fibroblastos de mono verde africano provenientes de la especie *Chlorocebus sp.* Las células fueron crecidas a 37° C en atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> en presencia de medio Dulbecco's Modified Eagle's médium (DMEM), suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, 1% de Penicilina/Estreptomina y 1% de Anfotericina. El medio de mantenimiento para los diferentes ensayos antivirales fue suplementado con 2% SFB.

### **Ensayo de viabilidad**

El ensayo de viabilidad se realizó a través del método MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2H-bromuro de tetrazol), para evaluar la toxicidad provocada por diferentes concentraciones de la Voacangina en células VERO durante 48 horas de exposición. La lectura se realizó a 450nm utilizando un lector de ELISA. Como criterio de elección, se eligió una concentración que mantuviera la viabilidad cercana al 80% para el ensayo virucida. Brevemente, se sembraron 30.000 células en placa de 96 pozos y se incubaron durante 24 horas a 37° C en 5% de CO<sub>2</sub>. Las concentraciones de Voacangina (8,4- 271,4 µM) y Heparina (18-564 µM) (control positivo de inhibición) se adicionaron sobre la monocapa celular y se incubaron durante 48 horas adicionales. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS hasta eliminar completamente el medio. Luego se adicionó 50 µL (MTT) a 0,5 mg / mL y se llevó a incubar 2 horas a 37 ° C en 5% de CO<sub>2</sub> atmósfera. Una vez pasado el tiempo, se añadió 100µL de dimetilsufóxido (DMSO) se agitó suavemente y se dejó 15 minutos a 25°C para permitir la solubilización de los cristales.

La solución se leyó en un espectrofotómetro a 450nm. Las células no tratadas se usaron como referencia de viabilidad al 100%. Se realizaron dos unidades experimentales independientes cada uno con 3 réplicas (n=6).

### **Mantenimiento del stock viral**

Los stocks de virus utilizados fueron cepas de referencia OMS: DENV-1/WestPac, DENV-2/S16803, DENV-3/16562 y DENV-4/Indonesia – 1976, los cuales se produjeron en células VERO y la cepa de referencia DENV-2/NG que se produjo en células C6/36. Luego de la inoculación de los virus y de la producción durante cuatro a cinco días, se recolectó el contenido de las botellas y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min a 4° C. El sobrenadante se recolectó en un tubo con 30% de SFB y se alicuotó en viales de 1,5 mL. Los stocks se almacenaron a -80° C hasta su uso. Se realizó la cuantificación del número de copias genómicas RT-qPCR y de partículas virales infecciosas mediante ensayo de plaqueo como se explica más adelante.

### **Ensayo virucida**

Se sembraron 80.000 células por pozo en placas de cultivo celular de 48 pozos, con DMEM SFB al 2% e incubadas en atmósfera al 5% CO<sub>2</sub> a 37° C durante 24 horas. Pasado este tiempo, se realizó una mezcla de partes iguales del inóculo viral a una MOI de 1 con el compuesto de Voacangina a una concentración final de 17,1 µM. La mezcla se incubó por una hora a 4°C y luego se adicionó sobre las monocapas durante 2 horas. A las 2 Horas post infección (h.p.i), se retiró el inóculo viral y se añadió sobre la monocapa medio de mantenimiento fresco, DMEM suplementado con SFB al 2%, nuevamente se incubó la placa de cultivo celular a 37°C en atmósfera al 5% CO<sub>2</sub> durante 48 horas. A las 48 horas, se recolectaron los sobrenadantes y para almacenarlas a -80°C hasta su uso. Se utilizó Heparina a 18 µM como control positivo de inhibición (Dalrymple and Mackow, 2011). Se realizaron dos unidades experimentales con tres réplicas cada una para un n=6.

### **Titulación viral**

Se utilizó para cuantificar el número de partículas virales infecciosas mediante técnica de plaqueo en monocapas. Brevemente, se tripsinizaron células VERO y se incubaron en placas de 24 para los serotipos OMS o de 48 pozos para la cepa de DENV-2/NG a 37°C a 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Luego se inocularon diluciones seriadas 1:10 de las cuatro cepas de referencia y la cepa DENV2 – NG. Se incubaron a 37° C a 5 % CO<sub>2</sub> durante dos horas. Posteriormente se retiró el inóculo y se adicionó medio semisólido de carboximetilcelulosa (CMC) al 1.5% suplementado con SFB al 2%. Se llevó a incubación a 37°C 5% CO<sub>2</sub> durante 12 días. Pasado este tiempo, se retiró la CMC con ayuda de la bomba peristáltica, se realizó lavado con PBS 1X y se fijaron las monocapas con paraformaldehído (PFA) al 4% esto se dejó a temperatura

ambiente durante 30 minutos, por último, se tiñeron con cristal violeta que se dejó actuar por 10 minutos, se retiró el colorante y se lavaron nuevamente los pozos, dejando secar a temperatura ambiente para posteriormente contar el número de placas por pozo y determinar las unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL). Se realizaron dos unidades experimentales con dos replicas cada uno para un n=4.

## **RTqPCR de las Cepas de DENV**

### **Extracción y cuantificación de RNA**

Se realizó la extracción de los sobrenadantes recolectados de la estrategia Trans-tratamiento. La extracción de RNA se llevó a cabo utilizando el kit *Quick-DNA/RNA Viral Kit* de Zymo siguiéndose el protocolo del fabricante (Zymo Research Corp, 2019). La calidad y cantidad de RNA se determinó en un espectrofotómetro NANODROP™ ONE/ONEC (Thermo Fisher Scientific®). Además, se realizó una cuantificación absoluta por RT-qPCR utilizando plásmidos construidos por el grupo de investigación previamente (Quintero-Gil et al., 2014). Se hicieron diluciones seriadas de los plásmidos desde  $1 \times 10^8$  hasta  $1 \times 10^2$  para construir curvas estándar de cada uno de los cuatro serotipos, de tal manera que se pudiera hallar el número de copias de genomas virales usando la ecuación de la recta. Se realizaron dos unidades experimentales con dos replicas cada uno para un n=4.

### **Retrotranscripción y PCR en tiempo real (RT-qPCR)**

Para realizar la retrotranscripción del RNA viral se utilizó el material extraído del sobrenadante. A partir de 45 ng/ $\mu$ L de RNA, se realizó la síntesis del cDNA con el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription de Biosystems™, siguiendo las indicaciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific, 2019) y se usó el equipo Applied Biosystems™ Sistema de PCR ProFlex™ de 3 x 32 pocillos. Una vez obtenido el cDNA viral, se procedió a realizar la PCR en tiempo real utilizando 10  $\mu$ L mix de PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, 2  $\mu$ L de primer forward mD1, 2  $\mu$ L del primer reverse específico para amplificar la región C-prM de cada serotipo ( rTS1 [DENV-1], mTS2 [DENV-2], TS3 [DENV-3] o rTS4 [DENV-4]), descritos previamente (Chien et al., 2006). Además, 4  $\mu$ L de agua y 2  $\mu$ L del cDNA obtenido en la retrotranscripción para un volumen final de reacción de 20  $\mu$ L. La amplificación se hizo en un termociclador de tiempo real QuantStudio 1 de Applied Biosystems con un perfil térmico: 1 ciclo (95°C 5 m), 35 ciclos (95°C 30 s, 55°C 45s, 72°C 45s), 72 °C (10m), 4 °C ( $\infty$ ). Se realizaron dos unidades experimentales con dos replicas cada uno para un n=4.

## **Alineamiento de las secuencias de la proteína de envoltura de los cuatro serotipos de DENV y DENV-2/NG**

Se realizó la amplificación y secuenciación del gen que codifica para la proteína de envoltura mediante PCR convencional usando primers previamente reportados (Domingo et al., 2010) y el Kit SuperScript™ III One-Step Rt-PCR System with 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 editadas 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 que se encuentra en el software MEGA 7.

### **Interacción *in silico***

Se realizó un análisis computacional *In silico* para cada proteína E de los Serotipos DENV 1-4 con códigos de acceso (4FFY, 3UZV, 3VTT, 3WE1) respectivamente, teniendo en cuenta para éstas una resolución inferior  $\leq 2\text{\AA}$ , como criterio de selección en la búsqueda en la base de datos Protein Data Bank; además, se empleó la cadena A como diana, se predijo las interacciones o puntos calientes por PeptiMap Server y se definieron las coordenadas del Grid (**Tabla 1**), se realizó un acoplamiento molecular en el software AutoDockTools-1.5.6, realizando 4 réplicas para cada Serotipo DENV utilizando la Voacangina con código de acceso en la base de datos Pubchem (73255), como ligando para evaluar la afinidad con la Proteína E respectiva. Se consideraron energías libres de unión favorables cuando dieran valores negativos como criterio de buena afinidad. Al final se modeló la interacción con la Heparina con código de acceso en la base de datos Pubchem (772) como control positivo de inhibición bajo las mismas condiciones.

### **Análisis de secuencias DENV**

Se realizó un análisis por el programa MEGA 7, en el cual se ejecutó alineamientos de la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína E de las cepas OMS DENV-1/WestPac, DENV-2/S16803, DENV-

3/16562 y DENV-4/Indonesia y la cepa control DENV 2 NG, se compararon con secuencias nucleotídicas y aminoacídicas correspondientes a la proteína E de los serotipos DENV 1 – 4 reportadas en la base de datos NCBI (LC410183 DENV-1 Th17-087DV1; MH613984 DENV-2\_NG; LC410195 DENV-3 Th17-059DV3; LC410202 DENV-4 Th17-091DV4), para poder determinar las diferencias nucleotídicas de estos serotipos y realizar análisis filogenéticos entre estas cepas por el modelo GTR+G del método de Máxima verosimilitud.

### **Análisis estadístico**

Para comparar el número de partículas virales infecciosas liberadas o el número de copias genómicas virales liberadas entre las células tratadas y no tratadas en las diferentes condiciones experimentales, se realizó la prueba no paramétrica de Kolmogórov-Smirnov (prueba K-S) y prueba t-Student, considerando para todos los casos diferencias estadísticamente significativas con un valor p menor de 0,05 ( $p < 0,05$ ).

### **Aspectos éticos**

El presente estudio se rige según lo estipulado en la resolución 8430 de 1993 (Ministerio de Salud, 1993) en sus artículos 63 y 64, los cuales permiten establecer que: Se contarán con todas las normas de bioseguridad y normativa de laboratorio en cuanto a los procedimientos a realizar y el cumplimiento de los requisitos que señalan las normas técnicas que dicten el ministerio para un laboratorio de investigación.

## **3. RESULTADOS**

### **Ensayo de viabilidad**

#### **La viabilidad sobre células VERO de Voacangina fue dependiente de concentración**

En el ensayo de viabilidad para la Voacangina en células VERO a través del método MTT, se obtuvo porcentajes de viabilidad de 84,8% a la concentración de 8,4  $\mu\text{M}$  la cual decreció hasta el 34,9% a la concentración evaluada de 271  $\mu\text{M}$ , obteniéndose una toxicidad dependiente de concentración. Para los ensayos antivirales la concentración de uso elegida de Voacangina fue de 17,1  $\mu\text{M}$ , la cual tuvo una viabilidad del 77,53% (**Figura 1A-B**). El control positivo de inhibición Heparina demostró una viabilidad superior al 80% en todas las concentraciones evaluadas desde 18  $\mu\text{M}$  - 264  $\mu\text{M}$  (**Figura 2A-B**).

### **Voacangina inhibe partícula viral infecciosa dependiente de serotipo viral**

Con respecto al control de células no tratadas e infectadas que representan el 100% de infección, se obtuvo en el caso de DENV-1 un porcentaje de infección de 48,46% (**Figura 3A-B**) y para DENV-2 de 32,39% (**Figura 4A-B**) siendo estadísticamente significativo la inhibición en ambos casos. Para DENV-3 fue de 86,5% (**Figura 5A-B**) y en DENV-4 fue de un 94,1% (**Figura 6A-B**). La cepa DENV-2/NG usada como control positivo de inhibición viral arrojó porcentaje de infección de 18,52%. El control positivo de inhibición para todos los virus evaluados fue la Heparina con porcentajes de infección cercano superior al 28% con significancia estadística.

