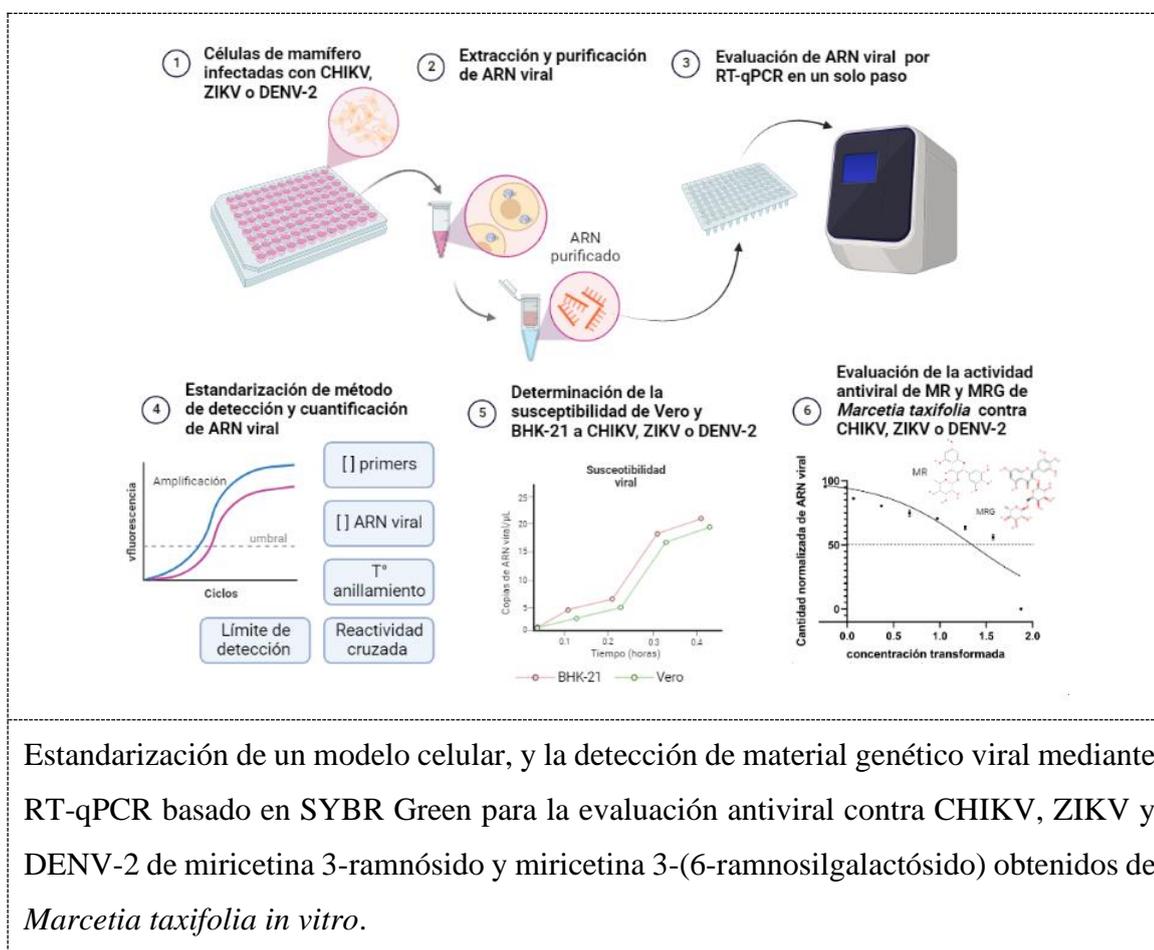


Determinación de la actividad antiviral *in vitro* de derivados de miricetina de *Marcetia taxifolia* contra los virus del chikungunya, zika y dengue.

Determination of the *in vitro* antiviral activity of myricetin derivatives from *Marcetia taxifolia* against chikungunya, zika and dengue viruses.

Graphical Abstract (GA)



Determinación de la actividad antiviral *in vitro* de derivados de miricetina de *Marcetia taxifolia* contra los virus del chikungunya, zika y dengue.

