

Evaluación del efecto del alcaloide licorina y su derivado 1,2-diacetil-6-oxolicorina frente a la infección por el virus dengue-2 (DENV-2) en células Vero

Maité Lihuen Nahuel

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE INGENIERÍA, DISEÑO Y CIENCIAS APLICADAS

Programa de Biología

Santiago de Cali

2024

Evaluación del efecto del alcaloide licorina y su derivado 1,2-diacetil-6-oxolicorina frente a la infección por el virus dengue-2 (DENV-2) en células Vero

Maité Lihuen Nahuel

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL
TÍTULO DE BIOLOGÍA

Tutores:

Álvaro Barrera Ocampo, PhD.

Juliana Fernández Valenzuela, BSc.

Santiago de Cali

2024

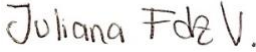
AVAL PARA LA ENTREGA DE PDG II

Firma del Asesor:



Álvaro Barrera Ocampo

Firma del Asesor 2:



Juliana Fernández Valenzuela

Firma del estudiante:



Maité Lihuen Nahuel

CONTENIDO

1. Introducción	4
2. Metodología	10
2.1. <i>Material biológico y compuestos</i>	10
2.2. <i>Ensayo de titulación de DENV-2</i>	11
2.3. <i>Ensayo de citotoxicidad en la línea celular Vero</i>	12
2.4. <i>Estrategia antiviral en la línea celular Vero</i>	14
2.5. <i>Generación de curva estándar de qPCR para la cuantificación del DENV-2</i>	15
2.6. <i>Cuantificación absoluta de DENV-2 en la estrategia de pos tratamiento</i>	15
3. Resultados y discusión	17
3.1. <i>Citotoxicidad del alcaloide licorina y su derivado 1,2-diacetil-6-oxolicorina</i>	17
3.2. <i>Ensayo de titulación de DENV-2</i>	19
3.3. <i>Obtención de la curva estándar para la cuantificación absoluta mediante qPCR</i>	19
3.4. <i>Efecto de la estrategia antiviral en células Vero</i>	21
4. Conclusiones	27
5. Agradecimientos	28
6. Referencias Bibliográficas	29
7. Anexos	36
<i>Anexo 1. Protocolo para la síntesis de cDNA con M—MuLV Reverse Transcriptase.</i>	36
<i>Anexo 2. Protocolo para la qPCR con Luna universal qPCR.</i>	37

Resumen

La enfermedad causada por el virus del dengue, se considera un problema de salud pública a nivel mundial. Actualmente, no existe un tratamiento específico o antivirales aprobados para tratar o prevenir la infección por este virus. Por consiguiente, ha surgido un gran interés por identificar agentes con potencial antiviral para generar tratamientos específicos, entre los cuales se destacan los alcaloides de la familia de plantas Amaryllidaceae. Se ha demostrado que uno de estos alcaloides: licorina, posee actividad antiviral de amplio espectro contra múltiples virus. Sin embargo, en estudios *in vitro* se ha evidenciado que es citotóxica a bajas concentraciones. Por este motivo, se han realizado esfuerzos para sintetizar derivados de este alcaloide mediante alteraciones en grupos químicos, que modifiquen su efecto citotóxico, pero conserven su potencial antiviral. Es por esto que, este proyecto tuvo como objetivo evaluar el efecto de licorina y su derivado 1,2-diacetil-6-oxolicorina frente a la infección por el virus dengue-2 en células Vero. Se determinó la concentración citotóxica 50 (CC50) por medio de ensayos de viabilidad celular, para 1,2-diacetil-6-oxolicorina se obtuvo un $CC50 > 200 \mu\text{M}$, mientras que licorina presentó valores de CC50 desde $5,94 \mu\text{M}$ hasta $25,03 \mu\text{M}$ en los diferentes tiempos de exposición. En la estrategia antiviral de pos tratamiento, licorina presentó una disminución del 36% en el porcentaje de infección del DENV-2, mientras que 1,2-diacetil-6-oxolicorina disminuyó el 7%. Sin embargo, no se observó una reducción significativa en el número de copias virales para ninguna de las dos moléculas. Se sugiere evaluar concentraciones más altas de 1,2-diacetil-6-oxolicorina, dada su baja citotoxicidad, para determinar un posible efecto antiviral.

Palabras clave: agente antiviral, alcaloide, citotoxicidad, dengue, licorina.

1. Introducción

El dengue es una de las enfermedades virales transmitidas por artrópodos más prevalentes¹. Esta es causada por cualquiera de los cuatro serotipos distintos del virus dengue (DENV1-4) del género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*²⁻⁴. Su genoma es un ARN monocatenario de sentido positivo de aproximadamente 11 kb de longitud, está flanqueado por regiones no traducidas (UTR) terminales 5' y 3' y codifica un único marco de lectura abierto (ORF)⁵; como se observa en la Figura 1. Los UTR 5' y 3' son regiones no codificantes que participan en la regulación y mantenimiento del genoma^{6,7}. El ORF codifica un polipéptido precursor de diez proteínas maduras: tres estructurales y siete no estructurales. Las estructurales —proteína de la cápside (C), la envoltura (E) y la pre membrana (prM)— están involucradas en la formación de la nucleocápside y de la membrana, en el desarrollo y envoltura del virión, juntas generan una capa protectora que controla la entrada del virus a las células humanas; particularmente la proteína E se une a los receptores celulares^{4,8}. Las no estructurales —NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5— participan en diversas funciones del ciclo infeccioso; en la replicación, el ensamblaje viral y la evasión de la respuesta inmune innata del huésped^{7,9}.

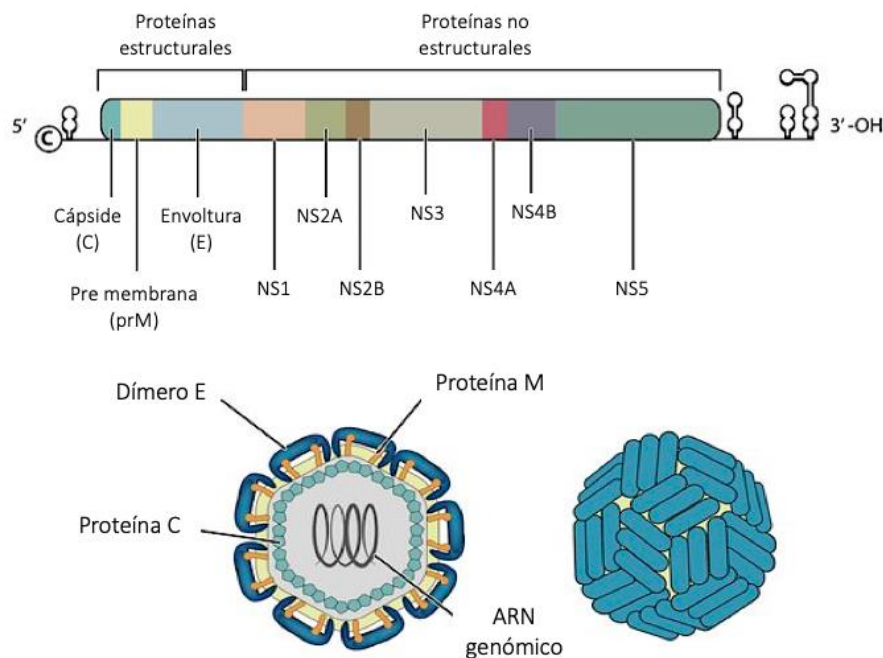


Figura 1. Organización estructural del genoma y virión del virus del dengue; arriba representación de lo codificado por el ARN del virus, donde cada proteína está indicada por un color único y en los extremos las regiones reguladoras 5'UTR y 3'UTR; abajo representación del virión y las proteínas estructurales que lo componen (Modificado de Souza *et al.*, 2022).

El virus se transmite a los humanos por medio de vectores, principalmente por mosquitos hembra de la especie *Aedes aegypti*^{10,11}, y en menor proporción por *Aedes albopictus*⁷. Los mosquitos vectores se infectan cuando se alimentan de sangre de humanos durante el periodo de viremia. El ciclo de vida del DENV tanto en células mamíferas como en las de mosquito implica procesos como la entrada y unión viral, fusión de la membrana del virus y el endosoma, liberación de la nucleocápside, síntesis y procesamiento de proteínas, replicación del ARN, formación de la nucleocápside, ensamblaje viral, maduración viral y finalmente liberación de partículas de DENV maduras¹².

La enfermedad se considera un problema de salud pública a nivel mundial, siendo más prevalente en áreas urbanas de las regiones tropicales y subtropicales del mundo¹³, donde el virus es endémico y las condiciones ambientales son óptimas para su transmisión por el vector¹⁴. Se estima que cerca de la mitad de la población mundial vive en áreas de riesgo y anualmente se presentan entre 100 y 400 millones de infecciones por DENV^{15,16}. Si bien, muchas infecciones producen una enfermedad febril leve (DF por sus siglas en inglés de *dengue fever*) de mortalidad baja (<1%), el DENV puede causar formas más graves de la enfermedad e incluso la muerte^{10,15}. En especial, si no hay una detección temprana y sin la atención médica adecuada, cuando los pacientes desarrollan las formas más graves de la enfermedad —dengue hemorrágico (DHF) y síndrome de shock por dengue (DSS)— la tasa de mortalidad aumenta a un 2-5% inclusive después de recibir tratamiento, por lo contrario, cuando no se trata, la tasa de mortalidad puede alcanzar el 20%^{9,17-20}.

Históricamente, en las Américas el dengue es el arbovirus que ha causado el mayor número de casos, con epidemias cíclicas cada 3-5 años²¹. En el 2023, esta tendencia se conservó y fue el año con mayor número de casos de dengue registrado con un total de 4.565.911 casos, incluyendo 7.653 casos graves y 2.340 fallecidos²². En Colombia, esta tendencia de alta incidencia ha continuado en el 2024, donde a la semana epidemiológica (SE) 21 se han reportado 157.097 casos de dengue, de los cuales 1.423 fueron graves y 272 casos fatales²³. Si bien las infecciones se pueden atribuir a los cuatro serotipos de DENV que circulan en el país²⁴, el más frecuente es DENV-2²⁵.

Actualmente, las estrategias de prevención y control de la enfermedad son deficientes, dado que no existe un tratamiento específico o antivirales aprobados para tratar o prevenir la infección por DENV^{17,26}. Las estrategias se centran en el control de la densidad poblacional del vector¹⁵, y tratamientos paliativos, que se enfocan en aliviar la sintomatología¹⁷. Desde el 2020, la gestión integrada de vectores es el enfoque estratégico promovido por la OMS para reducir la mortalidad por dengue, el cual busca emplear métodos de control biológicos, químicos y ambientales. Los métodos biológicos incluyen el uso de peces larvívoros y copépodos para el control de estadios larvarios de mosquitos; los químicos emplean larvicidas e insecticidas para fumigaciones residuales; y los ambientales tienen como objetivo reducir los criaderos de mosquitos por medio de educación y movilización social^{8,14}.