### **Voacangina no inhibe copias genómicas liberadas**

Con respecto a un control de células no tratadas e infectadas que representan el 100% de infección, en el caso de DENV-1 se obtuvo un porcentaje de infección de 92,6% (**Figura 3C**); para DENV-2 se registró un porcentaje de infección de 113,2% (**Figura 4C**); en el caso de DENV-3 el porcentaje de infección fue de 409,7% (**Figura 5C**); por último, con DENV-4 se obtuvo un 229,7% de infección (**Figura 6C**). En ningún caso hubo inhibición estadísticamente significativa de las copias genómicas en relación al control sin compuesto. La cepa control DENV-2/NG arrojó un porcentaje de infección de 47,6%. En todos los casos, en presencia de heparina se obtuvo porcentajes de infección menores al 20%, siendo estadísticamente significativos.

### **Interacciones *In silico***

#### **Las interacciones entre Voacangina y las proteínas E de los diferentes serotipos fueron favorables**

En los análisis biocomputacionales se observa que tanto la Voacangina como la Heparina interactúan con las diferentes proteínas E de cada serotipo viral, arrojando energías que van de -5,6 hasta -6,4 Kcal/mol. La unión fue favorable en todos los casos, en las cuales se asumió como criterio de aceptación valores menores a cero (0 Kcal/mol) (**Tabla 2**).

#### **Interacciones Voacangina y Heparina con proteína E DENV1-4 en LigPlot.**

Adicionalmente se realizó una modelación 2D a través del programa LigPlot+ v.1.4 (LigPlot, 2020) para calcular las distancias de los puentes de Hidrógeno. Las interacciones obtenidas son mediadas por enlaces de hidrógeno y por fuerzas hidrófobas. Los enlaces de hidrógeno están indicados por líneas discontinuas entre los átomos involucrados de color verde, mientras que los contactos hidrófobos están representados por un arco con radios que irradian hacia los átomos del ligando con los que contactan (**Figura 7-10**).

Al evaluar la interacción de la heparina con la proteína E de los cuatro serotipos se encontraron múltiples interacciones hidrófobas y formación de puentes de hidrogeno (**Figura 7A-10A**).

Por otro lado, al evaluar la interacción de la voacangina con DENV-1 se encontraron interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos Leu351, Ala369, Gly349, Phe337 Lys334, Thr339 destacando Arg350 con el cual formó un puente de hidrogeno (**Figura 7B**). Con DENV-2, se obtuvieron interacciones con Lys 334, Met301, Gly 349, glu338, Leu351, presentado dos puentes de hidrogeno en Phe337 (**Figura 8B**). Con DENV-3 se destaca Phe615 que permitió la formación de dos puentes de hidrogeno (**Figura 9B**). Finalmente, con DENV-4, no se observó formación de puentes de hidrogeno (**Figura 10B**).

### **Análisis de secuencias**

En dicho procedimiento realizado en el programa MEGA 7, se pudieron evidenciar los diferentes cambios de bases nucleotídicas y amonoacídicas que hay entre cada serotipo que utilizamos en el laboratorio comparados con secuencias bajadas de la base de datos de NCBI de la proteína E. Además, se observaron múltiples sustituciones en diversas posiciones a lo largo de la secuencia que codifica dicha proteína E comparando la secuencia del laboratorio y la cepa de referencia de la base de datos. Se obtuvieron diferentes porcentajes de divergencia cercanos al 30% para cada serotipo DENV 1-4 y entre cepas alrededor de un 7% (**Tabla 3**) y se graficó un análisis filogenético entre ellas (**Figura 11**). La secuenciación de los serotipos DENV-OMS confirmó homología al compararlo con los 4 serotipos reportados en NCBI, así como la identificación de sitios genéticamente conservados. Los análisis filogénicos sugieren que el serotipo más divergente es DENV-4, seguido de DENV-2, 1 y 3, comportándose de manera similar en estudios reportados previamente (Nei et al., 2000). Además, se verificó las diferencias aminoacídicas entre cada Serotipo de DENV, evidenciando a lo largo de las secuencias codificantes de la Proteína E, múltiples sitios informativos en los cuales se destacan cambios de naturaleza aminoacídica en uno, dos o más posiciones. En este caso, nos enfocamos en aquellos sitios donde se encontraban más de 3 cambios de naturaleza aminoacídica (**Tabla 4-5**).

Se identificaron cerca de 40 sitios en los cuales se presentaban 3 cambios de naturaleza de aminoácidos en posiciones definidas según el alineamiento de codificación de cada Proteína E, además se evidenciaron otras sustituciones no mostradas en esta tabla en las cuales había de uno a dos cambios aminoacídicos. Además de un punto crítico en las posiciones 155-157, en las cuales para el Serotipo DENV-3 se presenta un gap demarcado de color rojo en la (**Tabla 4**).

#### 4. DISCUSIÓN

El DENV ha sido el arbovirus de mayor impacto en la salud humana, registrando un comportamiento re-emergente que ha causado un importante número de casos de morbi-mortalidad a lo largo de las últimas décadas debido a que, en gran parte, aún no se cuenta con un tratamiento antiviral específico (OPS and OMS, 2019). De acuerdo con la Organización Mundial de la salud (OMS) cerca del 80 % de la población en países de Asia y África depende de la medicina tradicional como atención primaria en salud, debido a las limitaciones económicas y geográficas, siendo los recursos naturales una importante fuente en la generación de agentes terapéuticos (Calixto, 2019; Teixeira et al., 2014). Aproximadamente, el 35% de los medicamentos que han sido desarrollados por compañías farmacéuticas son productos de origen natural, dentro de los cuales se incluyen análogos semisintéticos y compuestos sintéticos (Oliveira et al., 2017). En este sentido, nuestro grupo de investigación ha realizado a lo largo de los últimos años diferentes estudios con el objetivo mayor de encontrar un antiviral promisorio para DENV, evaluando moléculas de segundo uso como la lovastatina tanto *in vitro* e *in vivo* (Martínez-Gutiérrez et al., 2014; Martínez-Gutiérrez et al., 2011), extractos derivados de plantas de la región caribe colombiana que fueron capaces de inhibir la replicación del DENV-2 (Hernández-Castro et al., 2015), moléculas aisladas de plantas del caribe colombiano que inhibieron DENV-2/NG en pasos iniciales del ciclo replicativo (Gómez-Calderón et al., 2017; Trujillo-Correa et al., 2019), moléculas halotirosinas obtenidas a partir de esponjas marinas con capacidad inhibitoria contra el DENV-2/NG (Rangel et al., 2016) y actualmente moléculas de origen sintético (Loaiza Cano, 2019).

En cooperación con la Universidad de Cartagena, en el Laboratorio de Investigaciones Fitoquímicas y Farmacológicas, un extracto etanólico de semillas de *T. cymosa* (FDI-26S) fue fraccionado por cromatografía abierta en columna líquida y a partir de la fracción 26SF01, se caracterizó el compuesto 26SK001, cuya estructura concuerda con lo reportado en la literatura para la Voacangina (Soriano-García et al., 1989), el cual es un alcaloide indólico definido como pequeña molécula.

Para evaluar el efecto de la Voacangina como un posible agente virucida capaz de inhibir etapas iniciales del ciclo replicativo de diferentes serotipos DENV, se realizó un ensayo de viabilidad celular (**Figura 1 y Figura 2**). Se determinó que la concentración de uso para los ensayos antivirales debe presentar una viabilidad cercana al 80%, por tanto 17,1  $\mu$ M fue elegida como la concentración de trabajo, teniendo en cuenta también que la disponibilidad del compuesto es limitada en trabajos de bioprospección. Se observó adicionalmente que a medida que aumenta la concentración del compuesto, va disminuyendo la viabilidad celular, por lo tanto,

se habla de una toxicidad celular dependiente de concentración, la cual ha sido reportada en otros estudios antivirales donde se han evaluados compuestos de origen natural como bioflavonoides (Zandi et al., 2011).

En el presente trabajo DENV-2/NG se usó como control viral positivo de inhibición frente a la Voacangina, la cual ha sido reportada previamente (Monsalve-Escudero, 2020) y que demostró tener un efecto virucida contra la cepa viral. Estudios previos han determinado que la baicaleína, el cual es un compuesto con un núcleo indol similar a la Voacangina, tiene efecto virucida directo contra DENV-2/NG sobre células VERO (Zandi et al., 2012). Sin embargo, compuestos de naturaleza diferente como el caso del aceite esencial de *Lippia alba* y *Lippia citriodora* tuvo actividad virucida sobre cuatro serotipos diferentes de DENV al ser tratados antes de la adsorción (Ocazonez et al., 2010), indicando que las propiedades químicas de los compuestos pueden influir en el comportamiento del efecto inhibitorio.

Se identificó el efecto virucida de la Voacangina al inhibir UFP en un 81,48% de DENV-2/NG, lo que indica que el alcaloide se comporta como un posible agente virucida al menos para esta cepa viral de DENV. Sin embargo, el efecto virucida sobre las cepas OMS fue dependiente de serotipo al encontrarse inhibición significativa de UFP en DENV-1 y DENV-2 (**Figura 3 y Figura 4**) cuando se compararon con un control sin compuesto que representa el 100% de infección, mientras que el porcentaje de inhibición para DENV-3 fue de 13,46% y DENV-4 sólo 5,93%. Estudios previos han reportado un comportamiento similar al encontrar variaciones en la actividad antiviral según el serotipo de DENV con un polisacárido sulfatado del alga marina *Cladosiphon okamuranus* cuando fue capaz de inhibir en pre-tratamiento únicamente a DENV-2, pero no otros serotipos. De igual manera dos polisacáridos sulfatados homogéneos obtenidos de las algas rojas *Gymnogongrus griffithsiae* y *Cryptonemia crenulata* inhibieron a DENV-2 en células VERO y a DENV-2 y DENV-3 en células HepG2 (Talarico et al., 2005), lo que demuestra adicionalmente una inhibición dependiente de líneas celular, que sería interesante evaluar en futuros estudios con Voacangina.

Cabe resaltar que en este estudio se corrobora el papel de la heparina como inhibidor de DENV, ya que para cada serotipo evaluado se obtuvo porcentajes de inhibición estadísticamente significativos (**Figura 3-6**). La actividad inhibitoria de la heparina se explica al ser un inhibidor competitivo de la entrada del virus como se ha descrito previamente (Marks et al., 2001). A pesar de que se logra este efecto inhibitorio *in vitro* tan marcado, para su uso de forma *in vivo* se debe tener en cuenta que la capacidad inhibitoria de compuestos poli-sulfatados como la heparina está relacionada con el grado y tipo de distribución de las cargas negativas

y su peso molecular elevado, lo que puede representar una seria desventaja para su uso clínico en forma sistémica (Dalrymple and Mackow, 2011; Damonte, 2006; Lee et al., 2006).

Los resultados de la RT- q-PCR de la cepa control DENV-2/NG, indicó un porcentaje de infección del 47,6% (**Figura 4**), lo cual demuestra que la Voacangina disminuyó cerca del 50% las copias genómicas liberadas, lo que podría ser una consecuencia de la inhibición de la partícula viral infecciosa en pasos previos a la entrada viral, esto se correlaciona con los resultados descritos para la cepa control en la cuantificación de UFP (**Figura 4**), el cual también se pudo evidenciar la disminución significativa de éste parámetro. El efecto sobre copias genómicas también se ha evaluado previamente y se demostró disminución significativa en DENV-2/NG y DENV-2/16681 cuando se trataron con Cumarina A y Cumarina B en células VERO (Gómez-Calderón et al., 2017).

En el caso de los serotipos OMS DENV1-4 la RT q-PCR no demostró inhibición significativa de copias genómicas liberadas (**Figura 3-6**), arrojando valores superiores al 100% para el serotipo DENV-3 y DENV-4, lo que podría indicar que el compuesto tiene un efecto proviral en la replicación y, por ende, los cultivos infectados con ambos serotipos y tratados con Voacangina, superaron las copias genómicas liberadas, al ser comparados con cultivos infectados sin el tratamiento. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la ausencia en la inhibición de copias genómicas liberadas no significa necesariamente que las partículas infecciosas no están inhibidas, ya que todos los virus producen partículas defectuosas (Aranda Anzaldo, 1988) producto de un mal ensamblaje o partículas inmaduras que no pueden iniciar un proceso infeccioso productivo, es por ellos que la proporción entre genoma viral y partícula viral infecciosas siempre es mayor. Por tal motivo se determinaron las partículas virales infecciosas para poder definir con mayor precisión el efecto de la Voacangina sobre un parámetro biológicamente relevante, como se describió previamente.