Determination of the *in vitro* antiviral activity of myricetin derivatives from *Marcetia taxifolia* against chikungunya, zika and dengue viruses.

Andrés Felipe Cuéllar
Quimbaya

* Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.

Dirigido por: Mónica Losada
Barragán, MSc, PhD.
Yulieth Alexandra Upegui
Zapata, MSc, PhD

Resumen

Los virus zika, dengue y chikungunya están implicados en epidemias emergentes y reemergentes en países tropicales y subtropicales como Colombia, convirtiéndose en un problema de salud pública, con impacto negativo en la calidad de vida de la población debido a la morbilidad asociadas a sus secuelas. Hoy en día no existe un tratamiento antiviral específico, solo para dengue se cuenta con una vacuna de la cual no se tiene claridad en su eficacia. Lo que hace primordial el desarrollo de agentes terapéuticos. Las plantas son un punto clave en la búsqueda de nuevas moléculas con potencial acción biológica, ya que sus compuestos tienen propiedades medicinales, *Marcetia taxifolia* es un arbusto de la familia Melastomataceae, para la cual se han descrito metabolitos secundarios con actividad antiviral *in vitro* contra el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1. Las evaluaciones preclínicas de potenciales antivirales requieren métodos confiables y reproducibles. Por ello se estandarizó un método de RT-qPCR para la detección y cuantificación de ARN viral a partir de cultivos celulares, con eficiencias del 100.6%, 99.63% y 100.8% , para chikungunya, zika y dengue-2 respectivamente. Se seleccionó BHK-21 como la línea celular que permite mayor replicación viral de los aislamientos clínicos respecto a Vero. Adicionalmente, la actividad antiviral de derivados del extracto de *Marcetia taxifolia* miricetina-3-ramnósido y miricetina-3-(6-ramnogalactosido) se evaluó en el modelo *in vitro* desarrollado, obteniendo que los dos compuestos presentaron CE₅₀ promisorias < 50µg/mL contra los tres virus, por otro lado la menor efectividad de dio con miricetina-3-(6-ramnogalactosido) en el caso de chikungunya y zika. Estos datos proporcionan la primera evidencia de la actividad anti-chikungunya, anti-zika y anti-dengue-2 *in vitro* de miricetina-3-ramnósido y miricetina-3-(6-ramnogalactosido).

Palabras claves: Arbovirus, zika, dengue, chikungunya, antiviral, flavonoides de miricetina-3-ramnósido y miricetina-3-(6-ramnogalactosido).

Determinación de la actividad antiviral *in vitro* de derivados de miricetina de *Marcetia taxifolia* contra los virus del chikungunya, zika y dengue.

Determination of the *in vitro* antiviral activity of myricetin derivatives from *Marcetia taxifolia* against chikungunya, zika and dengue viruses.

Abstract

Zika, dengue and chikungunya viruses are implicated in emerging and re-emerging epidemics in tropical and subtropical countries such as Colombia, becoming a public health problem, with a negative impact on the quality of life of the population due to the morbidity and mortality associated with their sequelae. Today there is no specific antiviral treatment, only for dengue there is a vaccine whose efficacy is not clear. This makes the development of therapeutic agents essential. Plants are a key point in the search for new molecules with potential biological action since their compounds have medicinal properties. *Marcetia taxifolia* is a shrub of the Melastomataceae family, for which secondary metabolites have been described with *in vitro* antiviral activity against the human immunodeficiency virus type 1. Preclinical evaluations of potential antivirals require reliable and reproducible methods. For this reason, an RT-qPCR method was standardized for the detection and quantification of viral RNA from cell cultures, with efficiencies of 100.6%, 99.63% and 100.8%, for chikungunya, zika and dengue-2, respectively. BHK-21 was selected as the cell line that allows greater viral replication of clinical isolates compared to Vero. Additionally, the antiviral activity of derivatives of the extract of *Marcetia taxifolia* myricetin-3-rhamnoside and myricetin-3-(6-rhamnogalactoside) was evaluated in the developed *in vitro* model, obtaining that the two compounds presented promising $EC_{50} < 50\mu\text{g/mL}$ against the three viruses, on the other hand the lower effectiveness of myricetin-3-(6-rhamnogalactoside) in the case of chikungunya and zika. These data provide the first evidence for the *in vitro* anti-chikungunya, anti-Zika and anti-dengue-2 activity of myricetin-3-rhamnoside and myricetin-3-(6-rhamnogalactoside).