Estas estrategias convencionales han sido poco efectivas en países donde el dengue es endémico, e incluso cuando se implementan programas sólidos, la enfermedad sigue siendo un riesgo inminente⁴. La ineficacia de estos esfuerzos se puede atribuir al incremento de urbanización no planeada, el cambio climático, y la resistencia a insecticidas por parte del vector^{7,27,28}. Otras estrategias novedosas tales como la liberación de mosquitos macho genéticamente modificados que esterilizan a la población femenina de tipo salvaje, o la introducción embrionaria de cepas de la bacteria intracelular obligada *Wolbachia* en *A.aegypti*, que produce mosquitos resistentes al DENV⁸, buscan responder a estas problemáticas. También, se ha buscado desarrollar vacunas, a la fecha, la única aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) es la de Sanofi Pasteur: Dengvaxia (CYD-TDV)^{8,12,28}, sin embargo, esta ha mostrado complicaciones en pacientes seronegativos, por lo que solo se puede aplicar a personas que han sido previamente infectadas²⁹.

Debido a las limitaciones de las anteriores estrategias, y al aumento en frecuencia e intensidad de los brotes de DENV³⁰, surge un creciente consenso de que ninguna intervención por sí sola será suficiente para reducir eficazmente la enfermedad^{8,31}. Lo anterior, junto a la ausencia de un antiviral clínicamente aprobado contra el virus, ha aumentado el interés por identificar nuevos agentes antivirales para generar tratamientos específicos anti-DENV^{13,17}. El desarrollo de estos antivirales se ha dirigido a la acción sobre factores de unión del huésped o receptores celulares, y proteínas tanto estructurales como no estructurales del virus³². Así como también

acciones dirigidas a etapas de pos-infección como la replicación, maduración y ensamblaje viral¹³. Entre estos se distinguen los alcaloides con propiedades antivirales de la familia de plantas Amaryllidaceae³³; anillos heterocíclicos que contienen compuestos nitrogenados de interés terapéutico debido a su capacidad de unirse con material genético y proteínas virales³⁴.

Particularmente, se ha destacado la licorina —aislada de varias especies de la familia de plantas Amaryllidaceae— debido a sus actividades biológicas prometedoras³⁵⁻³⁷. Entre estas, se ha encontrado que tiene propiedades anticancerígenas³⁸, antiinflamatorias³⁹, antiparasitarias^{40,41}, antibacterianas^{42,43,44}, entre otros. El efecto antiviral de la licorina se ha asociado a la inhibición de la replicación viral mediante el bloqueo de la actividad de la polimerasa viral o bloqueo de la elongación de la poliproteína viral durante la síntesis de proteínas^{45,46}; la disminución en la síntesis de proteínas virales interrumpe el empaquetamiento del virus y, por tanto, la replicación⁴⁶. Análisis de estructura—actividad de la licorina, han permitido asociar su actividad antiviral con grupos específicos de su estructura química (Figura 2). Un análisis reveló que los hidroxilos libres en C-1 y C-2, benzodioxol intacto en el anillo A y B, nitrógeno básico y el doble enlace C3-C4 son cruciales para la actividad antiviral⁴⁷.

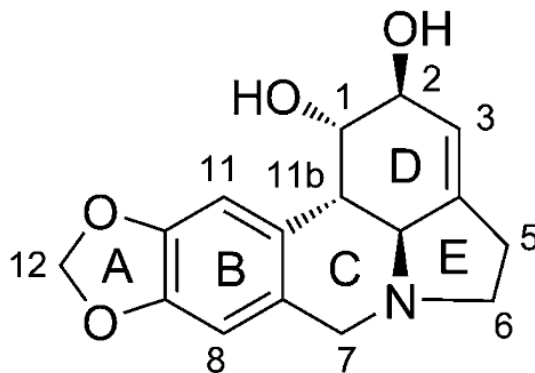


Figura 2. Estructura química del alcaloide licorina (Tomado de Wang *et al.*, 2014).

Aunque la licorina muestra efectos antivirales alentadores, debido a que en estudios *in vitro* se ha encontrado que las concentraciones efectivas para bloquear la infección por los virus son considerablemente citotóxicas e inducen la apoptosis^{48,49}, esta no se considera segura como agente antiviral para aplicación clínica⁵⁰. Por consiguiente, y considerando que la actividad biológica de esta molécula está firmemente asociada a su estructura³⁸, se han llevado a cabo exploraciones para comprender las relaciones entre la estructura y su actividad biológica, mediante el aislamiento de

compuestos similares encontrados en la naturaleza, así como en la creación de versiones análogas mediante síntesis química³⁶. Este proceso posibilita que mediante alteraciones en los grupos químicos se modifiquen el efecto y la potencia de una molécula específica⁴⁷.

Algunos de los derivados de licorina obtenidos de estas modificaciones estructurales han exhibido excelentes actividades antilavivirales —inhibe virus de la familia Flaviviridae³³— con baja citotoxicidad en cultivos celulares²⁶. Modificaciones de los dos grupos hidroxilo aumentan la potencia del compuesto y al mismo tiempo reducen su citotoxicidad⁵¹; en un estudio, 1-acetillicorina exhibió actividad anti-DENV con una citotoxicidad reducida ($CC_{50} > 300 \mu\text{M}$), y las cetonas 1-acetil-2-oxolicorina y 2-oxolicorina también exhibieron excelentes actividades antivirales con baja citotoxicidad²⁶. Otras modificaciones parecen disminuir su citotoxicidad, pero también disminuyen la inhibición contra virus, 1,2-diacetillicorina mostró $CC_{50} > 100 \mu\text{M}$, pero fue inactiva contra DENV-2 y ZIKV¹⁷; la hidrogenación del doble enlace —entre C3 y C4—, la sustitución de los grupos hidroxilo por acetilo, y la remoción del grupo benzodioxol, redujeron la citotoxicidad, pero a su vez debilitaron la inhibición del virus de la Hepatitis C⁵⁰.

Partiendo de lo anterior, en la Universidad ICESI el Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas —en colaboración con la Universidad de los Andes— ha sintetizado derivados de la licorina, con modificaciones en sus grupos químicos, con miras a disminuir su efecto citotóxico a la vez que se conserva su efecto antiviral. Además, han llevado a cabo estudios para investigar el potencial antiviral de la licorina y algunos de sus derivados frente a la infección por el virus del Zika (ZIKV) en células Vero. Inicialmente probaron clorhidrato de licorina (con un CC_{50} de $13.81 \mu\text{M}$) y 1,2-diacetillicorina (CC_{50} de $16.44 \mu\text{M}$); los resultados obtenidos indican que inhibieron el ZIKV en un 50—60%⁵². Posteriormente, evaluaron 6-oxolicorina y 2-acetillicorina; 6-oxolicorina presentó menor citotoxicidad ($CC_{50} > 200 \mu\text{M}$) e inhibió ZIKV un 40%, mientras que 2-acetillicorina (CC_{50} de $20 \mu\text{M}$) inhibió el virus en un 30%⁵³.

Uno de los derivados sintetizados por el grupo de investigación, pero para el cual aún no se ha explorado su capacidad antiviral, es el 1,2-diacetil-6-oxolicorina. De este, se conoce que ha presentado concentraciones citotóxicas 50 superiores a las reportadas para la licorina; en un estudio exhibió $CC_{50} > 66 \mu\text{M}$ en promedio en ocho líneas celulares analizadas³⁶; en otro estudio se obtuvo

un $CC50 > 300 \mu M^{51}$, y en otro, un $CC50 = 95.97 \mu M^{50}$. Esto resulta prometedor dado que, las modificaciones de la licorina parecen resultar en una disminución de su citotoxicidad. Por otro lado, esta es una molécula para la cual no se ha explorado su capacidad antiviral en gran medida, solo se ha encontrado reportada en un estudio frente a la infección por DENV-2⁵¹, por lo que es de interés emplearla en más ensayos de actividad antiviral.

Teniendo en cuenta los avances del grupo de investigación con el ZIKV —el cual pertenece al mismo género del DENV (*Flavivirus*)⁵⁴— y la falta de información sobre la capacidad antiviral del derivado 1,2-diacetil-6-oxolicorina, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto del alcaloide licorina y su derivado 1,2-diacetil-6-oxolicorina frente a la infección por DENV-2 en células Vero. Para esto, inicialmente se determinó la concentración citotóxica 50 (CC50) de las dos moléculas en células Vero por medio del ensayo colorimétrico de viabilidad celular por MTT, el cual permitió establecer tres concentraciones sub citotóxicas a evaluar. Posteriormente, se evaluó el efecto antiviral mediante la estrategia experimental de pos tratamiento de las dos moléculas en células Vero infectadas con DENV-2, cuantificando el título viral presente en las muestras mediante PCR en tiempo real (qPCR).

2. Metodología

2.1. Material biológico y compuestos

2.1.1. Cultivos de línea celular Vero E6

Se emplearon células Vero E6 (ATCC® CRL-1586™), de riñón del mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), donadas por la Universidad del Valle, Cali. La activación y mantenimiento de las células se realizó de acuerdo con el procedimiento operativo estándar (POE) de mantenimiento y criopreservación de células Vero del Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas de la Universidad ICESI⁵⁵. Se descongelaron viales que contienen 1 mL de células, en baño maría a 37°C. La suspensión celular fue transferida a un tubo de 15 mL estéril que contenía 10mL de DMEM (Modificación de Dulbecco del medio Eagle) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS por sus siglas en inglés de *Fetal Bovine Serum*) y 1% de penicilina/estreptomicina. Se centrifugó a 1300 rpm durante 5 min, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 mL de DMEM suplementado, que fueron cultivados en un flask con un área de crecimiento celular de 25 cm². Este se incubó a 37°C con CO₂ al 5% hasta que la monocapa alcanzo una confluencia del 80%.

2.1.2. Mantenimiento de los cultivos celulares

Una vez alcanzada la confluencia celular, se procedió a realizar el subcultivo, se descartó el medio de cultivo, se realizaron dos lavados con PBS 1X (PBS por sus siglas en inglés de *Phosphate Buffer Saline*) a 37°C, se agregó 1 mL de tripsina-EDTA 1X y se incubó por 5 min a 37°C para favorecer el desprendimiento de las células. Posteriormente, se agregaron 5 mL de medio DMEM con 10% FBS y 1% de penicilina/estreptomicina. La suspensión se transfirió a un tubo de 15 mL, se centrifugó a 1.300 rpm por 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó por decantación e inicialmente se resuspendió el pellet de células en 2 mL de DMEM suplementado para realizar un conteo celular. Para esto, se preparó una dilución 1:10, con 10 µL de suspensión celular y 90 µL que corresponden a 75 µL azul de tripano y 15 µL medio DMEM. Se sembraron 8 µL de la solución en la cámara de Neubauer con la que se determinó el número de células por mL con la ecuación 1.

$$\frac{\text{No. de células totales en los cuatro cuadrantes}}{\text{No. de cuadrantes}} \times 100.000 \times \text{mL de suspensión inicial} \quad (1)$$

Según la concentración celular requerida para los experimentos, se preparó la dilución de células en medio DMEM suplementado, se sembró en flasks con tapas ventiladas y se incubaron hasta que la monocapa alcanzó una confluencia del 80-90%.