En estas interacciones *in silico*, se tienen resultados que identifican a la proteína de envoltura como un posible blanco de interacción con el ligando Voacangina para los 4 serotipos de DENV evaluados, ya que estudios previos han demostrado que el poseer energías de unión negativas, pueden llegar a ser buen indicador de posibles candidatos en la búsqueda de un agente antiviral (Umamaheswari et al., 2012) esto nos brinda soporte a las observaciones obtenidas en los diferentes ensayos *in vitro* en especial para cepas OMS DENV-1 y DENV- 2 y DENV-2/NG donde hubo una inhibición de la partícula viral, sin embargo, para los demás serotipos, las energías de interacción no fueron favorables, probablemente por los mismos cambios en la conformación

de la proteína E en donde entre serotipos varía cerca del 30%. En general, se observan resultados favorables ya que las energías negativas en el acoplamiento, lo que indican que la interacción se está dando de forma espontánea en todos los casos, es decir sin requerimiento energético importante (**Figura 7-10**). Entre las interacciones que se obtuvo con la Heparina (**Tabla 2**) se evidenció una mayor formación de puentes de hidrogeno en comparación con el compuesto de Voacangina, demostrando así que la heparina sí puede ejercer una acción en dicho blanco, y hacerlo a su vez de una forma más estable, indicando resultados con energías de unión favorables en la interacción ligando receptor como se ha reportado en otros estudios (Trujillo-Correa et al., 2019).

Se ha clasificado previamente la fuerza de los enlaces de H con distancias donador-aceptor de 2,2 a 2,5 Å como fuertes siendo predominantemente covalentes, los de 2,5 a 3,2 Å como moderados y los de 3,2 a 4,0 Å como débiles, siendo los dos ultimo principalmente electrostáticos (Jeffrey, 1997). Se sabe que la mayoría de enlaces de H en las proteínas entran en la categoría de moderados, pues los enlaces de H fuertes requieren grupos químicos o condiciones que son infrecuentes en las proteínas (Eric Martz and Diana Dittmore, 2005; Jeffrey, 1997; Panigrahi and Desiraju, 2007). Adicionalmente, dado que muchos archivos pdb carecen de átomos de H, la presencia de un enlace de H energéticamente significativo se puede deducir cuando un donador y un aceptor potenciales estén situados a menos de 3,5 Å entre sí. (Eric Martz and Diana Dittmore, 2005). Los resultados obtenidos en nuestro estudio, visualizados en LigPlot, permitieron identificar las distancias (**Figura 7**) y de esta manera poder clasificar la formación de los puentes de hidrogeno como enlaces moderados, formados entre la proteína E tanto para la Voacangina como la Heparina, ya que dichas distancias oscilan entre 2,71 Å a 3,3 Å.

Varios alcaloides indólicos tienen alta afinidad por proteínas no estructurales del DENV (como la NS2B-NS3, la NS3 y la NS5), lo que podría explicar el efecto inhibitorio de este tipo de compuestos (Pallant et al., 2012; Powers and Setzer, 2016) en estrategias antivirales que evalúan pasos posteriores a la replicación viral, ejerciendo un papel vital en el ciclo replicativo del virus, por lo que inhibirlas resultaría en el hallazgo de amplio espectro. Por lo tanto, de manera paralela, y debido a la característica de nuestro compuesto de difundir por membrana y llegar al interior celular (Wink and Schimmer, 2018), se realizó un análisis preliminar *in silico* de la proteasa de DENV (**Figura 12 y Tabla 6**), para poner a prueba la capacidad específica de unión, ya que en teoría, alguna proporción de compuesto libre pudo ingresar al citoplasma durante las dos horas de incubación en la monocapa celular. Para esto, se usó la proteína viral NS2B-NS3 con CID:3L6P de la base de datos PDB

(Chandramouli et al., 2010) y se realizó acoplamiento en AutoDock Vina con la Voacangina. Se pudo evidenciar que existen interacciones que brindan una energía de unión mucho más favorable  $-7,2$  kcal/mol, permitiendo a su vez la formación de un puente de hidrógeno con el aminoácido GLY203 entre los residuos de la tríada catalítica H51, D75 y S135 (Bera et al., 2007) cuya distancia de  $3,16$  Å, lo que los clasifica con una energía de unión moderada electrostática en la clasificación previamente descrita (Jeffrey, 1997). Una ventaja adicional de considerar la proteasa viral como target antiviral es que está altamente conservada entre los serotipos, se ha reportado entre un 63% a 74% (Chandramouli et al., 2010). Al observar nuestros resultados, podemos hipotetizar que la Voacangina cuando entra en interacción con la proteasa NS2B / NS3 del DENV, se podría comportar como un compuesto antiviral prometedor. A pesar de ello, faltarían más estudios *in vitro* para poder determinar cómo afecta específicamente la actividad proteasa al usar la Voacangina.

Debido a la diferencia entre los resultados tanto *in vitro* como *in silico*, las secuencias nucleotídicas de la proteína E de cada serotipo OMS DENV 1-4 fueron evaluadas de manera individual y comparadas con secuencias referencia de cada uno de los serotipos referencia DENV 1-4 de la base de datos NCBI (**Tabla 3**). Se confirmó que entre cada serotipo hay diferencias entre un 30-40% lo cual se asemeja a lo reportado previamente (Kuhn et al., 2002). Además, se observó que las diferentes sustituciones que se dan en dicha secuencia ocurren en una sola base a lo largo de la cadena codificante de la proteína E en diferentes sitios, lo cual según la literatura, dichas sustituciones no anónimas en el gen de la envoltura del dengue (E) es de  $7.5 \times 10^{-5}$  subs / sitio / año (Zanotto et al., 1996), otros autores indican que por ejemplo que el DENV-2, produce tasa general de aproximadamente  $6 \times 10^{-4}$  subs / sitio / año (Wang et al., 2000). Todo esto explica el constante descubrimiento de diferentes cepas a lo largo del mundo con diferentes genotipos, formando así toda una filogeografía amplia de DENV (Allicock et al., 2012).

En el alineamiento de secuencias, se identificaron sitios en los que se evidenciaron de uno a tres cambios de naturaleza aminoacídica (**Tabla 4**). Según el alineamiento de cada Proteína E de DENV 1-4, se observa una variabilidad importante en la conformación aminoacídica de cada serotipo cercana a un 30%. Lo que indica que este sitio blanco evaluado puede variar entre serotipos, impidiendo una buena afinidad ligando-receptor para el serotipo 1 y 2 y por tanto permitiendo la inhibición observada *in vitro* (Goo et al., 2017).

Teniendo en cuenta este contexto, hay estudios que reportan sustituciones en la proteína E en Q52, A54 o E133 que reducen la infectividad en células de mamífero y pueden alterar el umbral de pH de fusión (Butrapet et al., 2011). En nuestro caso, aunque se evidenciaron mutaciones en Q52, se lograron las infecciones en las células VERO, e incluso se obtuvo progenie viral con capacidad infectiva, ya que no siempre las mutaciones reportadas afectan el comportamiento de la infección viral en todos los casos. Este resultado es similar a lo reportado previamente, donde se informó la presencia de mutaciones compensatorias en la proteína E que evitan esta alteración de pH y permiten la infección viral. De forma similar, (Roehrig et al., 2013) indica que mutaciones en la proteína E en KK122 / 123EE, E202K, G304K, evita la infección y replicación viral en células VERO. Nuestras cepas presentaron KK122 / 123EE en serotipos DENV-1, DENV-3 y DENV-4. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la presencia de mutaciones en otras posiciones pueden compensar y permitir la infección en la células y la replicación viral (Butrapet et al., 2011). Cabe destacar que en un estudio previo (Butrapet et al., 2011) cepas con mutaciones en KK122 / 123EE y K122E se volvieron menos susceptibles a altas dosis de inhibición de la heparina, lo que sugiere que los residuos básicos en 122 y 123 podrían ser un grupo dominante para la unión del receptor Heparan sulfato (HS).

Por otro lado, se destaca un punto crítico en las posiciones 155-157 para el Serotipo DENV-3 correspondiente al DI de la proteína E con presencia de un gap que genera un punto de diferenciación importante para DENV-3, en comparación con la conformación de los demás, lo cual puede indicar que la interacción con la Voacangina podría afectarse más con DENV-3 que con los otros serotipos. Esta hipótesis podría a su vez estar relacionada con el alto número de copias genómicas liberadas de dicho serotipo (**Figura 5**). Adicionalmente, la actividad virucida observada *in vitro* en partícula viral infecciosa para DENV-1 y DENV-2 puede estar relacionada con la naturaleza polar de los residuos en la posición 293 (**Tabla 4**) que a diferencia de DENV-3 con residuos de naturaleza ácida y DENV-4 básica, no se obtuvo inhibiciones de partículas virales infecciosas.

En este sentido, estudios han demostrado que las mutaciones en la proteína del virus E dieron como resultado cambios significativos en la virulencia de DENV. Un ejemplo de ello es la ausencia de infección secundaria por cepas mutantes con proteína E H244A DENV, que podría deberse a una disminución en la producción de partículas virales y/o producción de partículas que no son infecciosas (Zhao et al., 2014; Zheng et al., 2010). Todo esto sugiere que los cambios aminoacídicos hallados en la proteína E, pueden estar interviniendo en los resultados de inhibición específica de serotipo y pueden indicar que el cambio en la naturaleza de

ciertos aminoácidos podría tener un impacto importante en la interacción con el compuesto de Voacangina, favoreciendo en este caso, una inhibición para DENV-1 y DENV-2, mas no para DENV-4 y DENV-3.

En este estudio no se evaluaron otras estrategias antivirales (pre o post tratamiento), lo cual sería pertinente considerarlos en ensayos futuros, ya que de esta manera permitiría evidenciar los cambios, no sólo en cómo la partícula viral se ve afectada para ejercer su proceso de adhesión a una célula blanco, sino también, evaluar etapas que permita detectar en varios pasos del ciclo replicativo del virus un posible mecanismo de acción antiviral. Esta necesidad se basa en los hallazgos de que los alcaloides tienen una similitud química a moléculas celulares que participan en la transmisión de las señales del sistema nervioso, además de sus efectos inhibitorios en el crecimiento de microorganismos patógenos, debido a su capacidad de intercalarse con el DNA, de detener la síntesis de proteínas, inducir la apoptosis e inhibir las enzimas del metabolismo de carbohidratos (Wink and Schimmer, 2018). Esto hace pensar que la Voacangina, puede interactuar con la partícula viral, también puede ingresar a las células, ejerciendo múltiples cambios en su metabolismo, llegando a potenciar quizás hasta la misma producción viral, por lo que estudios de metabolómica pudiera determinar los diferentes cambios en rutas de señalización que sufre la célula en presencia del alcaloide evaluado y dilucidar cómo puede afectar o favorecer la infección viral.

## **5. CONCLUSIONES**

El estudio demostró que la viabilidad en los cultivos tratados con una concentración de 17,4µM de Voacangina es cercana al 80% en líneas celulares VERO. Se evidencia que el compuesto posee una actividad virucida con inhibiciones cercanas al 80% (estadísticamente significativas,  $p < 0.05$ ) para el DENV- 2/NG, sin embargo, no se obtuvieron inhibiciones significativas de copias genómicas liberadas para ninguna cepa evaluada de DENV 1-4 OMS, lo que indica que éste último dato no necesariamente es el más adecuado para determinar un efecto antiviral. Para los demás serotipos DENV1-4 OMS, se obtuvo una inhibición Serotipo-dependiente, siendo efectiva en los serotipos DENV 1 y 2 con porcentajes de inhibición de 51,54% y 67,61% respectivamente estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

Se confirma que hay una interacción favorable con la glicoproteína E viral de los 4 serotipos de DENV con el ligando Voacangina, con energías de unión para cada serotipo que oscilaron entre -5,6 y -6,4 Kcal/mol. Por último, se evidenciaron múltiples cambios de naturaleza aminoacídica en la proteína E que podrían generar a su vez, un efecto en la interacción de la Voacangina con la proteína de cada serotipo.