Keywords: Arbovirus, Zika, dengue, chikungunya, antiviral, myricetin-3-rhamnoside and myricetin-3-(6-rhamnogalactoside) flavonoids.

Introducción

Las infecciones virales transmitidas por vectores, por lo general del género *Aedes* (Grillet & Ventura, 2016) representan más del 17% de todas las enfermedades infecciosas, siendo más importantes que otros agentes microbianos causando 700.000 muertes cada año (Buendía-Atencio et al., 2021). Esto genera graves problemas de salud y pérdida de calidad de vida en un gran segmento de la población que habita zonas endémicas; países tropicales y subtropicales como Colombia. La Organización Panamericana de la Salud clasifica estas enfermedades con base a su frecuencia y prevalencia, en primer lugar, dengue, extendido en casi todos los países de América Latina, en segundo lugar, chikungunya y, en tercer lugar, zika seguido de enfermedades como la malaria, enfermedad de chagas, leishmaniasis y fiebre amarilla (Padilla et al., 2017; Weaver & Reisen, 2010).

Las enfermedades virales transmitidas por vectores tienen una alta morbilidad asociada, en Colombia ha habido una progresiva intensificación y expansión de epidemias emergentes como la infección causada por el virus chikungunya (CHIKV) y virus del zika (ZIKV) y reemergentes causadas por el virus dengue (DENV). Debido a las condiciones geográficas hay circulación de los insectos vectores, estimándose para Colombia que 12 millones de personas se encuentren en alto riesgo de contraer la infección (Padilla et al., 2017). Por otra parte, el Instituto Nacional de Salud reportó el primer caso confirmado por laboratorio de chikungunya en el 2014, y hasta la semana epidemiológica (SE) número 32 de 2022 se han notificado al Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila) 90 casos confirmados de chikungunya para el año 2022 (Alvis-Zakzuk et al., 2018; Semana Epidemiológica 33, 2022.). Por otra parte, en el año 2015 se reportó por primera vez un caso de infección por zika, infección que se dispersó rápidamente por casi todo el país notificándose 11.712 casos para ese mismo año (Instituto Nacional de Salud, 2015) y se notifica solo para el año 2021, 117 casos corte a SE 32 de 2022 (Semana Epidemiológica 33, 2022.). Por su parte, dengue en Colombia tiene una de las tasas más rápidas de expansión y su incidencia aumenta año tras año (Castrillón et al., 2015; Padilla et al., 2017), durante las primeras 33 semanas del 2022 se han reportado 40.114 casos (Semana Epidemiológica 33, 2022.).

A nivel taxonómico, CHIKV pertenece al género *Alfavivirus* de la familia *Togaviridae*, es un virus de ARN monocatenario de sentido positivo (Brinton & Basu, 2015; Chen et al., 2017), se encuentran tres genotipos diferentes nombrados de acuerdo a su región de origen: África Occidental, Asia y África Oriental/Central/sudafricana (Rodríguez et al., 2019), la enfermedad se caracteriza por presentar hipertermia, conocida como la fiebre del chikungunya, existe una asociación entre presentar la infección con el riesgo de desarrollar reumatismo inflamatorio crónico y neurológico (Carabali et al., 2019; B. N. R. Jaramillo, 2014; R. Jaramillo & Nelly, 2014; Rodríguez-Morales & Anaya, 2016). ZIKV es un arbovirus de ARN monocatenario de sentido positivo perteneciente al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*, tiene los genotipos, asiático y africano asociados con microcefalia congénita, el síndrome de Guillain-Barré y desordenes neuro inflamatorios (Parra et al., 2016; Rodríguez-Morales et al., 2016; Rodríguez-Morales & Anaya, 2016). DENV comparte el mismo género y familia que ZIKV, tiene 4 serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) (Rodríguez-Morales & Anaya, 2016), el espectro clínico varía desde los pacientes asintomáticos hasta manifestaciones graves reumatológicas y hemorrágicas causados por infecciones secundarias causadas por otros serotipos, que puede causar la muerte de no ser tratadas (Instituto Nacional de Salud, 2022; Rodríguez-Morales & Anaya, 2016).