2.1.3. Amplificación *in vitro* de DENV en células Vero

Se descongeló gradualmente un vial que contenía sobrenadante de DENV-2 de la cepa de referencia de Nueva Guinea. Se emplearon frascos de cultivo de células Vero con una confluencia $\geq 80\%$, se descartó el medio y se inoculó la monocapa con 500 μL del sobrenadante de DENV; si la monocapa no era cubierta por el líquido, se agregaba DMEM (10% de FBS). Se incubó a 37°C con 5% de CO_2 por 1 h, agitando suavemente cada 15 min. Después, se retiró el sobrenadante de virus, se agregaron 5 mL de DMEM (2% de FBS) y se incubó a 37°C por 7 días. Se realizó un seguimiento diario para observar cambios morfológicos, hasta observar el desprendimiento de las células, momento en el cual se colectó el sobrenadante en un tubo de 15 mL. Este se centrifugó a 4.500 rpm por 10 min y 4°C y se realizaron alícuotas del sobrenadante de 1 mL, con el fin de almacenarlo a -80°C para su posterior uso.

2.2. Ensayo de titulación de DENV-2

Con el fin de cuantificar la concentración en partículas de virus infecciosas o título viral del stock de DENV-2, se llevó a cabo un ensayo de titulación para determinar la dosis infecciosa 50 en cultivo celular (TCID₅₀), definida como la muestra de virus que causa infección en el 50% de las células cultivadas. Se sembraron 1.500 células Vero por pozo en placa de 96 pozos en 100 μL de medio DMEM (2% de FBS), se incubó a 37°C con 5% de CO_2 por 24 h. Pasado el tiempo de incubación, se retiró el medio de todos los pozos. Para infectar, se empleó una dilución 1:5 del DENV-2 de referencia. A cada pozo de infección, se le adicionaron 90 μL de DMEM 2% SBF, y se agregaron 10 μL de la dilución viral 1:5 a los pozos de la fila A y se realizaron diluciones seriadas en base 10 desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁸, tomando 10 μL de la fila A a la fila B de la placa y consecutivamente hasta completar hasta la H; cambiando de puntas de micropipeta entre cada dilución. En la columna 1 (control negativo) se reemplazó el medio de cultivo de las células. Se incubó la placa a 37°C con 5% de CO_2 por 7 días en los cuales se monitoreó para observar el efecto citopático en los pozos infectados. Pasado el tiempo de incubación, se realizaron dos lavados con 100 μL de PBS 1X, cada uno por un min. Se fijaron las muestras con 150 μL de solución de

acetona:PBS (3:1) por 30 min a 4°C. Pasado este tiempo, se realizaron dos lavados con PBS 1X y se agregaron 100 µL de PBS 1X con BSA —*Bovine Serum Albumin*— al 1% y se dejó actuar por 1 h a temperatura ambiente. Pasada la hora, se realizaron nuevamente dos lavados con PBS 1X y se adicionó a cada pozo 40 µL de anticuerpo monoclonal *Dengue virus serotype 2 3H5-1-21 MAB Mouse* donado por el CDC en una dilución 1:1500 en PBS 1X con BSA 1% y se incubó *overnight* a 4°C en cámara húmeda. Transcurrido el tiempo, se recuperó el anticuerpo primario y se realizaron otros dos lavados con PBS 1X y un lavado con agua tipo II. Se adicionó 40 µL de anticuerpo secundario *Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 594* de Invitrogen (A-11005) en una dilución 1:1000, con 0,001 mg/mL de 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) en PBS 1X con BSA 1% a todos los pozos. La placa se incubó por 1 h a temperatura ambiente en la cámara húmeda. Se realizaron dos lavados con PBS 1X y un lavado con agua tipo II, se dejaron secar los pozos y se agregó en cada pozo 20 µL de glicerol tamponado al 90%. Se almacenó la placa a 4°C hasta su lectura en microscopio de fluorescencia a 10X; células positivas para la infección con DENV-2 se observaron de color rojo. Por último, se calculó la dilución que contiene 1 TCID50 del virus como se muestra en la ecuación 2.

$$\log 10^{-(\text{Titulación positiva en 3 pozos})} = \log_{10} \left(1 + \left(\frac{\text{No. pozos positivos}}{\text{No. total de pozos}} \right) - 0.5 \right) \quad (2)$$

2.2.1. Preparación del alcaloide licorina, derivado y compuestos controles

Se prepararon soluciones stock de licorina y 1,2-diacetil-6-oxolicorina solubilizándolos a una concentración final de 30 mM —teniendo en cuenta su masa molar— en un volumen final de 1 mL, empleando como solvente DMSO. Estos se mezclaron empleando un vórtex y se sonicaron por 10 min a temperatura ambiente. A partir de la solución stock, se preparó una solución intermedia a una concentración final de 1000 µM, en un volumen final de 2 mL, empleando como solvente agua tipo I y se filtró a través de membranas de nylon con un tamaño de poro de 0,22 µm. En la estrategia antiviral, se empleó como control positivo ribavirina (CAS: 36791-04-5) a una concentración final de 200 µM (masa molecular = 244,20g/mol) en DMEM 2%.

2.3. Ensayo de citotoxicidad en la línea celular Vero

Se evaluó la citotoxicidad de licorina y 1,2-diacetil-6-oxolicorina en la línea celular Vero E6, mediante el ensayo colorimétrico de viabilidad celular con MTT —3(4,5 dimetil-2-triazolil)-

2,5-difeniltetrazólico)— de Invitrogen (M6494). Este permite determinar la viabilidad midiendo la actividad metabólica celular, dado que las enzimas oxidorreductasas de las células metabólicamente activas (vivas) reducen la sal amarilla de tetrazolio (MTT) a cristales de formazán púrpura^{56,57}; el número de células vivas es directamente proporcional a la intensidad de la coloración³⁶. Se evaluaron tres réplicas biológicas, cinco réplicas técnicas de los tratamientos, y un tiempo de exposición a los tratamientos de 24 h, 48 h, y 72 h. A partir de las soluciones intermedias filtradas de los alcaloides se realizaron diluciones seriadas desde 200 μM a 0,78 μM , empleando como solvente medio DMEM (2% de FBS) y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Se sembraron 20.000 células Vero por pozo en tres placas de 96 pozos en 100 μL de medio DMEM (2% de FBS) según el diseño de la placa (Tabla 1); sin sembrar en los pozos correspondientes al blanco. Las placas se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 h, pasado el tiempo de incubación, se retiraron 100 μL de medio de cada pozo de las tres placas y se adicionaron 100 μL de cada tratamiento según el diseño de la placa (Tabla 1); donde el blanco y el control negativo corresponden a medio DMEM con 2% de FBS, el control positivo a tritón 100X al 0.1% en DMEM al 2% de FBS (causante de muerte celular), el vehículo a DMSO al 0,66% (en DMEM con 2% de FBS) y las nueve concentraciones de los alcaloides. Las placas se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ hasta completar el tiempo de tratamiento (24 h, 48 h y 72 h).

Tabla 1. Diseño de placa de 96 pozos y condiciones experimentales del ensayo de citotoxicidad.

Muestras	Código
Blanco	BL
Control negativo	CN
Vehículo	V
Control Positivo	CP
200 μM	C1
100 μM	C2
50 μM	C3
25 μM	C4
12,5 μM	C5
6,25 μM	C6
3,125 μM	C7
1,5 μM	C8
0,78 μM	C9

Muestras												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	CN	V	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
B	BL	CN	V	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
C	BL	CN	V	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
D	BL	CN	V	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
E	BL	CN	V	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
F												
G												
H	CP	CP	CP	CP	CP							

Pasado el tiempo de incubación de cada placa (24 h, 48 h y 72 h), se retiraron los tratamientos de cada pozo y se agregaron 100 μL de medio DMEM (2% de FBS) y 10 μL de solución stock de MTT (5 mg/mL) en los pozos; incluidos los empleados como blanco. Se incubaron a 37°C con 5 % de CO₂ por 4 h y después se retiraron 85 μL de medio con MTT de cada

pozo, se adicionaron 50 μL de DMSO, con el fin de solubilizar los cristales de formazán liberados por las células viables. Se incubaron nuevamente por 15 min y se realizó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 540 nm, con agitación previa de 1 min, en el lector de placas *Synergy HI* (BioTek). Los datos se procesaron en Microsoft Excel, restando el promedio del blanco a las absorbancias obtenidas, para así calcular el porcentaje de viabilidad celular (con la ecuación 3).

$$\% \text{Viabilidad celular} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Promedio de absorbancia del vehículo}} \times 100 \quad (3)$$

Para el análisis estadístico se empleó el software *GraphPad Prism* —versión 8.02—. Se probaron los supuestos de normalidad y con base en esto se emplearon pruebas comparativas paramétricas y no paramétricas según correspondió, con el tiempo de exposición y la concentración de los tratamientos de las moléculas, se aplicaron pruebas *post hoc* para comparar los tratamientos contra el vehículo. Posteriormente, en Microsoft Excel se determinó la concentración de cada molécula que presentó un porcentaje de citotoxicidad del 50% (CC50); ajustando los datos a la ecuación de una recta mediante un modelo de regresión lineal, con el logaritmo de las concentraciones, se determinó la concentración X a la que, Y toma un valor de citotoxicidad del 50%, el logaritmo se eliminó con potencia de 10.

2.4. Estrategia antiviral en la línea celular Vero

Para el ensayo *in vitro* de evaluación del efecto antiviral de los alcaloides frente a la infección por DENV-2 en células Vero, se tuvo en cuenta la estrategia experimental de pos tratamiento con el fin de evaluar un potencial terapéutico. Para esto, se inocularon las células con DENV-2 y posteriormente se trataron con las tres concentraciones subcitotóxicas de los alcaloides determinadas a partir de los ensayos de citotoxicidad (1,56 μM , 3,125 μM , 6,25 μM). Se prepararon a partir de las diluciones en agua estéril de los compuestos en un volumen final de 4 mL de medio DMEM con 2% de FBS.

Se sembraron 100.000 células Vero por pozo en placa de 24 pozos, en 500 μL de medio DMEM (con 2% FBS y 1% de penicilina/estreptomicina), según el diseño de la placa (Tabla 2). Se realizaron tres réplicas técnicas por concentración. Como control mock se tuvo células Vero sin infección, como control del vehículo —en el cual están preparados los tratamientos— se tuvo

DMSO al 0,021%, como control de infección células infectadas con DENV-2 (TCID50 $10^{-8,17}$) sin tratamiento, y como control positivo células infectadas y tratadas con ribavirina 200 μM .