Debido al potencial virucida encontrado hasta el momento con Voacangina, se hace necesario realizar más estudios que evalúen la capacidad de este compuesto como un posible agente larvicida del vector transmisor del DENV, ya que de esta forma se podría interferir drásticamente en el ciclo de diseminación y transmisión del virus. A su vez, realizar más experimentos donde se evalúen otras estrategias antivirales para poder dilucidar el mejor sitio de acción de la Voacangina en cada serotipo de DENV.

### **Conflicto de interés**

Los Autores no declaran tener conflicto de interés.

**Tabla 1.** Puntos calientes de interacción de las proteínas E. Predichas por PeptiMap Server y Coordenadas de interacción para las proteínas E. La caja de interacción o grid para cada serotipo fue de 30x30x30.

<b>VIRUS</b>	<b>AMINOÁCIDOS DEL PUNTO CALIENTE</b>	<b>COORDENADAS DE GRID</b>
<b>DENV-1</b>	PHE A 337, SER A 338, THR A 339, THR A 346, GLN A 347, ASN A 348, GLY A 349, ARG A 350, LEU A 351, ALA A 369, GLU A 370, PRO A 371, PRO A 372	center_x = 0.973 center_y = -28.531 center_z = -1.523
<b>DENV-2</b>	PRO A 336, PHE A 337, GLU A 338, ILE A 379, ILE A 380, GLY A 381, VAL A 382, GLN A 386	center_x = -20.55 center_y = 3.22 center_z = -2.23
<b>DENV-3</b>	MET A 579, CYS A 580, LYS A 612, ILE A 613, PRO A 614, PHE A 615, LEU A 629, ALA A 632, ASN A 633, PRO A 634	center_x = -20.921 center_y = -0.068 center_z = 4.305
<b>DENV-4</b>	MET A 580, LYS A 613, VAL A 614, PRO A 615, ILE A 616, ILE A 630, THR A 634, PRO A 635	center_x = 72.22 center_y = 61.592 center_z = 25.781

**Tabla 2.** Energía libre de unión entre Voacangina y Heparina con las proteínas E. Se puede evidenciar energías negativas favorables para cada serotipo, se muestra una buena afinidad para ambos con la proteína de envoltura, también se evidenció sus diferentes interacciones con los aminoácidos correspondientes y la formación de puentes de hidrógeno que hacen que se favorezca dicha afinidad.

Serotipo - Cadena A	Ligando	Kcal/mol	Puentes de hidrógeno	Interacción con aminoácidos
DENV-1 (4FFY)	Voacangina	-5,9 ± 0.05	2 puentes con Arg350	Lys334 Thr339 Phe337 Ser338 Arg350 Gly349 Pro371 Glu370 Leu351
	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)	Voacangina	-6 ± 0.082	Phe337	Met301 Lys334 Phe337 Glu338 Gly349 Ile335 Arg350 Leu351 Arg350
	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)	Voacangina	-5,6 ± 0	2 puentes con PHE615	Leu629 Lys612 Met579 Arg628 Gly627 Pro614 Ile613 Phe615
	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)	Voacangina	-6,3 ± 0.05	No presenta	Ile616 Val626 Lys625 Val627 Gly628 Ile630 Ser632 Thr634 Pro635 Val614 Glu617
	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

**Tabla 3.** Estimaciones de divergencia evolutiva entre secuencias. Muestra el porcentaje de diferencias nucleotídicas que hay entre los diferentes serotipos DENV 1-4 bajados de NCBI, los cuales son cercanos al 30%, además, compara entre cada serotipo de referencia bajados de la base de datos de NCBI y las cepas que se tienen en el laboratorio y estos porcentajes de diferencia están cercanos al 7%. Se muestra el número de diferencias de base por sitio entre las secuencias. Las estimaciones estándar de error se muestran sobre la diagonal. El análisis incluyó 9 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1° + 2° + 3° + Sin codificación. Se eliminaron todas las posiciones que contienen vacíos y datos faltantes. Hubo un total de 1488 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 (Kumar et al., 2016).

	Serotipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	U88535.1 DENV-1_OMS		0,65%	1,24%	1,21%	1,21%	1,18%	1,13%	1,35%	1,36%
2	LC410183.1 DENV 1 Th17-087DV1	7,26%		1,20%	1,18%	1,19%	1,16%	1,13%	1,32%	1,37%
3	GU289914.1 DENV-2_OMS	34,34%	33,74%		0,42%	0,41%	1,19%	1,16%	1,25%	1,31%
4	MH613984.1 DENV-2_NG	34,54%	33,74%	3,36%		0,15%	1,19%	1,17%	1,27%	1,31%
5	AB609589.1 DENV 2 strain: New Guinea C	34,41%	33,60%	3,02%	0,34%		1,19%	1,17%	1,26%	1,30%
6	KU725665.1 DENV-3_OMS	29,64%	29,37%	34,81%	35,01%	34,95%		0,72%	1,28%	1,28%
7	LC410195.1 DENV 3 Th17-059DV3	29,84%	29,23%	34,95%	34,48%	34,61%	7,59%		1,27%	1,26%
8	KX812530.1 DENV-4_OMS	35,95%	35,48%	34,81%	34,34%	34,14%	36,09%	35,82%		0,68%
9	LC410202.1 DENV 4 Th17-091DV4	36,83%	36,36%	35,55%	35,35%	35,15%	37,10%	36,56%	8,40%	

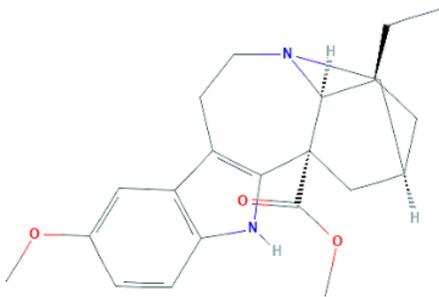




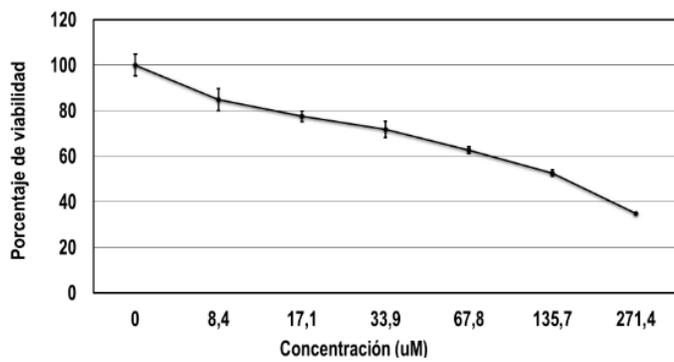
**Tabla 6.** Acople molecular Proteasa DENV y Voacangina.

<b>PROTEASA DENV 1 - 3L6P</b>				
<b>Replicas</b>	<b>Energía Kcal/mol</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación</b>	<b>Puente de Hidrógeno</b>
<b>R1</b>	<b>-7,3</b>	<b>-7,233333333</b>	<b>0,05773503</b>	<b>GLY 203</b>
<b>R2</b>	<b>-7,2</b>			
<b>R3</b>	<b>-7,2</b>			

A.

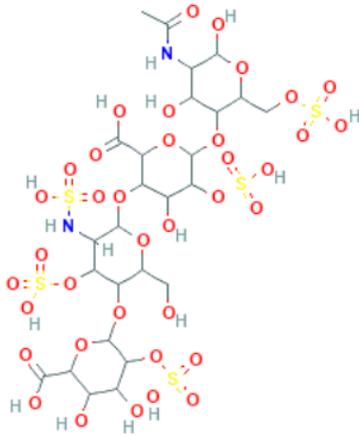


B.

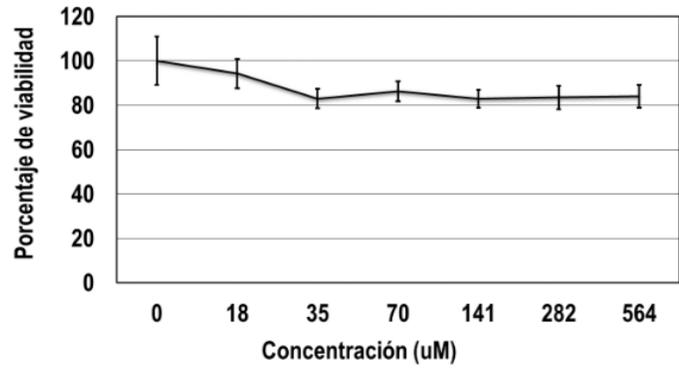


**Figura 1. A** Estructura 2D Voacangina. Tomada de (PubChem, 2019a). **B** Porcentaje de viabilidad de la Voacangina en células VERO. Porcentaje de viabilidad a diferentes concentraciones de Voacangina (8,4  $\mu\text{M}$  a 271,4  $\mu\text{M}$ ).

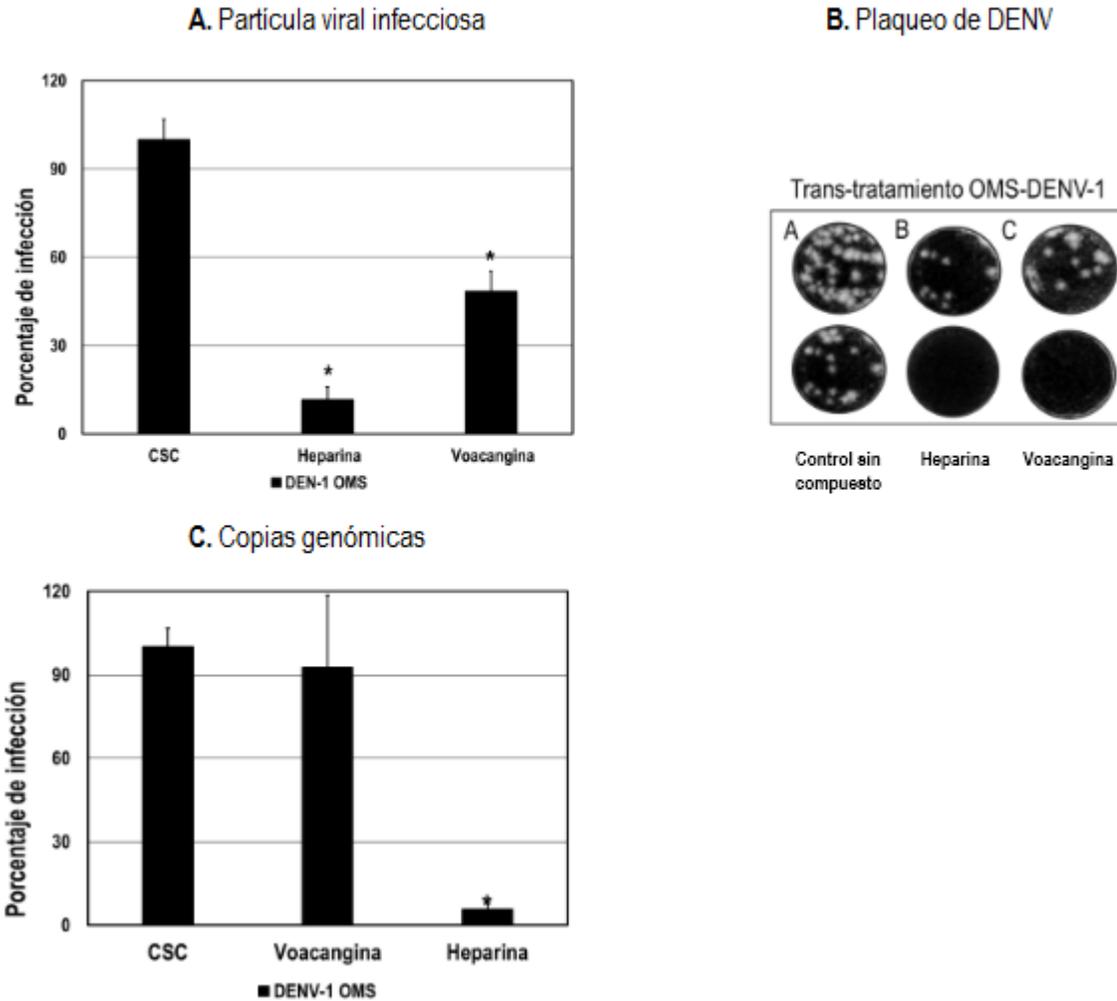
A.