Tabla 2. Diseño de placa de 24 pozos y condiciones experimentales de la estrategia de pos tratamiento.

Muestra	Código	Muestras						
Mock (sin Infx)	M	1	2	3	4	5	6	
Vehículo (DMSO)	V	A	M	V	CP	C1	C2	C3
Control de Infx	CI	B	M	V	CP	C1	C2	C3
Control Positivo (Heparina)	CP	C	M	V	CP	C1	C2	C3
1,56 μM	C1	D				CI	CI	CI
3,125 μM	C2							
6,25 μM	C3							

Se incubaron por 24 h a 37°C y 5% de CO_2 , para alcanzar una confluencia del 80%. Pasado este tiempo, se retiró el medio de cultivo, y se realizó la infección de las células con DENV-2 (TCID50 $10^{-8,17}$) durante 1 h con agitación cada 15 min. Posteriormente, se reemplazó el inoculo viral con los alcaloides en sus concentraciones subcitotóxicas. Transcurridas 48 h post infección (h.p.i), se colectaron las muestras por pozo y se almacenaron a -80°C hasta su cuantificación viral por RT-qPCR.

2.5. Generación de curva estándar de qPCR para la cuantificación del DENV-2

Para generar la curva estándar se tomó el plásmido *pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega) previamente clonado con fragmento del gen C de DENV-2 por la magíster Juliana Cabrera, siguiendo las recomendaciones del fabricante⁵⁸, y se realizaron los siguientes pasos: transformación de células competentes de *E.coli* DH5 α y stocks de glicerol, purificación y cuantificación del plásmido con el fragmento del gen C de DENV-2, preparación de diluciones del plásmido (10^{10} hasta 10^1 copias/mL) con las cuales se obtuvo la curva estándar para la qPCR.

2.6. Cuantificación absoluta de DENV-2 en la estrategia de pos tratamiento

2.6.1. Extracción de ARN de DENV-2

Se realizó la extracción de ARN a partir de 500 μL de sobrenadante de DENV-2 obtenido en la estrategia de pos tratamiento utilizando *TRI Reagent®* (Invitrogen). Se adicionaron 750 μL de trizol frío, se mezcló en vórtex por 15 seg y se dejó reposar la muestra por 5 min a temperatura ambiente. Se adicionaron 200 μL de cloroformo, y nuevamente se mezcló en vórtex por 15 seg y se dejó reposar la muestra por 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó la muestra a 13.000

rpm por 15 min a 4°C, el sobrenadante incoloro resultante —que contenía el ARN— fue transferido a nuevos tubos de microcentrífuga. Con el fin de precipitar el ARN, se agregaron 500 µL de isopropanol, se mezcló por inversión 10 veces y se dejó reposar por 10 min a -20°C. Se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones por 5 min y se descartó el sobrenadante por inversión. Se realizaron dos lavados del pellet de ARN con 750 µL de etanol frío al 75 %, centrifugando a las mismas condiciones por 5 min y descartando los lavados por inversión. Los tubos se dispusieron de forma invertida sobre una servilleta a temperatura ambiente durante 30 min o hasta eliminar los restos de etanol. Por último, se resuspendió el pellet en 15 µL de agua libre de RNAsas estéril, y se almacenó la muestra de ARN a -80°C hasta su cuantificación y medición de calidad (relaciones 260/280 y 260/230) mediante el uso del lector de platos *Synergy HI*.

2.6.2. Síntesis de cDNA de DENV-2 por RT—PCR

Una vez obtenido el ARN de DENV-2, se realizó la síntesis de cDNA mediante RT—PCR con el uso de la enzima *M-MuLV Reverse Transcriptase* (New England BioLabs); las condiciones de la PCR —componentes y termoperfil— se pueden observar en el Anexo 1. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso en la detección viral.

2.6.3. Amplificación por qPCR

Se realizó qPCR en el equipo *Bio Rad CFX96 Touch Real Time PCR*, y se corrió la amplificación haciendo uso del kit *Luna® Universal qPCR Master Mix*, siguiendo las instrucciones del fabricante; las condiciones de la qPCR —componentes y termoperfil— se pueden observar en el Anexo 2. Para el montaje se hizo uso de las diluciones de plásmido preparadas para la curva estándar y las tres réplicas técnicas de muestras de los tratamientos para extrapolar los valores desconocidos de copias virales/mL. Se incluyeron el control negativo sin tratamiento, el control del vehículo y el control positivo.

3. Resultados y discusión

3.1. Citotoxicidad del alcaloide licorina y su derivado 1,2-diacetil-6-oxolicorina

Se determinó la citotoxicidad de licorina y 1,2-diacetil-6-oxolicorina mediante el ensayo de viabilidad celular por MTT. Una vez procesados los datos, se graficó el porcentaje de viabilidad celular obtenido en función del tratamiento aplicado a las células Vero en los tres tiempos de exposición. En la Figura 3.A se puede evidenciar el efecto citotóxico de licorina, donde disminuye la viabilidad celular a medida que incrementa la concentración de la molécula y el tiempo de exposición del tratamiento. A nivel estadístico, la prueba de ANOVA de dos vías indicó que tanto la concentración de la licorina (valor-p: <0,0001), como el tiempo de exposición (valor-p: 0,0004) tienen un efecto significativo en la viabilidad celular. Por su parte, en la Figura 3.B, es posible observar que con 1,2-diacetil-6-oxolicorina la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 h se mantiene por encima del 50%, aún con la concentración más alta evaluada (200 μ M). A nivel estadístico, la prueba ANOVA de dos vías indicó que ninguno de los dos factores, concentración del alcaloide (valor-p: 0,0584) y tiempo de exposición (valor-p: 0,0696), tienen un efecto significativo en la viabilidad celular.

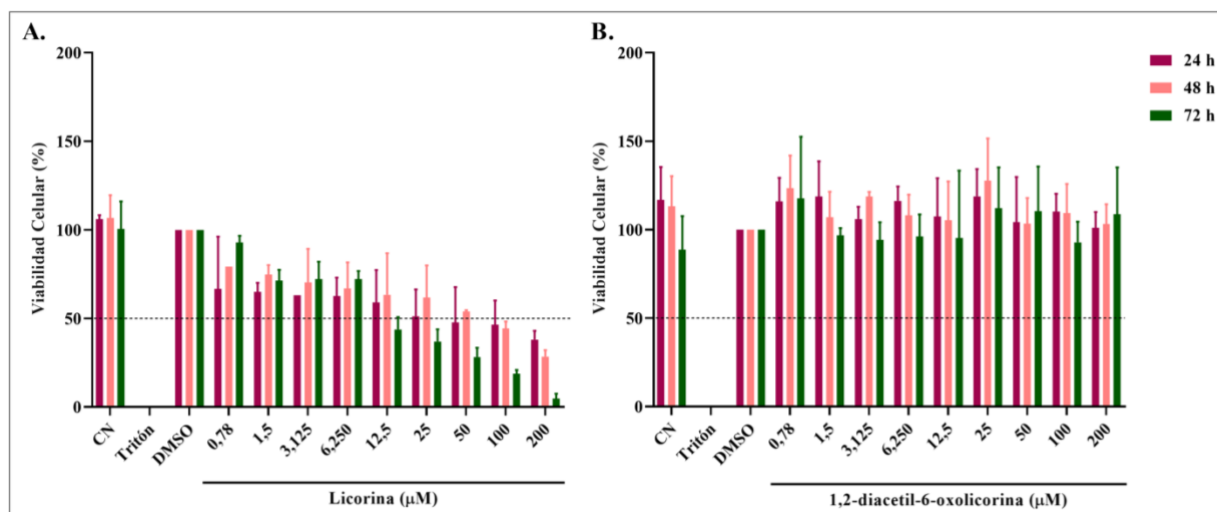


Figura 3. Viabilidad celular determinada mediante el ensayo colorimétrico con MTT en células Vero tratadas con nueve concentraciones (μ M) diferentes de A. Licorina, y B. 1,2-diacetil-6-oxolicorina durante tres tiempos de exposición (24, 48 y 72 h) con sus respectivos controles; control negativo (CN), control positivo (Tritón 0.1%) y control del vehículo (DMSO 0.06%). Se representa el 50% de viabilidad celular con una línea negra punteada. Análisis estadístico: bajo el cumplimiento del supuesto de normalidad, se realizó la prueba de comparación paramétrica ANOVA de dos vías.

A partir de estos datos, se realizó el ajuste a la ecuación de una recta o modelo de regresión lineal (porcentaje de viabilidad celular en función del logaritmo de la concentración), lo cual permitió determinar la concentración citotóxica 50 (CC50) donde el alcaloide causa la muerte celular al 50% de las células Vero. Como se observa en la Tabla 3, licorina alcanza concentraciones CC50 desde 5,94 μM (72 h de exposición), hasta 25,03 μM (24 h de exposición). En contraste, los resultados de CC50 para 1,2-diacetil-6-oxolicorina se estimaron de forma cualitativa, observando la gráfica de citotoxicidad de la Figura 3.B, puesto que todas las concentraciones y tiempos de exposición evaluados muestran porcentajes de viabilidad celular superiores al 50%. Por esta razón, no fue posible ajustar los datos a una recta e interpolar para así encontrar la concentración a la cual se produce una reducción del 50% en la viabilidad celular. Por lo tanto, se puede determinar que el CC50 en los tres tiempos de exposición es superior a la máxima concentración evaluada; $>200 \mu\text{M}$.

Tabla 3. Concentración citotóxica 50 (CC50) de licorina y 1,2-diacetil-6-oxolicorina en células Vero a tres tiempos de exposición (24 h, 48 h, 72 h), con su coeficiente de determinación (R^2) correspondiente.

Alcaloides	24 h		48 h		72 h	
	CC50 (μM)	R^2	CC50 (μM)	R^2	CC50 (μM)	R^2
Licorina	25,03	0,986	15,58	0,940	5,94	0,946
1,2-diacetil-6-oxolicorina	>200	-	>200	-	>200	-

El comportamiento citotóxico de licorina es el esperado con referencia a lo reportado en diferentes artículos. Como se ha señalado —en especial en estudios probando su actividad antitumoral frente a líneas celulares cancerosas— la licorina tiene actividad anti proliferativa desde bajas concentraciones presentando valores de CC50 desde 0,9 – 4 μM después de 72h de exposición³⁶. En la línea cancerosa Huh7.5 se reportan valores CC50 muy similares a los determinados en el presente estudio: 14,5 μM ³³ después de 48h de exposición y 6,10 μM ⁵⁰ después de las 72 h. Sin embargo, debido a que se ha evidenciado que el comportamiento citotóxico de la licorina es dependiente a la línea celular^{17,36}, es más acertado contrastar los resultados obtenidos con estudios que también emplean células Vero como modelo celular. En estos se han reportado valores de CC50 de 24 μM ⁵¹ y 21 μM ⁵⁹ después de 48h de exposición y 3,4 μM ¹⁷ después de 72h; similar a lo obtenido en el presente estudio, aumentando el efecto citotóxico a medida que aumenta el tiempo de exposición.

En cuanto a la disminución en la citotoxicidad observada —valores de CC50 superiores a los de licorina— con 1,2-diacetil-6-oxolicorina, también es acorde a lo reportado en los pocos artículos que han empleado esta molécula. En un panel de líneas celulares tumorales se obtuvo un CC50 promedio $>66 \mu\text{M}$ tras 72h de exposición³⁶. En otro estudio con el modelo celular canceroso Huh7.5 se obtuvo un CC50 de $95,97 \mu\text{M}$ después de 72h de tratamiento⁵⁰. Sin embargo, la concentración máxima empleada en los dos estudios fue de $100 \mu\text{M}$. De esta manera, el artículo con el cual es más acertado contrastar los valores obtenidos es el de Zou *et al.*, quienes determinaron el CC50 incubando células Vero con concentraciones superiores durante 48 h, para lo cual obtuvieron un CC50 $>300 \mu\text{M}$ ⁵¹.

A partir de los valores CC50 de licorina (Tabla 3) se determinaron las concentraciones subcitotóxicas a emplear en la estrategia antiviral de pos tratamiento; $1,56$, $3,12$ y $6,25 \mu\text{M}$. Emplear concentraciones menores a las CC50 permite evaluar el efecto de los alcaloides frente a la infección por DENV-2 y no un posible efecto citotóxico por parte de las moléculas en el modelo celular; esto causaría indirectamente una disminución en la carga viral al disminuir las células en las que se puede replicar el virus. Estas concentraciones se emplearon a un tiempo de exposición de 48 h teniendo en cuenta que es el tiempo empleado en otros estudios⁵⁹⁻⁶³. Además, se ha demostrado que dentro de este periodo de tiempo el virus logra infectar y replicarse en la mayoría de células para formar nuevas partículas virales⁶⁴, y el alcaloide alcanza a ser metabolizado por las células.

3.2. Ensayo de titulación de DENV-2

La titulación del stock viral de DENV-2 indicó un valor de $10^{-8,17}$ dosis infectiva por 50% del cultivo de tejido por mL (TCID50/mL), es decir, 1 mL de la dilución $10^{-8,17}$ contiene 1 TCID50 de virus.

3.3. Obtención de la curva estándar para la cuantificación absoluta mediante qPCR

Se obtuvo una curva estándar o de calibración para la cuantificación absoluta de DENV-2 mediante PCR en tiempo real (qPCR). De acuerdo con la metodología (sección 2.5), se realizaron diluciones en base 10 del plásmido que contenía el fragmento del gen C de DENV-2 (pGEM®-T),

de $6,82 \times 10^{10}$ a $6,82 \times 10^1$ copias virales/mL. Estas se amplificaron mediante qPCR (Figura 4.A), donde la señal de fluorescencia de cada dilución sobrepasó la fluorescencia basal o umbral en distintos ciclos, estos son los ciclos de amplificación o Cq (ciclo en el cual se considera que inicia la reacción de amplificación)⁶⁵. Los valores Cq obtenidos durante la amplificación de cada dilución fueron graficados en función de la concentración inicial de plásmido en escala logarítmica base 10 (Figura 4.B). La regresión lineal aplicada a este conjunto de datos generó una ecuación de línea recta que mejor se ajustó a los valores obtenidos⁶⁶, lo cual corresponde a tener un número de copias virales de DENV-2/mL frente a un Cq obtenido. Esto permitió conocer la carga viral en células Vero del stock viral y de las muestras de la estrategia antiviral.

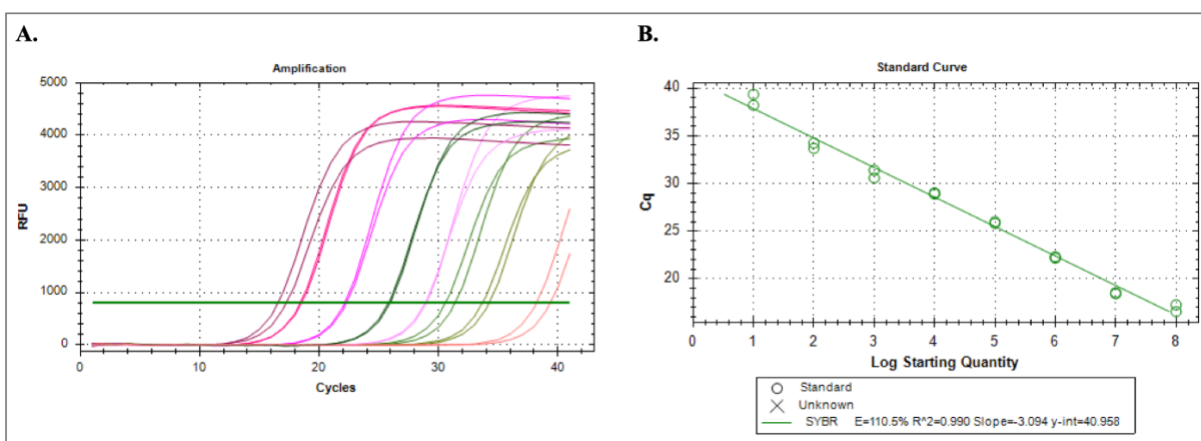


Figura 4. Curva estándar de qPCR para cuantificación absoluta de DENV-2. **A.** Curvas de amplificación de serie de diluciones del plásmido con fragmento del gen C de DENV-2 de 10^8 a 10^1 copias virales/mL montadas por duplicado; intensidad de fluorescencia (RFU) en función del número de ciclos. **B.** Ciclo de cuantificación en el que se da la amplificación (Cq) en función del logaritmo de la cantidad inicial de ADN en cada dilución —cada círculo representa los duplicados de cada dilución de plásmido— y curva estándar obtenida por regresión lineal.

Se obtuvo un coeficiente de correlación (R^2) de 0,990. Este indica qué tan bien se ajustan los datos a la línea de regresión. A su vez, la linealidad alcanzada proporciona una medida de variabilidad entre réplicas del ensayo, dado que, si hubiese diferencias significativas entre los valores Cq entre réplicas se reduciría el valor de R^2 . De esta manera, al ser cercano a 1 —que es el ideal— y $>0,980$ —que es lo recomendado para reacciones de qPCR— el coeficiente obtenido sugiere que esta es adecuada para la interpolación de concentraciones desconocidas, para así determinar cantidades de ADN inicial en las muestras experimentales^{67,68}.

La eficiencia de la curva estándar (E) determinada con la ecuación 4 y 5 —a partir del valor de la pendiente de la recta de -3,094— fue de 110,5%. En la literatura se recomienda trabajar con eficiencias entre 90 y 110%, lo que corresponde a valores de pendiente entre -3,58 y -3,10. Siendo el ideal 100% (pendiente de -3,32), dado que, indica que la plantilla se esta duplicando después de cada ciclo térmico durante la fase de amplificación exponencial⁶⁷. En este caso, la eficiencia superior al 110% puede ser indicativo de error de pipeteo en las diluciones en serie, o que existe coamplificación de productos no específicos; como lo son dímeros de cebadores. La presencia de inhibidores de la PCR en uno o más de los reactivos también puede causar un aumento aparente en la eficiencia⁶⁸. Por lo tanto, para la cuantificación de las muestras de la estrategia antiviral las diluciones del plásmido viral se mezclaron con un vórtex y se adicionaron a las tiras de reacción con especial énfasis en el pipeteo.

$$E = 10^{\left(\frac{-1}{\text{pendiente}}\right)} - 1 \quad (4)$$

$$E\% = (E - 1) \times 100 \quad (5)$$

3.4. Efecto de la estrategia antiviral en células Vero

A pesar de que existe una vacuna aprobada contra el DENV, esta es insegura y su cobertura limitada⁶⁹, además el uso de vacunas puede causar problemas, como la mejora dependiente de anticuerpos (ADE por sus siglas en inglés de *Antibody-dependent enhancement*)⁴⁴. Es por esto que, la búsqueda de nuevos agentes con potencial terapéutico tiene gran importancia en el contexto del tratamiento de la enfermedad por DENV, es decir, aquellos relacionados con una fase tardía en el proceso de infección: en la replicación o ensamblaje del virus dentro de la célula.

Para esto, se llevó a cabo una estrategia de pos tratamiento, la cual permitió evaluar el efecto de las dos moléculas tras la infección de las células Vero por DENV-2 a las tres concentraciones subcitotóxicas seleccionadas (1,56, 3,12 y 6,25 μM). Como control negativo se tuvo células Vero infectadas con DENV-2 (sin tratamiento) y como control positivo —de efecto antiviral— se empleó Ribavirina (RBV). RBV es un análogo de nucleósido que inhibe las ARN polimerasas virales dependientes de ARN (RdRp por sus siglas en inglés de *RNA dependent RNA polymerase*)⁷⁰; por tanto, inhibe la replicación viral⁷¹. Se ha demostrado que RBV tiene actividad antiviral frente a la infección por virus del género *Flavivirus* sin efecto citotóxico; inhibiendo la

replicación de DENV-2⁷¹ en células Vero^{70,72} y de ZIKV en distintos modelos celulares^{73,74}. A pesar de esto, la RBV no está ampliamente disponible ni es empleada como antiviral dado que se ha registrado que puede causar anemia hemolítica cuando es administrada por vía oral a largo plazo^{75,76}. Como se observa en la Figura 6, la RBV funcionó como antiviral frente a la infección por DENV-2, mostrando una disminución estadísticamente significativa en el porcentaje de infección en contraste al CN tanto en el conjunto de muestras de licorina (Figura 6.A), como en las de 1,2-diacetil-6-oxolicorina (Figura 6.B).

No fue posible realizar una cuantificación absoluta —con la curva estándar— de las copias virales en los sobrenadantes de la estrategia antiviral para ninguna de las dos moléculas. Como se observa en la Figura 5, las muestras de la estrategia con licorina —representadas con una × verde—, amplificaron en ciclos tardíos de la qPCR; se obtuvo algo muy similar con las muestras de 1,2-diacetil-6-oxolicorina. Las cuantificaciones de las muestras quedaron por fuera de los límites de detección de la curva, por lo cual no se pudo extrapolar los valores desconocidos de copias virales/mL.