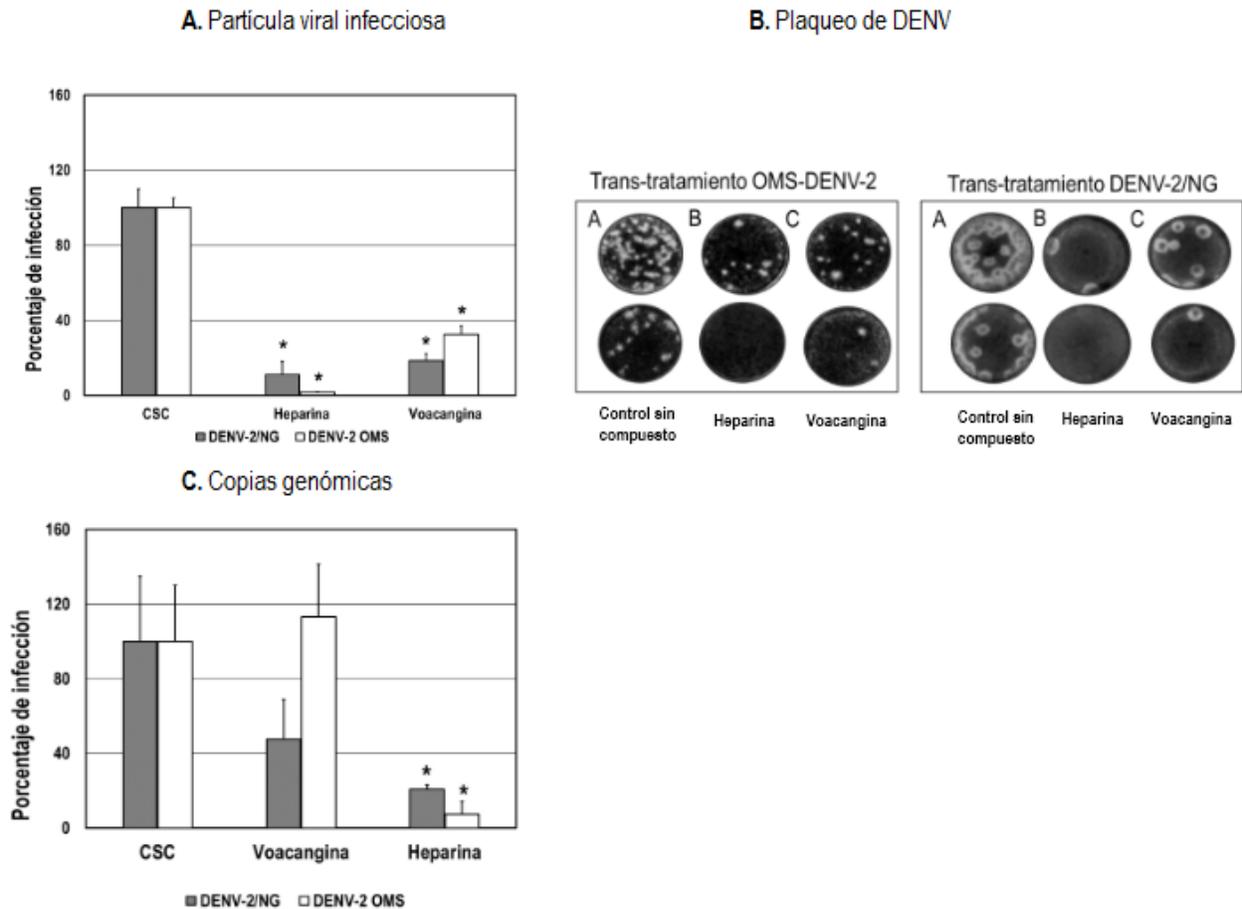
B.



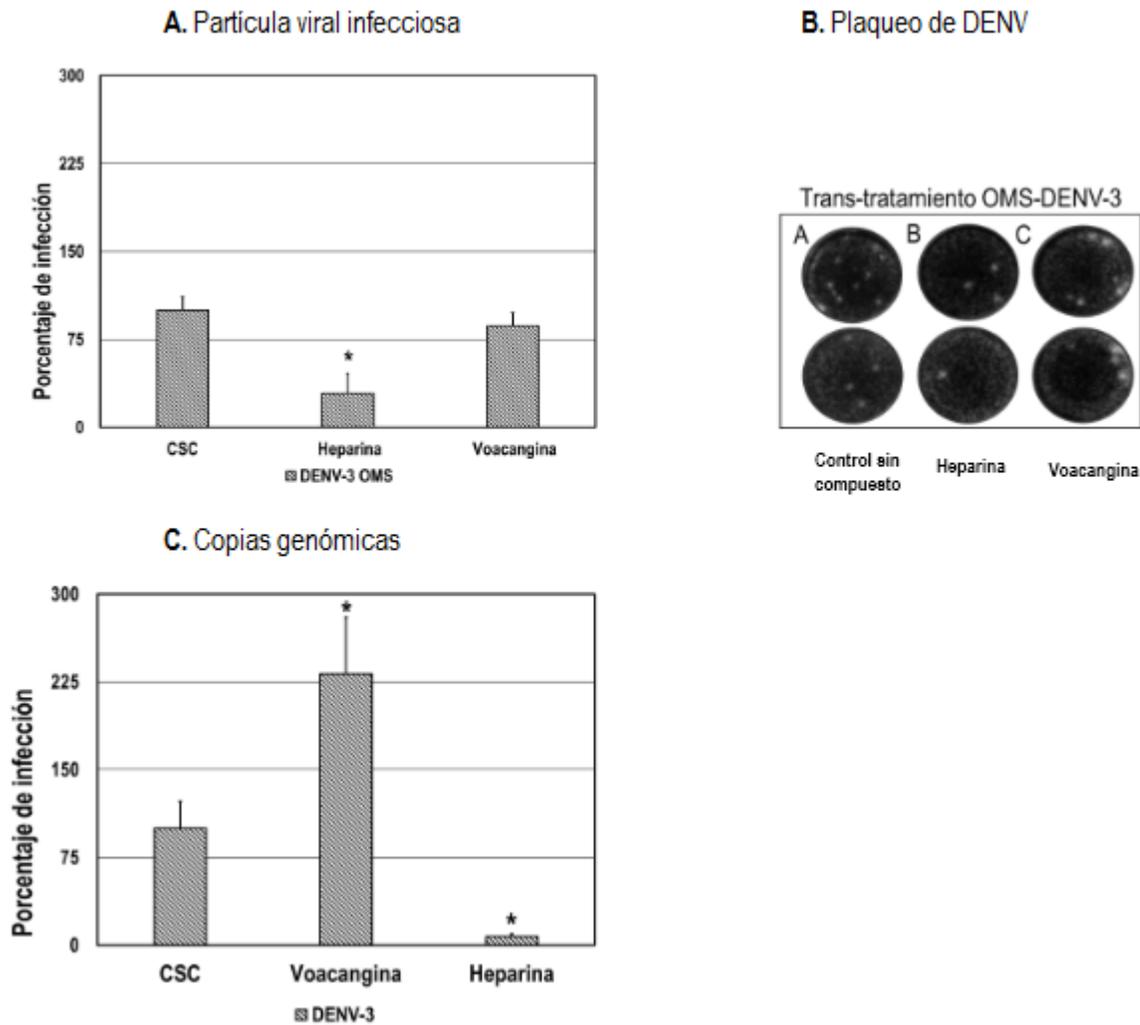
**Figura 2. A** Estructura 2D Heparina. Tomada de (PubChem, 2019b). **B** Porcentaje de viabilidad de la Heparina en células VERO: Porcentaje de viabilidad a diferentes concentraciones de Heparina (0  $\mu\text{M}$  a 564  $\mu\text{M}$ ). RTqPCR



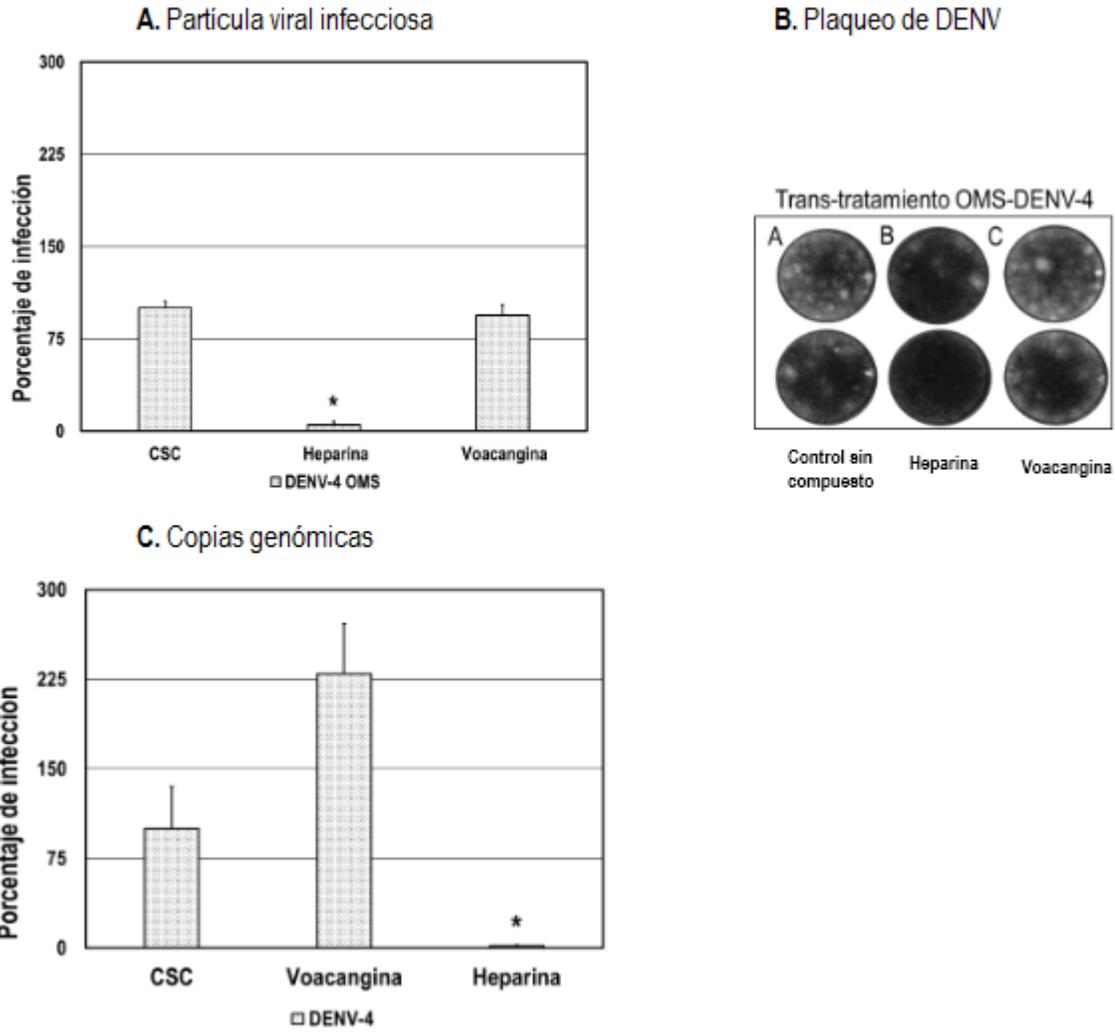
**Figura 3.** Evaluación del efecto antiviral sobre DENV-1. **A** Evidencia una reducción de la infección viral al emplear Voacangina y a 48% de la partícula viral al emplear Voacangina y a 11,5% con la Heparina. **B** plaqueo de los sobrenadantes obtenidos trans-tratamiento de los virus evaluados (MOI 1) durante 48h en VERO, muestra la correlación en la formación de placas del efecto virucida del compuesto. **C** Se ve claramente que no hubo una inhibición al emplear la Voacangina con un porcentaje de infección del 92,6% pero con la heparina se redujo a 5,8% . En todos los casos la Heparina, funcionó como inhibidor como inhibidor de DENV-1. Las barras de error representan el error estándar de la media. El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa respecto al control sin tratamiento (t-Student con p-valor <0,05).