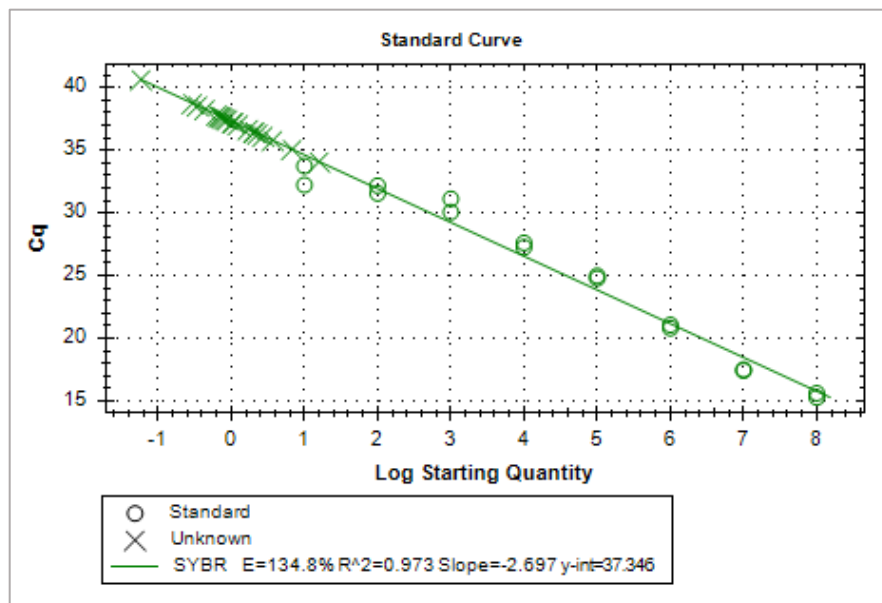


Figura 5. Ciclo de cuantificación en el que se da la amplificación (Cq) en función del logaritmo de la cantidad inicial de ADN en cada dilución y curva estándar obtenida por regresión lineal a partir de serie de diluciones del plásmido con fragmento del gen C de DENV-2 de 10^8 a 10^1 copias virales/mL. Cada círculo representa los duplicados de cada dilución de plásmido y cada cruz representa los duplicados de las muestras obtenidas con la estrategia antiviral de pos tratamiento con la molécula licorina.

Estos resultados sugieren que las diluciones realizadas para obtener el stock viral causaron una disminución en la capacidad infectiva del virus, tanto, que el control negativo o de infección amplificó a un Cq entre 34 y 37. A partir de un Cq tan tardío, cualquier disminución en la cantidad de copias virales que se pueda atribuir al efecto de las moléculas no es soportado por esta técnica de cuantificación. Aunque el número de ciclos máximo empleado en las qPCR, para garantizar que se amplifiquen todas las plantillas presentes en las muestras, varía de 35-45 —siendo el ideal de 40 ciclos totales— la mayoría de los investigadores ignoran valores de Cq superiores a 38 porque la amplificación más allá de este ciclo es indicativa de una PCR ineficiente⁷⁷. Durante las etapas o ciclos de amplificación tardíos la eficiencia de la reacción tiende a disminuir, a medida que se consumen los reactivos y se acumulan inhibidores de la reacción; lo cual puede generar resultados inconsistentes⁷⁸.

La eficiencia de la curva estándar (E) reportada para ambos montajes de las muestras de las moléculas fueron superiores al 110%. En general eficiencias superiores al 110% indican que se está produciendo una inhibición en la reacción, esto puede ser causado por mala calidad de ADN, alta concentración de plantilla o arrastre de inhibidores de la purificación de ácidos nucleicos. Si se utilizan extracciones orgánicas —como la empleada en este caso—, el arrastre de fenol y etanol podrían inhibir la Taq polimerasa⁶⁷.

A pesar de que no fue posible cuantificar de manera absoluta las copias virales presentes en las muestras, se decidió tomar los resultados obtenidos mediante la qPCR como una cuantificación relativa en la cual los valores Cq de las réplicas del CN representaron un porcentaje de infección del 100%. Los porcentajes calculados para las réplicas de los tratamientos de ambas moléculas se emplearon para construir la Figura 6. En la Figura 6.A es posible observar una disminución en la infección de DENV-2 dependiente de la dosis de licorina, a medida que aumenta la concentración empleada disminuye el porcentaje de infección promedio; lo cual corresponde a un aumento del número Cq. Con la concentración más baja (1,56 μM) se dio una disminución promedio del 5%, con la intermedia (3,13 μM) del 22% y con la más alta probada (6,25 μM) del 36%. En la Figura 6. B no hay una tendencia clara con el aumento en la concentración de 1,2-diacetil-6-oxolicorina; con la más baja (1,56 μM) se dio una disminución promedio del 5%, con la intermedia (3,13 μM) del 3% y con la más alta (6,25 μM) del 7%. A nivel estadístico las tres

concentraciones evaluadas —de ambas moléculas— no mostraron una reducción significativa del número de copias virales frente a la infección por DENV en contraste con el CN.

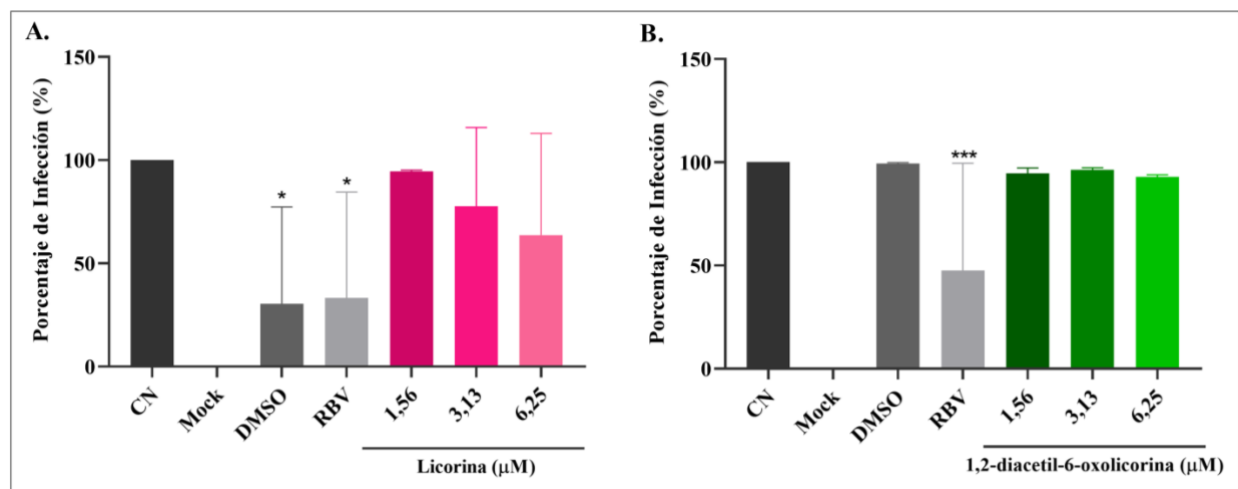


Figura 6. Efecto antiviral determinado mediante la estrategia de pos tratamiento en células Vero infectadas con el stock de DENV-2 (TCID₅₀ 10^{-8,17}) y tratadas durante 48 h con las tres concentraciones subcitotóxicas de **A.** Licorina y **B.** 1,2-diacetil-6-oxolicorina (1,56, 3,12 y 6.25 μM); con sus respectivos controles: control negativo – CN (solo infección), control Mock (sin infección), control positivo (Ribavirina 200 μM - RBV) y control del vehículo (DMSO 0,02%). Porcentaje de infección (%) en función del tratamiento calculado a partir de las cuantificaciones por RT-qPCR; tomando el Cq obtenido con las muestras del CN como el 100%. Análisis estadístico: ANOVA de una vía corregido para comparaciones múltiples mediante el análisis *post hoc* de Dunnett para comparar las diferencias entre el CN (sin molécula) y los demás tratamientos; *p < 0,05, *** p < 0,001.

Es de destacar que en el conjunto de muestras y controles de la estrategia antiviral con licorina se obtuvo una disminución —estadísticamente significativa (p<0,05)— en las muestras del control del vehículo (CV) que corresponde a células Vero infectadas y tratadas con DMSO al 0,02%; concentración a la cual se encuentra en los tratamientos de las moléculas. Al estar a una concentración tan baja no se esperaba un efecto en el porcentaje de infección y, por tanto, no se esperaba un posible efecto de licorina y su derivado. En la literatura se ha reportado que el DMSO puede inducir estrés oxidativo, elevar niveles de oxígeno y de esta manera, actuar como agente antiviral⁷⁹⁻⁸¹. En un artículo se reportó que el DMSO bloqueó la infección *in vitro* de HSV-1 — virus del herpes simple tipo 1— en diferentes tipos de células, con una concentración inhibidora del 50% (IC₅₀) del 0,7 al 2%; dependiendo de la multiplicidad de la infección del virus⁸². Esto sugiere que puede inhibir la replicación viral y, por tanto, tener potencial para actuar como agente antiviral. Sin embargo, no se ha reportado un efecto antiviral a una baja concentración como

0,02%, ni contra la infección de DENV-2. Se sugiere realizar más réplicas biológicas en futuros estudios o probar distintas concentraciones de DMSO, para así determinar si se debe cambiar de solvente o si fue un resultado atípico.

La disminución en la infección de DENV-2 dependiente de la dosis de licorina observada (Figura 2) es lo esperado con respecto a lo reportado en la literatura para esta molécula. Donde se ha reportado que esta tiene actividad inhibidora —dependiente de la dosis⁸³— de amplio espectro contra múltiples virus^{17,84–86}; entre estos el DENV⁸⁷. Además, se ha explorado su mecanismo de acción y se ha descrito que ejerce su actividad antiviral mediante la supresión de la replicación del ARN viral²⁶.

En el caso de 1,2-diacetil-6-oxolicorina, los resultados indican que no tiene efecto anti-DENV-2. Esto es acorde con el único estudio donde se ha probado su efecto antiviral frente a la infección de este virus (DENV-2); así como contra el virus del Nilo Occidental (WNV), virus de la Fiebre Amarilla (YFV), virus de la Encefalitis Equina del Oeste (WEEV) y virus de la Estomatitis Vesicular (VSV). En este reportan un valor de concentración efectiva 50 (EC50) promedio —frente a la infección de los cinco virus mencionados— de 300 μM , presentando potencias antivirales más bajas en contraste a la licorina que presentó un EC50 promedio de 0,23 μM ⁵¹; EC50 es la concentración o dosis efectiva para producir el 50% de una respuesta máxima⁸⁸.

Sin embargo, los resultados no son acordes con lo reportado en otros estudios en los que se ha visto que derivados acetilados han exhibido actividad anti-DENV alta²⁶, anti-VHC (virus de la hepatitis C), y anti-EV71 (enterovirus 71)⁸⁹. Además, en un estudio se reportó que derivados de licorina diacetilados tuvieron actividad antiviral más fuerte frente a la infección de VHC que los monoacetilados o dimetilados⁵⁰. En otro caso, de Castro Barbosa y colaboradores (2022) obtuvieron que dos derivados acetilados (1-acetillicorina y 1,2-diacetillicorina) no presentaron actividad antiviral contra DENV-2 y actividad débil contra ZIKV. Ellos sugieren que las diferencias entre sus resultados y los de otros autores —que emplean las mismas moléculas— se puede deber a las diferentes líneas celulares y metodologías de cuantificación viral empleadas¹⁷.