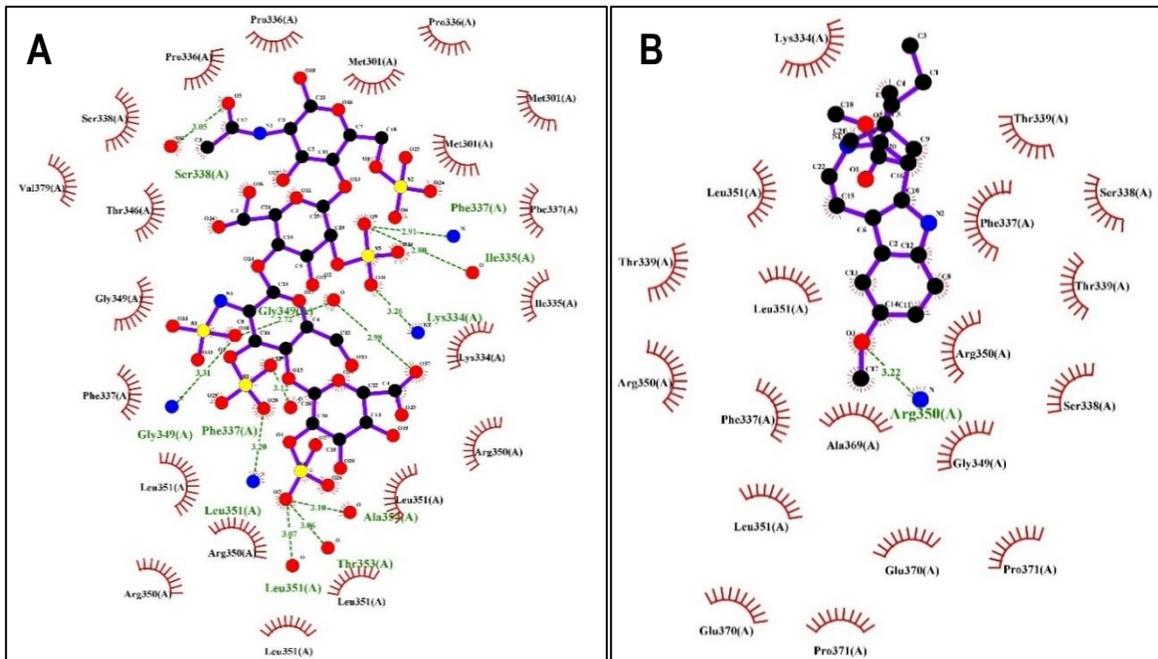
**Figura 4.** Evaluación del efecto antiviral sobre DENV-2. **A** Evidencia una reducción de la partícula viral al emplear Voacangina en ambas cepas a un 18,53% para DENV-2NG y 32,4% para DENV2-OMS. **B** plaqueo de los sobrenadantes obtenidos trans-tratamiento de los virus evaluados (MOI 1) durante 48h en VERO, muestra la correlación en la formación de placas del efecto virucida del compuesto. **C** Se evidencia concentración viral de DENV2-OMS al llegar a un 113,2%, a su vez, la reducción a 47,6% del porcentaje de infección en la cepa DENV-2 NG no es estadísticamente significativa. En todos los casos la Heparina, funcionó como inhibidor de las cepas DENV-2. Las barras de error representan el error estándar de la media. El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa respecto al control sin tratamiento (t-Student con p-valor <0,05).



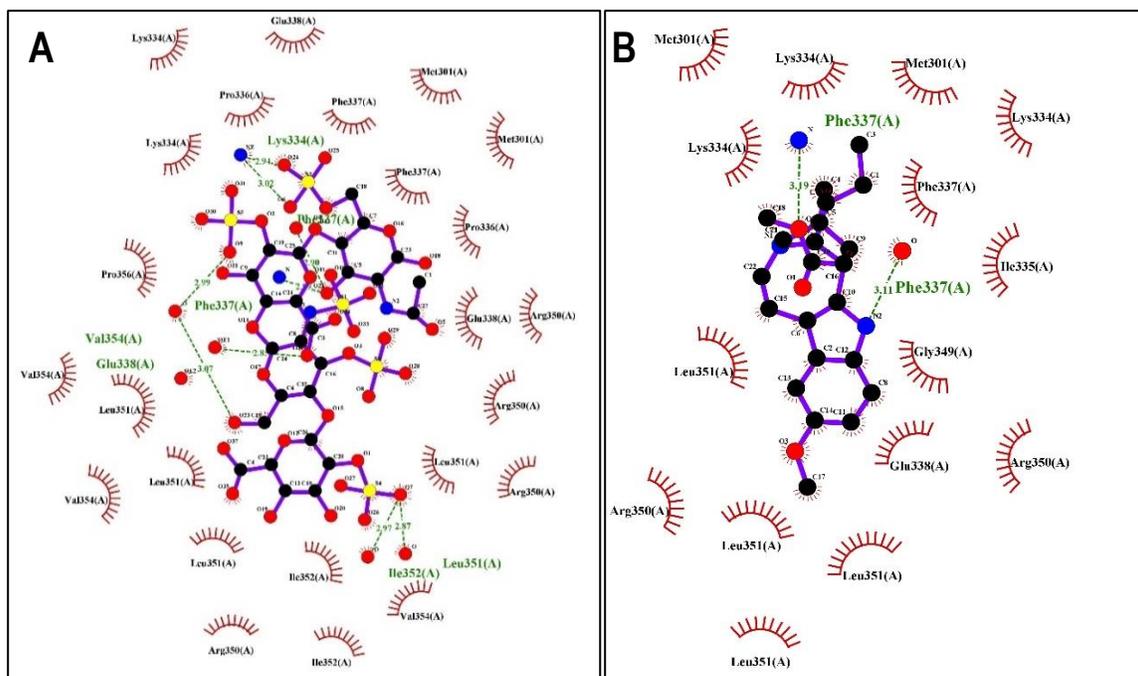
**Figura 5.** Evaluación del efecto antiviral sobre DENV-3. **A** Evidencia una reducción inferior a 85,5% de la partícula viral al emplear Voacangina, con la heparina disminuye a 28,8%. **B** plaqueo de los sobrenadantes obtenidos trans-tratamiento de los virus evaluados (MOI 1) durante 48h en VERO, muestra la correlación en la formación de placas del efecto virucida del compuesto. **C** Se ve claramente que no hubo una inhibición al emplear la Voacangina, generando concentración viral de 232,1%. En todos los casos la Heparina, funcionó como inhibidor de la cepa DENV-3. Las barras de error representan el error estándar de la media. El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa respecto al control sin tratamiento (t-Student con p-valor <0,05).



**Figura 6.** Evaluación del efecto antiviral sobre DENV-4. **A** No se evidencia una reducción significativa de la partícula al emplear Voacangina. **B** plaqueo de los sobrenadantes obtenidos trans-tratamiento de los virus evaluados (MOI 1) durante 48h en VERO, muestra la correlación en la formación de placas del efecto virucida del compuesto. **C** Se evidencia una concentración viral empleando la Voacangina a 229,7%. En todos los casos la Heparina, funcionó como inhibidor como inhibidor de DENV-4. Las barras de error representan el error estándar de la media. El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa respecto al control sin tratamiento (t-Student con p-valor <0,05).

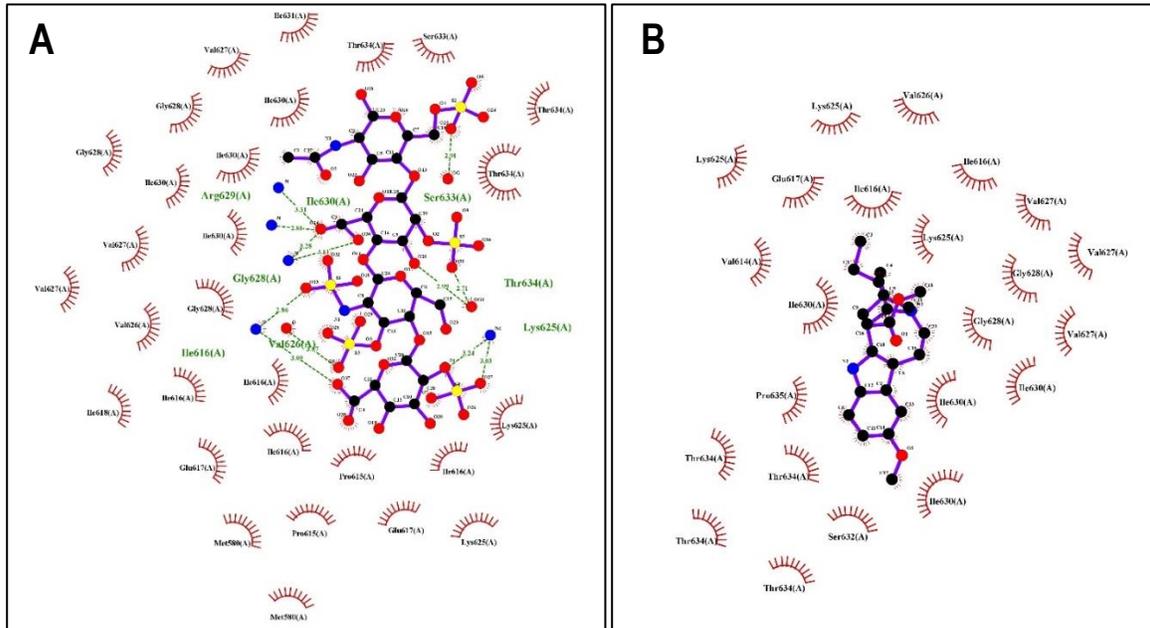


**Figura 7.** Interacciones predichas en LigPlot con la proteína de Envoltura de DENV-1. **A.** Heparina. **B.** Voacangina se predijo formación de un puente de H con la Arg350 de 3,22 Å.

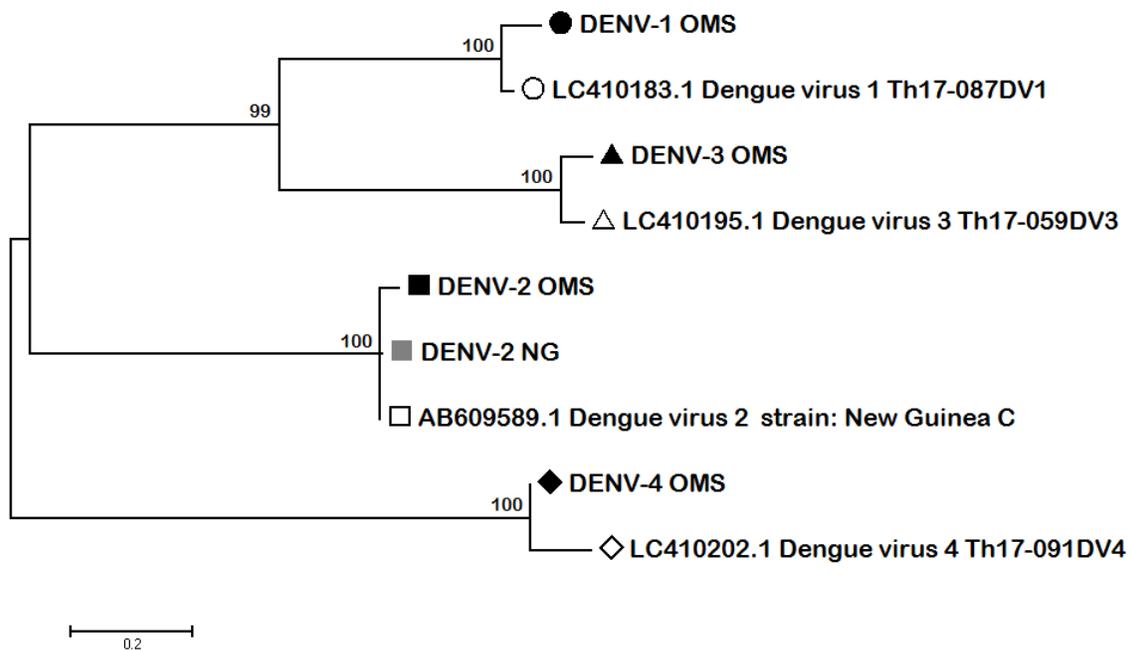


**Figura 8.** Interacciones predichas en LigPlot con la proteína de Envoltura de DENV-2. **A.** Heparina. **B.** Voacangina se predijo dos formaciones de puentes de H con Phe337 con 3,19 y 3,11 Å respectivamente.





**Figura 10.** Interacciones predichas en LigPlot con la proteína de Envoltura de DENV-4. **A.** Heparina. **B.** Voacangina no predijo ninguna formación de puente de hidrógeno.



**Figura 11.** Análisis filogenético molecular por el método de máxima verosimilitud. La historia evolutiva se infiere utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de tiempo reversible general. Se muestra el árbol con la mayor probabilidad de registro (-7485,01). El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agrupan se muestra junto a las ramas. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos de unión de vecinos y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas usando el enfoque de máxima verosimilitud compuesta (MCL), y luego seleccionando la topología con un valor de probabilidad de registro superior. Se utilizó una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias de velocidad evolutiva entre los sitios (5 categorías (+ G, parámetro = 0,8642)). El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis incluyó 9 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contienen vacíos y datos faltantes. Hubo un total de 1488 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 (Felsenstein, 1985; Kumar et al., 2016; Nei et al., 2000).

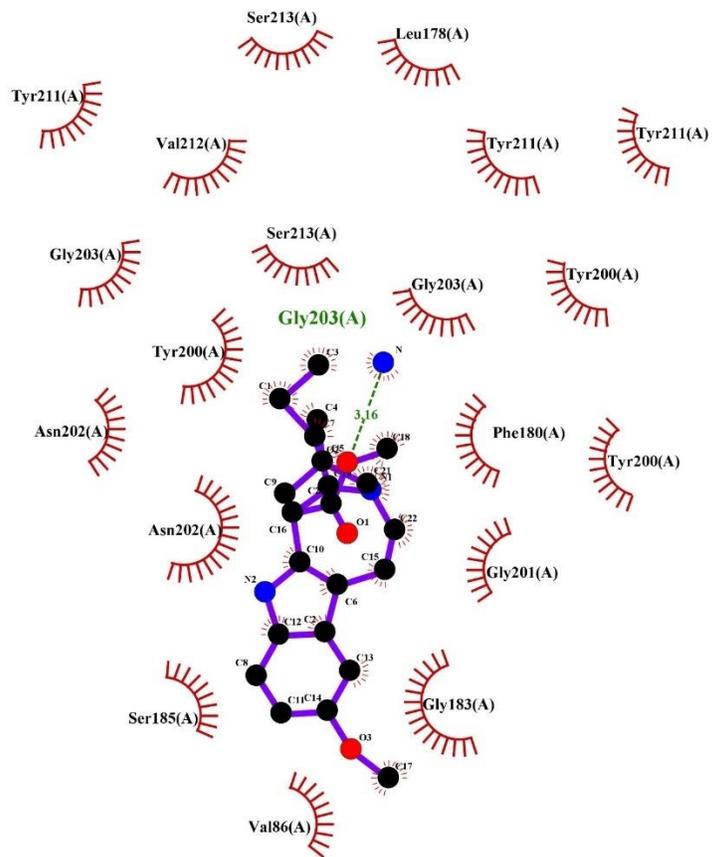


Figura 12. Acoplamiento molecular DENV NS2-NS3 y Voacangina.

## 6. REFERENCIAS

- Abrão, E.P., Espósito, D.L.A., Lauretti, F., Fonseca, B.A.L. da, Abrão, E.P., Espósito, D.L.A., Lauretti, F., Fonseca, B.A.L. da, 2015. Dengue vaccines: what we know, what has been done, but what does the future hold? *Rev. Saúde Pública* 49. <https://doi.org/10.1590/S0034-8910.2015049006146>
- Abubakar, I.B., Loh, H.-S., 2016. A review on ethnobotany, pharmacology and phytochemistry of *Tabernaemontana corymbosa*. *J. Pharm. Pharmacol.* 68, 423–432. <https://doi.org/10.1111/jphp.12523>
- Achee, N.L., Gould, F., Perkins, T.A., Reiner, R.C., Morrison, A.C., Ritchie, S.A., Gubler, D.J., Teyssou, R., Scott, T.W., 2015. A Critical Assessment of Vector Control for Dengue Prevention. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003655>
- Achenbach, H., Benirschke, M., Torrenegra, R., 1997. Alkaloids and other compounds from seeds of *Tabernaemontana cymosa*. *Phytochemistry* 45, 325–335. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00645-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00645-0)
- Acosta, E.G., Kumar, A., Bartenschlager, R., 2014. Chapter One - Revisiting Dengue Virus–Host Cell Interaction: New Insights into Molecular and Cellular Virology, in: Maramorosch, K., Murphy, F.A. (Eds.), *Advances in Virus Research*. Academic Press, pp. 1–109. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800098-4.00001-5>
- Acosta, E.G., Talarico, L.B., Damonte, E.B., 2008. Cell entry of dengue virus. *Future Virol.* 3, 471–479. <https://doi.org/10.2217/17460794.3.5.471>
- Allicock, O.M., Lemey, P., Tatem, A.J., Pybus, O.G., Bennett, S.N., Mueller, B.A., Suchard, M.A., Foster, J.E., Rambaut, A., Carrington, C.V.F., 2012. Phylogeography and population dynamics of dengue viruses in the Americas. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1533–1543. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr320>
- Aranda Anzaldo, A., 1988. *En la frontera de la vida: Los virus*.
- Arredondo-García, J.L., Méndez-Herrera, A., Medina-Cortina, H., Arredondo-García, J.L., Méndez-Herrera, A., Medina-Cortina, H., 2016. Arbovirus en Latinoamérica. *Acta Pediátrica México* 37, 111–131.
- Bera, A.K., Kuhn, R.J., Smith, J.L., 2007. Functional characterization of cis and trans activity of the Flavivirus NS2B-NS3 protease. *J. Biol. Chem.* 282, 12883–12892. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611318200>
- Butrapet, S., Childers, T., Moss, K.J., Erb, S.M., Luy, B.E., Calvert, A.E., Blair, C.D., Roehrig, J.T., Huang, C.Y.-H., 2011. Amino acid changes within the E protein hinge region that affect dengue virus type 2 infectivity and fusion. *Virology* 413, 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.030>
- Calixto, J.B., 2019. The role of natural products in modern drug discovery. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 91, e20190105. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190105>
- Chandramouli, S., Joseph, J.S., Daudenarde, S., Gatchalian, J., Cornillez-Ty, C., Kuhn, P., 2010. Serotype-specific structural differences in the protease-cofactor complexes of the dengue virus family. *J. Virol.* 84, 3059–3067. <https://doi.org/10.2210/pdb3l6p/pdb>
- Chien, L.-J., Liao, T.-L., Shu, P.-Y., Huang, J.-H., Gubler, D.J., Chang, G.-J.J., 2006. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1295–1304. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1295-1304.2006>
- Commissioner FDA, 2019. First FDA-approved vaccine for the prevention of dengue disease in endemic regions [WWW Document]. FDA. URL <http://www.fda.gov/news-events/press-announcements/first-fda-approved-vaccine-prevention-dengue-disease-endemic-regions> (accessed 11.19.19).
- Dalrymple, N., Mackow, E.R., 2011. Productive Dengue Virus Infection of Human Endothelial Cells Is Directed by Heparan Sulfate-Containing Proteoglycan Receptors. *J. Virol.* 85, 9478. <https://doi.org/10.1128/JVI.05008-11>

- Damonte, E., 2006. Dengue: Un viejo y nuevo desafío para la quimioterapia antiviral. *Quím. Viva* 5, 52-52-62.
- Domingo, C., Niedrig, M., Teichmann, A., Kaiser, M., Rumer, L., Jarman, R.G., Donoso-Mantke, O., 2010. 2nd International External Quality Control Assessment for the Molecular Diagnosis of Dengue Infections. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e833. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000833>
- Eric Martz, Diana Dittmore, 2005. Help/Index/Glossary: Protein Explorer [WWW Document]. URL [http://www.umass.edu/microbio/chime/pe\\_beta/pe/protexpl/igloss.htm](http://www.umass.edu/microbio/chime/pe_beta/pe/protexpl/igloss.htm) (accessed 2.13.20).
- Felsenstein, J., 1985. CONFIDENCE LIMITS ON PHYLOGENIES: AN APPROACH USING THE BOOTSTRAP. *Evolution* 39, 783-791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- Franz, A.W.E., Kantor, A.M., Passarelli, A.L., Clem, R.J., 2015. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses* 7, 3741-3767. <https://doi.org/10.3390/v7072795>
- Gómez-Calderón, C., Mesa-Castro, C., Robledo, S., Gómez, S., Bolivar-Avila, S., Diaz-Castillo, F., Martínez-Gutierrez, M., 2017. Antiviral effect of compounds derived from the seeds of *Mammea americana* and *Tabernaemontana cymosa* on Dengue and Chikungunya virus infections. *BMC Complement. Altern. Med.* 17, 57. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1562-1>
- Goo, L., VanBlargan, L.A., Dowd, K.A., Diamond, M.S., Pierson, T.C., 2017. A single mutation in the envelope protein modulates flavivirus antigenicity, stability, and pathogenesis. *PLoS Pathog.* 13. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006178>
- Hadinegoro, S.R., Arredondo-García, J.L., Capeding, M.R., Deseda, C., Chotpitayasunondh, T., Dietze, R., Hj Muhammad Ismail, H.I., Reynales, H., Limkittikul, K., Rivera-Medina, D.M., Tran, H.N., Bouckenoghe, A., Chansinghakul, D., Cortés, M., Fanouillere, K., Forrat, R., Frago, C., Gailhardou, S., Jackson, N., Noriega, F., Plennevaux, E., Wartel, T.A., Zambrano, B., Saville, M., 2015. Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease [WWW Document]. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1506223>. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1506223>
- Hernández-Castro, C., Diaz-Castillo, F., Martínez-Gutierrez, M., 2015. Ethanol extracts of *Cassia grandis* and *Tabernaemontana cymosa* inhibit the in vitro replication of dengue virus serotype 2. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 5, 98-106. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60635-6](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60635-6)
- Hidari, K.I.P.J., Suzuki, T., 2011. Dengue virus receptor. *Trop. Med. Health* 39, 37-43. <https://doi.org/10.2149/tmh.2011-S03>
- INS, 2020. Boletín Epidemiológico Semana 1 del 2020 [WWW Document]. URL [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2020\\_Boletin\\_epidemiologico\\_semana\\_1.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2020_Boletin_epidemiologico_semana_1.pdf)
- Jacq, 2019. *Tabernaemontana cymosa* [WWW Document]. URL <http://www.biovirtual.unal.edu.co/en/collections/detail/550102/> (accessed 11.27.19).
- Jeffrey, G.A., 1997. *An Introduction to Hydrogen Bonding*. Oxford University Press.
- Kean, J., Rainey, S.M., McFarlane, M., Donald, C.L., Schnetzler, E., Kohl, A., Pondeville, E., 2015. Fighting Arbovirus Transmission: Natural and Engineered Control of Vector Competence in *Aedes* Mosquitoes. *Insects* 6, 236-278. <https://doi.org/10.3390/insects6010236>
- Kuhn, R.J., Zhang, W., Rossmann, M.G., Pletnev, S.V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C.T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P.R., Strauss, E.G., Baker, T.S., Strauss, J.H., 2002. Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. *Cell* 108, 717-725. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00660-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00660-8)
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lee, E., Pavy, M., Young, N., Freeman, C., Lobigs, M., 2006. Antiviral effect of the heparan sulfate mimetic, PI-88, against dengue and encephalitic flaviviruses. *Antiviral Res.* 69, 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2005.08.006>