Con base en los resultados obtenidos en el grupo de investigación de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Icesi con la molécula 6-oxolicorina frente a la infección de ZIKV, con la cual se obtuvo baja citotoxicidad y una disminución promedio del 40% de infección en pos tratamiento⁵², se podría esperar que compuestos con esta modificación en el C-6 tuvieran un comportamiento similar. Sin embargo, en este estudio también resaltan que el efecto antiviral se vio ligeramente afectado—en contraste con el porcentaje de disminución de licorina del 50%—⁵² con la conversión del nitrógeno básico del compuesto original en una amida. Chen y colaboradores (2015) reportan resultados similares, tres derivados diferentes con este cambio presentaron una actividad anti-VHC considerablemente menor a la de licorina; sin importar los grupos sustituyentes en el C-1 y C-2⁵⁰. Por tanto, se podría decir que el nitrógeno básico parece ser importante para la actividad biológica y antiviral de la licorina^{50,52}.

4. Conclusiones

Este estudio permitió confirmar la citotoxicidad del alcaloide licorina reportada en la literatura y se determinó que las modificaciones en el C-1 y C-2 de la licorina de tipo acetilación, junto con el cambio del nitrógeno básico del compuesto original en una amida disminuyen la citotoxicidad de la molécula incluso a altas concentraciones ($CC50 > 200 \mu M$).

Dado que las cuantificaciones de las muestras de la estrategia antiviral se encuentran por fuera de los límites de detección de la curva y en ciclos tardíos ($C_q > 37$), no fue posible determinar el número de copias virales. Para obtener muestras que permitan una cuantificación absoluta y resultados más consistentes y robustos a nivel estadístico, se recomienda emplear titulaciones más altas (C_q mínimo de 10) de DENV-2 en estudios futuros. Además, se sugiere evaluar concentraciones más altas de 1,2-diacetil-6-oxolicorina, dada su baja citotoxicidad, para observar un posible efecto antiviral.

5. Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a mi tutora, Juliana Fernández BSc, por compartir conmigo su emoción y amor genuino por nuestra carrera y la investigación. Su guía paciente y su apoyo incondicional han sido fundamentales para mi crecimiento tanto profesional como personal.

A mi tutor, Álvaro Barrera PhD, por estar siempre pendiente y ser un apoyo constante en este proceso. Por su generosidad al compartir su tiempo y conocimiento. Sus valiosos consejos han sido invaluable para la culminación de este proceso.

Agradezco a mi profesora Paola Caicedo PhD, por compartir su tiempo y experiencia en el mundo de la virología. Su guía fue fundamental en momentos de gran incertidumbre.

A Mateo Peña, quien llegó a completar nuestro equipo, por enseñarme a través de su ejemplo a ser valiente y creer en mí misma. Su actitud positiva y su perseverancia fueron una fuente de inspiración.

A mis padres, Jaya Bookwalter y Roberto Nahuel, por su amor y apoyo incondicional.

A mi hermana, Camila Nahuel, que desde la distancia me acompañó en cada fase de este proyecto, por escucharme y emocionarse conmigo.

A Naim Sadeghian, por apoyarme en cada paso y decisión que condujo a esta oportunidad.

Gracias.

6. Referencias Bibliográficas

1. Schaefer, T. J., Panda, P. K. & Wolford, R. W. Dengue Fever. *BMJ Best Practice* 5–6 (2022).
2. Gubler, D. J. DENGUE VIRUSES (FLAVIVIRIDAE). *Encyclopedia of Virology* 375–384 (1999) doi:10.1006/RWVI.1999.0069.
3. Bhowmik, K. K., Ferdous, J., Baral, P. K. & Islam, M. S. Recent outbreak of dengue in Bangladesh: A threat to public health. *Health Sci Rep* **6**, (2023).
4. Murugesan, A. & Manoharan, M. Dengue Virus. *Emerging and Reemerging Viral Pathogens* 281 (2020) doi:10.1016/B978-0-12-819400-3.00016-8.
5. Sabir, M. J., Al-Saud, N. B. S. & Hassan, S. M. Dengue and human health: A global scenario of its occurrence, diagnosis and therapeutics. *Saudi J Biol Sci* **28**, 5074–5080 (2021).
6. Zerfu, B., Kassa, T. & Legesse, M. Epidemiology, biology, pathogenesis, clinical manifestations, and diagnosis of dengue virus infection, and its trend in Ethiopia: a comprehensive literature review. *Tropical Medicine and Health* 2023 51:1 **51**, 1–20 (2023).
7. Nanaware, N., Banerjee, A., Bagchi, S. M., Bagchi, P. & Mukherjee, A. Dengue Virus Infection: A Tale of Viral Exploitations and Host Responses. *Viruses* 2021, Vol. 13, Page 1967 **13**, 1967 (2021).
8. Wilder-Smith, A., Ooi, E. E., Horstick, O. & Wills, B. Dengue. *The Lancet* **393**, 350–363 (2019).
9. Khan, M. B. *et al.* Dengue overview: An updated systemic review. *J Infect Public Health* **16**, 1625–1642 (2023).
10. Guzman, M. G., Fuentes, O., Martinez, E. & Perez, A. B. Dengue. *International Encyclopedia of Public Health* 233–257 (2017) doi:10.1016/B978-0-12-803678-5.00103-X.
11. Lupi, O. *et al.* Hemorrhagic Fever and Arboviruses. *Tropical Dermatology: Second Edition* 127–151 (2017) doi:10.1016/B978-0-323-29634-2.00012-2.
12. Kok, B. H. *et al.* Dengue virus infection – a review of pathogenesis, vaccines, diagnosis and therapy. *Virus Res* **324**, 199018 (2023).
13. Lee, M. F., Wu, Y. S. & Poh, C. L. Molecular Mechanisms of Antiviral Agents against Dengue Virus. *Viruses* **15**, (2023).

14. Yacoub, S. & Farrar, J. Dengue. *Manson's Tropical Diseases: Twenty-Third Edition* 162-170.e2 (2014) doi:10.1016/B978-0-7020-5101-2.00016-9.
15. World Health Organization. Dengue and severe dengue. *World Health Organization* <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> (2023).
16. Bhatt, S. *et al.* The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013 496:7446 **496**, 504–507 (2013).
17. de Castro Barbosa, E. *et al.* Searching for plant-derived antivirals against dengue virus and Zika virus. *Virol J* **19**, 31 (2022).
18. Ong, A., Sandar, M., Chen, M. I. & Sin, L. Y. Fatal dengue hemorrhagic fever in adults during a dengue epidemic in Singapore. *Int J Infect Dis* **11**, 263–267 (2007).
19. Guo, C. *et al.* Global epidemiology of dengue outbreaks in 1990–2015: A systematic review and meta-analysis. *Front Cell Infect Microbiol* **7**, 317 (2017).
20. Obi, J. O. *et al.* Current Trends and Limitations in Dengue Antiviral Research. *Tropical Medicine and Infectious Disease* 2021, Vol. 6, Page 180 **6**, 180 (2021).
21. Zambrano Hernandez, C. del P. *Protocolo de Vigilancia En Salud Pública de Dengue*. https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Lineamientos/Pro_Dengue.pdf (2022).
22. Organización Panamericana de la Salud. Dengue. <https://www.paho.org/es/temas/dengue> (2024).
23. Instituto Nacional de Salud. *Boletín Epidemiológico Semanal - Semana Epidemiológica 21 (19 al 25 de Mayo de 2024)*. https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2024_Boleti%CC%81n_epidemiologico_semana_21.pdf (2024).
24. Organización Panamericana de la Salud. *Boletín Arbovirosis 2022 -Actualización Epidemiológica Semanal Para Dengue, Chikunguña y Zika En 2022*. <https://www3.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue/boletin-anual-arbovirosis-2022.html> (2022).
25. Castrillón, J. C., Castaño, J. C. & Urcuqui, S. Dengue en Colombia: diez años de evolución. *Revista chilena de infectología* **32**, 142–149 (2015).
26. Wang, P. *et al.* Anti-dengue-virus activity and structure-activity relationship studies of lycorine derivatives. *ChemMedChem* **9**, 1522–1533 (2014).

27. Simmons, C. P., Whitehorn, J., Anders, K. & Van Nguyen, V. C. Dengue and Chikungunya. *Infectious Diseases, 2-Volume Set* 1119-1122.e1 (2017) doi:10.1016/B978-0-7020-6285-8.00133-7.
28. Rather, I. A. *et al.* Prevention and control strategies to counter dengue virus infection. *Front Cell Infect Microbiol* **7**, 279776 (2017).
29. Thomas, S. J. & Yoon, I. K. A review of Dengvaxia®: development to deployment. *Hum Vaccin Immunother* **15**, 2295–2314 (2019).
30. Bowman, L. R., Donegan, S. & McCall, P. J. Is Dengue Vector Control Deficient in Effectiveness or Evidence?: Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* **10**, e0004551 (2016).
31. Reiner, R. C. *et al.* Quantifying the Epidemiological Impact of Vector Control on Dengue. *PLoS Negl Trop Dis* **10**, e0004588 (2016).
32. Byrd, C. M. *et al.* A novel inhibitor of dengue virus replication that targets the capsid protein. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 15–25 (2013).
33. Ka, S. *et al.* Amaryllidaceae Alkaloid Cherylline Inhibits the Replication of Dengue and Zika Viruses. *Antimicrob Agents Chemother* **65**, (2021).
34. Saxena, S. K., Elahi, A., Gadugu, S. & Prasad, A. K. Zika virus outbreak: an overview of the experimental therapeutics and treatment. *Virusdisease* **27**, 111–115 (2016).
35. Nair, J. J. & van Staden, J. Antiviral Effects of the Plant Family Amaryllidaceae. *Nat Prod Commun* **18**, (2023).
36. Evdokimov, N. M. *et al.* In Search of a Cytostatic Agent Derived from the Alkaloid Lycorine: Synthesis and Growth Inhibitory Properties of Lycorine Derivatives. *Bioorg Med Chem* **19**, 7252 (2011).
37. McNulty, J., Nair, J. J., Little, J. R. L., Brennan, J. D. & Bastida, J. Structure-activity studies on acetylcholinesterase inhibition in the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids. *Bioorg Med Chem Lett* **20**, 5290–5294 (2010).
38. Lamoral-Theys, D. *et al.* Lycorine and its Derivatives for Anticancer Drug Design. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **10**, 41–50 (2010).
39. Saltan Çitoğlu, G., Bahadır Acikara, O., Sever Yilmaz, B. & Özbek, H. Evaluation of analgesic, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of lycorine from *Sternbergia fisheriana* (Herbert) Rupr. *Fitoterapia* **83**, 81–87 (2012).