- LigPlot, 2020. LigPlot+ Operating Manual [WWW Document]. URL <https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/manual/manual.html> (accessed 2.13.20).
- Lim, S.P., Wang, Q.-Y., Noble, C.G., Chen, Y.-L., Dong, H., Zou, B., Yokokawa, F., Nilar, S., Smith, P., Beer, D., Lescar, J., Shi, P.-Y., 2013. Ten years of dengue drug discovery: Progress and prospects. *Antiviral Res.* 100, 500–519. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.09.013>
- Loaiza Cano, V., 2019. Evaluación in silico e in vitro de la actividad antiviral y modelación toxicológica de compuestos halogenados derivados de la L-tirosina contra dos flavivirus de importancia en la Salud pública en Colombia.
- Marks, R.M., Lu, H., Sundaresan, R., Toida, T., Suzuki, A., Imanari, T., Hernáiz, M.J., Linhardt, R.J., 2001. Probing the Interaction of Dengue Virus Envelope Protein with Heparin: Assessment of Glycosaminoglycan-Derived Inhibitors. *J. Med. Chem.* 44, 2178–2187. <https://doi.org/10.1021/jm000412i>
- Martínez-Gutierrez, M., Castellanos, J.E., Gallego-Gómez, J.C., 2011. Statins reduce dengue virus production via decreased virion assembly. *Intervirology* 54, 202–216. <https://doi.org/10.1159/000321892>
- Martinez-Gutierrez, M., Correa-Londono, L.A., Castellanos, J.E., Gallego-Gomez, J.C., Osorio, J.E., 2014. Lovastatin Delays Infection and Increases Survival Rates in AG129 Mice Infected with Dengue Virus Serotype 2 [WWW Document]. *PLoS ONE*. URL <https://link.galegroup.com/apps/doc/A478796666/HRCA?sid=lms> (accessed 1.26.20).
- Ministerio de Salud, 1993. RESOLUCION N° 008430 DE 1993 [WWW Document]. URL [https://paginaweb.invima.gov.co/images/pdf/medicamentos/resoluciones/etica\\_res\\_8430\\_1993.pdf](https://paginaweb.invima.gov.co/images/pdf/medicamentos/resoluciones/etica_res_8430_1993.pdf)
- Monsalve-Escudero, L.M., 2020. Actividad antiviral In vitro e interacciones In silico de alcaloides indólicos aislados de *Tabernaemontana cymosa* frente a la infección por virus Zika, Chikungunya y Dengue. ., Universidad Cooperativa de Colombia.
- Nei, M., Kumar, S., Nei, E.P.P. of B.M., 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press.
- Nisalak, A., Endy, T.P., Nimmannitya, S., Kalayanarooj, S., Thisyakorn, U., Scott, R.M., Burke, D.S., Hoke, C.H., Innis, B.L., Vaughn, D.W., 2003. Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68, 191–202.
- Nuckols, J.T., Huang, Y.-J.S., Higgs, S., Miller, A.L., Pyles, R.B., Spratt, H. m., Horne, K.M., Vanlandingham, D.L., 2015. Evaluation of Simultaneous Transmission of Chikungunya Virus and Dengue Virus Type 2 in Infected *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 52, 447–451. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv017>
- Obico, J.J.A., Ragragio, E.M., 2014. A survey of plants used as repellents against hematophagous insects by the Ayta people of Porac, Pampanga province, Philippines 7, 8.
- Ocazonez, R.E., Meneses, R., Torres, F.Á., Stashenko, E., 2010. Virucidal activity of Colombian *Lippia* essential oils on dengue virus replication in vitro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105, 304–309. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000300010>
- Oliveira, A.F.C. da S., Teixeira, R.R., Oliveira, A.S. de, Souza, A.P.M. de, Silva, M.L. da, Paula, S.O. de, 2017. Potential Antivirals: Natural Products Targeting Replication Enzymes of Dengue and Chikungunya Viruses. *Molecules* 22, 505. <https://doi.org/10.3390/molecules22030505>
- OPS, OMS, 2019. Actualización epidemiológica Dengue [WWW Document]. URL [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=dengue-2158&alias=50322-13-de-septiembre-de-2019-dengue-actualizacion-epidemiologica&Itemid=270&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=dengue-2158&alias=50322-13-de-septiembre-de-2019-dengue-actualizacion-epidemiologica&Itemid=270&lang=es) (accessed 2.26.20).
- PAHO/WHO, 2019. PAHO/WHO Data - Dengue cases [WWW Document]. Pan Am. Health Organ. World Health Organ. URL <http://www.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/252-dengue-pais-ano-en.html?start=2> (accessed 1.25.20).

- Pallant, C.A., Cromarty, A.D., Steenkamp, V., 2012. Effect of an alkaloidal fraction of *Tabernaemontana elegans* (Stapf.) on selected micro-organisms. *J. Ethnopharmacol.* 140, 398–404. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.036>
- Panigrahi, S.K., Desiraju, G.R., 2007. Strong and weak hydrogen bonds in the protein–ligand interface. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 67, 128–141. <https://doi.org/10.1002/prot.21253>
- Perera, R., Kuhn, R.J., 2008. Structural Proteomics of Dengue Virus. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.004>
- Powers, C.N., Setzer, W.N., 2016. An In-Silico Investigation of Phytochemicals as Antiviral Agents Against Dengue Fever. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 19, 516–536. <https://doi.org/10.2174/1386207319666160506123715>
- PubChem, 2019a. Voacangine [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/73255> (accessed 11.23.19).
- PubChem, 2019b. Heparin [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/772> (accessed 11.23.19).
- Quintero-Gil, D.C., Ospina, M., Osorio-Benitez, J.E., Martinez-Gutierrez, M., 2014. Differential replication of dengue virus serotypes 2 and 3 in coinfections of C6/36 cells and *Aedes aegypti* mosquitoes. *J. Infect. Dev. Ctries.* 8, 876–884. <https://doi.org/10.3855/jidc.3978>
- Rangel, S.Y.G., Sánchez, K., Lemus, A., Chaustre, M., Galeano, E., Martínez-Gutiérrez, M., 2016. Estudio del efecto inhibitorio de halo-tirosinas sobre la replicación in vitro del Virus Dengue. *Rev. Fac. Cienc. Salud UDES* 3, 21. <https://doi.org/10.20320/rfcsudes.v3i1.s1.p008>
- Rodenhuis-Zybert, I.A., Wilschut, J., Smit, J.M., 2010. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 2773–2786. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0357-z>
- Roehrig, J.T., Butrapet, S., Liss, N.M., Bennett, S.L., Luy, B.E., Childers, T., Boroughs, K.L., Stovall, J.L., Calvert, A.E., Blair, C.D., Huang, C.Y.-H., 2013. Mutation of the dengue virus type 2 envelope protein heparan sulfate binding sites or the domain III lateral ridge blocks replication in Vero cells prior to membrane fusion. *Virology* 441, 114–125. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.03.011>
- Shao, S., Zhang, H., Yuan, C.-M., Zhang, Y., Cao, M.-M., Zhang, H.-Y., Feng, Y., Ding, X., Zhou, Q., Zhao, Q., He, H.-P., Hao, X.-J., 2015. Cytotoxic indole alkaloids from the fruits of *Melodinus cochinchinensis*. *Phytochemistry* 116, 367–373. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.02.028>
- Soriano-García, M., Rodríguez, A., Walls, F., Toscano, R., 1989. Crystal and molecular structure of voacangine: An alkaloid from *Stemmadenia Donnell-Smithii*. *J. Crystallogr. Spectrosc. Res.* 19, 725–732. <https://doi.org/10.1007/BF01179845>
- Talarico, L.B., 2008. La entrada del virus dengue a la célula como un potencial blanco antiviral: estudio de polisacáridos sulfatados como antivirales 21.
- Talarico, L.B., Pujol, C.A., Zibetti, R.G.M., Faría, P.C.S., Nosedá, M.D., Duarte, M.E.R., Damonte, E.B., 2005. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antiviral Res.* 66, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2005.02.001>
- Teixeira, R.R., Pereira, W.L., Oliveira, A.F.C. da S., Da Silva, A.M., De Oliveira, A.S., Da Silva, M.L., Da Silva, C.C., De Paula, S.O., 2014. Natural Products as Source of Potential Dengue Antivirals. *Molecules* 19, 8151–8176. <https://doi.org/10.3390/molecules19068151>
- Thermo Fisher Scientific, 2019. PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix [WWW Document]. URL <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A25741?SID=srch-hj-A25741#/A25741%3FSID=srch-hj-A25741> (accessed 12.14.19).
- Trujillo-Correa, A.I., Quintero-Gil, D.C., Diaz-Castillo, F., Quiñones, W., Robledo, S.M., Martinez-Gutierrez, M., 2019. In vitro and in silico anti-dengue activity of compounds obtained from *Psidium guajava* through bioprospecting. *BMC Complement. Altern. Med.* 19, 298. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2695-1>

- Umamaheswari, M., Aji, C.S., Asokkumar, K., Sivashanmugam, T., Subhadradevi, V., Jagannath, P., Madheswaran, A., 2012. Docking studies: In silico aldose reductase inhibitory activity of commercially available flavonoids. *Bangladesh J. Pharmacol.* 7, 108–113. <https://doi.org/10.3329/bjp.v7i2.10779>
- Velandia, M.L., Castellanos, J.E., 2011. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio* 15, 33–43. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(11\)70074-1](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(11)70074-1)
- Villar, L.A., Rojas, D.P., Besada-Lombana, S., Sarti, E., 2015. Epidemiological Trends of Dengue Disease in Colombia (2000-2011): A Systematic Review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003499>
- Wang, E., Ni, H., Xu, R., Barrett, A.D.T., Watowich, S.J., Gubler, D.J., Weaver, S.C., 2000. Evolutionary Relationships of Endemic/Epidemic and Sylvatic Dengue Viruses. *J. Virol.* 74, 3227–3234.
- WHO, 2012. WHO | Global Strategy for dengue prevention and control, 2012–2020 [WWW Document]. WHO. URL <https://www.who.int/denguecontrol/9789241504034/en/> (accessed 11.10.19).
- Wink, M., Schimmer, O., 2018. Molecular Modes of Action of Defensive Secondary Metabolites, in: *Annual Plant Reviews Online*. American Cancer Society, pp. 21–161. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0418>
- Yang, H., Protiva, P., Gil, R.R., Jiang, B., Baggett, S., Basile, M.J., Reynertson, K.A., Weinstein, I.B., Kennelly, E.J., 2005. Antioxidant and Cytotoxic Isoprenylated Coumarins from *Mammea americana*. *Planta Med.* 71, 852–860. <https://doi.org/10.1055/s-2005-871257>
- Zandi, K., Teoh, B.-T., Sam, S.-S., Wong, P.-F., Mustafa, M.R., AbuBakar, S., 2012. Novel antiviral activity of baicalein against dengue virus. *BMC Complement. Altern. Med.* 12, 214. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-214>
- Zandi, K., Teoh, B.-T., Sam, S.-S., Wong, P.-F., Mustafa, M.R., AbuBakar, S., 2011. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. *Virol. J.* 8, 560. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-560>
- Zanotto, P.M., Gould, E.A., Gao, G.F., Harvey, P.H., Holmes, E.C., 1996. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 548–553.
- Zhao, H., Zhao, L., Jiang, T., Li, X., Fan, H., Hong, W., Zhang, Y., Zhu, Q., Ye, Q., Tong, Y., Cao, W., Zhang, F., Qin, C., 2014. Isolation and characterization of dengue virus serotype 2 from the large dengue outbreak in Guangdong, China in 2014. *Sci. China Life Sci.* 57, 1149–1155. <https://doi.org/10.1007/s11427-014-4782-3>
- Zheng, A., Umashankar, M., Kielian, M., 2010. In Vitro and In Vivo Studies Identify Important Features of Dengue Virus pr-E Protein Interactions. *PLoS Pathog.* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001157>
- Zymo Research Corp, 2019. Quick-DNA/RNA™ Viral Kit [WWW Document]. URL [https://files.zymoresearch.com/protocols/\\_d7020\\_d7021\\_quick-dna-rna\\_viral\\_kit.pdf](https://files.zymoresearch.com/protocols/_d7020_d7021_quick-dna-rna_viral_kit.pdf)