40. Cedrón, J. C., Gutiérrez, D., Flores, N., Ravelo, Á. G. & Estévez-Braun, A. Synthesis and antiparasmodial activity of lycorine derivatives. *Bioorg Med Chem* **18**, 4694–4701 (2010).
41. Hao, B., Shen, S. F. & Zhao, Q. J. Cytotoxic and Antimalarial Amaryllidaceae Alkaloids from the Bulbs of *Lycoris radiata*. *Molecules* 2013, Vol. 18, Pages 2458-2468 **18**, 2458–2468 (2013).
42. Ločárek, M. *et al.* Antifungal and Antibacterial Activity of Extracts and Alkaloids of Selected Amaryllidaceae Species. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000912> **10**, (2015).
43. Bendaif, H. *et al.* Antibacterial activity and virtual screening by molecular docking of lycorine from *Pancreatium foetidum* Pom (Moroccan endemic Amaryllidaceae). *Microb Pathog* **115**, 138–145 (2018).
44. Chen, H. *et al.* Antiviral activity of lycorine against Zika virus in vivo and in vitro. *Virology* **546**, 88–97 (2020).
45. Renard-Nozaki, J., Kim, T., Imakura, Y., Kihara, M. & Kobayashi, S. Effect of alkaloids isolated from Amaryllidaceae on herpes simplex virus. *Res Virol* **140**, 115–128 (1989).
46. Liu, J. *et al.* Lycorine reduces mortality of human enterovirus 71-infected mice by inhibiting virus replication. *Virol J* **8**, (2011).
47. Roy, M. *et al.* Lycorine: A prospective natural lead for anticancer drug discovery. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **107**, 615–624 (2018).
48. Masi, M. *et al.* Cytotoxicity and Antiviral Properties of Alkaloids Isolated from *Pancreatium maritimum*. *Toxins (Basel)* **14**, (2022).
49. Nair, J. J. & Van Staden, J. Cytotoxicity Studies of Lycorine Alkaloids of the Amaryllidaceae. <https://doi.org/10.1177/1934578X1400900834> **9**, 1193–1210 (2014).
50. Chen, D. *et al.* Design, Synthesis and Structure-Activity Relationship Optimization of Lycorine Derivatives for HCV Inhibition. *Scientific Reports* 2015 5:1 **5**, 1–9 (2015).
51. Zou, G. *et al.* A single-amino acid substitution in West Nile virus 2K peptide between NS4A and NS4B confers resistance to lycorine, a flavivirus inhibitor. *Virology* **384**, 242–252 (2008).
52. Cabrera Perdomo, J. Evaluación in silico e in vitro de la Licorina y sus derivados por síntesis química, 6- oxolicorina y 2-Acetil-licorina, como potenciales inhibidores de la replicación del virus del Zika en células VERO. (Universidad Icesi, Cali, 2021).

53. Diaz Moreno, N. Determinación in vitro del potencial antiviral de los alcaloides sintéticos clorhidrato de licorina y 1,2-diacetillicorina frente a la infección por el virus del Zika en células Vero. (Universidad Icesi, 2021).
54. Silva, N. M., Santos, N. C. & Martins, I. C. Dengue and Zika Viruses: Epidemiological History, Potential Therapies, and Promising Vaccines. *Trop Med Infect Dis* **5**, (2020).
55. Gutierrez, M. I., Cabrera, J. & Díaz, N. *PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR (POE) - Mantenimiento y Criopreservación de Células Vero*. (2021).
56. Gerlier, D. & Thomasset, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods* **94**, 57–63 (1986).
57. Berridge, M. V. & Tan, A. S. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Arch Biochem Biophys* **303**, 474–482 (1993).
58. Promega. *PGEM(R)-T and PGEM(R)-T Easy Vector Systems Technical Manual*. (2021).
59. Chen, H. *et al.* Antiviral activity of lycorine against Zika virus in vivo and in vitro. *Virology* **546**, 88–97 (2020).
60. Quintana, V. M. *et al.* Antiviral activity of the natural alkaloid anisomycin against dengue and Zika viruses. *Antiviral Res* **176**, (2020).
61. Lai, Z. Z., Ho, Y. J. & Lu, J. W. Harringtonine Inhibits Zika Virus Infection through Multiple Mechanisms. *Molecules* **25**, (2020).
62. Chang, J. *et al.* Combination of α -glucosidase inhibitor and ribavirin for the treatment of dengue virus infection in vitro and in vivo. *Antiviral Res* **89**, 26–34 (2011).
63. Lin, Y. L. *et al.* Heparin inhibits dengue-2 virus infection of five human liver cell lines. *Antiviral Res* **56**, 93–96 (2002).
64. Madhry, D. *et al.* Synergistic correlation between host angiogenin and dengue virus replication. *RNA Biol* **20**, 805–816 (2023).
65. De, D. R., Aguayo, A. & Rueda, A. Problema bioquímico: Determinación del ciclo umbral y la eficiencia para la PCR cuantitativa en tiempo real. *REB. Revista de educación bioquímica* **32**, 36–39 (2013).
66. Prada-Arismendy, J. & Castellanos, J. E. Real time PCR. Application in dengue studies. *Colomb Med* **42**, 243–58 (2011).

67. Thermo Fisher Scientific Inc. *Real-Time PCR Handbook*. (2014).
68. Bio-Rad Laboratories, I. *Real-Time PCR Applications Guide*. https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf (2006).
69. Torres-Flores, J. M., Reyes-Sandoval, A. & Salazar, M. I. Dengue Vaccines: An Update. *BioDrugs* **36**, 325–336 (2022).
70. Pires De Mello, C. P., Drusano, G. L., Rodriguez, J. L., Kaushik, A. & Brown, A. N. Antiviral Effects of Clinically-Relevant Interferon- α and Ribavirin Regimens against Dengue Virus in the Hollow Fiber Infection Model (HFIM). *Viruses* **10**, (2018).
71. Talemi, S. R. *et al.* Dengue virus is sensitive to inhibition prior to productive replication. *Cell Rep* **37**, (2021).
72. Rattanaburee, T. *et al.* Inhibition of dengue virus production and cytokine/chemokine expression by ribavirin and compound A. *Antiviral Res* **124**, 83–92 (2015).
73. Kamiyama, N. *et al.* Ribavirin inhibits Zika virus (ZIKV) replication in vitro and suppresses viremia in ZIKV-infected STAT1-deficient mice. *Antiviral Res* **146**, 1–11 (2017).
74. Kim, J. A., Seong, R. K., Kumar, M. & Shin, O. S. Favipiravir and Ribavirin Inhibit Replication of Asian and African Strains of Zika Virus in Different Cell Models. *Viruses* *2018, Vol. 10, Page 72* **10**, 72 (2018).
75. Russmann, S., Grattagliano, I., Portincasa, P., Palmieri, V. O. & Palasciano, G. Ribavirin-Induced Anemia: Mechanisms, Risk Factors and Related Targets for Future Research. *Curr Med Chem* **13**, 3351–3357 (2006).
76. Aronson, J. K. Ribavirin. *Meyler's Side Effects of Drugs* 115–129 (2016) doi:10.1016/B978-0-444-53717-1.01403-7.
77. Prediger, E. *et al.* Real-time qPCR guide: Part 3-troubleshooting First edition Managing editors.
78. Stratagene. *Introduction to Quantitative PCR Methods and Application Guide*. <https://www.gene-quantification.de/qpcrGuide-Stratagene.pdf> (2004).
79. Hoang, B. X., Hoang, H. Q. & Han, B. Zinc Iodide in combination with Dimethyl Sulfoxide for treatment of SARS-CoV-2 and other viral infections. *Med Hypotheses* **143**, 109866 (2020).
80. Capriotti, K. & Capriotti, J. A. Dimethyl Sulfoxide: History, Chemistry, and Clinical Utility in Dermatology. *J Clin Aesthet Dermatol* **5**, 24 (2012).

81. Huang, S. H., Wu, C. H., Chen, S. J., Sytwu, H. K. & Lin, G. J. Immunomodulatory effects and potential clinical applications of dimethyl sulfoxide. *Immunobiology* **225**, (2020).
82. Aguilar, J. S., Roy, D., Ghazal, P. & Wagner, E. K. Dimethyl sulfoxide blocks herpes simplex virus-I productive infection in vitro acting at different stages with positive cooperativity. Application of micro-array analysis. *BMC Infect Dis* **2**, 1–10 (2002).
83. Abookleesh, F. L., Al-Anzi, B. S. & Ullah, A. Potential Antiviral Action of Alkaloids. *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 903 **27**, 903 (2022).
84. Hwang, Y. C., Chu, J. J. H., Yang, P. L., Chen, W. & Yates, M. V. Rapid identification of inhibitors that interfere with poliovirus replication using a cell-based assay. *Antiviral Res* **77**, 232–236 (2008).
85. Li, S. Y. *et al.* Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. *Antiviral Res* **67**, 18–23 (2005).
86. Renard-Nozaki, J., Kim, T., Imakura, Y., Kihara, M. & Kobayashi, S. Effect of alkaloids isolated from Amaryllidaceae on herpes simplex virus. *Res Virol* **140**, 115–128 (1989).
87. Gabrielsen, B. *et al.* Antiviral (RNA) activity of selected Amaryllidaceae isoquinoline constituents and synthesis of related substances. *J Nat Prod* **55**, 1569–1581 (1992).
88. Waller, D. G. & Sampson, A. P. Principles of pharmacology and mechanisms of drug action. *Medical Pharmacology and Therapeutics* 3–31 (2018) doi:10.1016/B978-0-7020-7167-6.00001-4.
89. Guo, Y. *et al.* A conserved inhibitory mechanism of a lycorine derivative against enterovirus and hepatitis C virus. *Antimicrob Agents Chemother* **60**, 913–924 (2016).

7. Anexos

Anexo 1. Protocolo para la síntesis de cDNA con *M—MuLV Reverse Transcriptase*.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN 1 MX (VF=20ul)
<i>Primer Reverse</i> (50 µM)	5 µM	2
dNTPs 10 mM	0,5 mM	1
buffer 10X M—MuLV	1X	2
Enzima <i>M—MuLV—RT</i> (200 U/µl)	10 U/µL	1
Agua DEPC		4
RNA DENV-2		10
Volumen final		20

Control Negativo	Muestra
10uL mix	10uL mix
10uL agua	10uL muestra

TERMOPERFIL	
TEMPERATURA	TIEMPO
25°C	5 minutos
42°C	60 minutos
65°C	20 minutos
4°C	INFINITO

Anexo 2. Protocolo para la qPCR con *Luna universal qPCR*.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN 1 MX (VF=10ul)
<i>Luna universal qPCR master mix 2X</i>	1X	5
<i>Primer foward (10uM)</i>	0,25uM	0,25
<i>Primer Reverse (10uM)</i>	0,25uM	0,25
Agua DEPC		3,5
Dilución plásmido/cDNA	<100ng	1
Volumen Final		10

TERMOPERFIL		
TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
95°C	1 min	
95°C	15 seg	40 ciclos
60°C	30 seg	