Desde el 2017 para prevenir la infección por DENV se implementó el biológico inyectable Dengvaxia (CYD-TDV) aprobada por la Agencia Nacional de Medicamentos, para personas con edades entre 9 y 45 años que habitaran en áreas endémicas según indica el fabricante Sanofi Pasteur tras ensayos anteriores (S. P. Lim et al., 2013; Murray et al., 2013); no obstante, existen limitantes para el uso de esta vacuna, dadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Ministerio de Salud Filipinas tras su uso, ya que se informó a finales del 2017 que más de los 830.000 infantes que recibieron la vacuna, alrededor del 90% están en riesgo potencial de presentar una enfermedad más grave ya que estos se habían expuestos a infecciones por cualquier serotipo de dengue anteriormente (Dyer, 2017; Martins et al., 2016). Por su parte para las infecciones por CHIKV y ZIKV, no hay candidatos vacunales probados en ensayos clínicos fase dos (Martins et al., 2016b; Schwameis et al., 2016).

Por todo lo mencionado, la primera línea de defensa contra CHIKV, ZIKV y DENV es evitar las picaduras de mosquitos usando repelentes, pesticidas o barreras físicas, no obstante, estos métodos no logran contener las epidemias, incluso los insectos vectores ya han desarrollado resistencia a los tratamientos químicos disponibles en el mercado (Instituto Nacional de Salud, 2012; Suwanmanee & Luplertlop, 2017). Adicionalmente en Colombia, la deforestación causada por los cultivos ilícitos o la cría de ganado genera que las especies de monos en los bordes de los bosques interactúen con los mosquitos urbanos y forestales, exponiendo poblaciones humanas no rurales a enfermedades arbovirales como son CHIKV, ZIKV y DENV. Otra problemática es la migración relacionada al desplazamiento forzado, la pobreza y sobrepoblación de las urbes de manera descontrolada y ausencia de servicios públicos se convierten en condiciones idóneas para un aumento de los casos por la proliferación de los vectores y aumento del índice de picaduras intradomiciliarios y peridomicilios.(Instituto Nacional de Salud, 2012; Segura et al., 2021a).

Con respecto al tratamiento, no existe ningún agente terapéutico avalado que elimine estos virus en los pacientes infectados, por lo que la terapia está dirigida al manejo de los síntomas, mediante antiinflamatorios no esteroideos que se toman para aliviar la artralgia y la mialgia (Gé Rardin et al., 2008). Por esto, se requiere la búsqueda de compuestos con potencial acción contra estos virus que evite la replicación a nivel intracelular y bloquee el proceso de transmisión al mosquito vector.

La búsqueda de nuevos agentes terapéuticos a partir de productos naturales ofrece una fuente rica en compuestos bioactivos, su alta diversidad estructural se debe a que son metabolitos secundarios (Murali et al., 2015), específicos de especies vegetales, generadas en respuesta a condiciones de estrés celular asociados a supervivencia, respuesta a patógenos y condiciones medio ambientales (J. Xiao, 2017).

Los flavonoides son compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en diferentes familias de vegetales, estos son metabolitos secundarios de bajo peso molecular, con alta diversidad estructural encontrándose en forma de agliconas, glucósidos y derivados metilados (Ninfali et al., 2020) . Los flavonoides se utilizan en la medicina tradicional oriental y tienen actividades antioxidantes,

antitumorales, antiproliferativas, antiinflamatorias, proapoptóticas y antivirales probados por ensayos de laboratorio (Jucá et al., 2020; Kumar & Pandey, 2013; Lani et al., 2015, 2016; Prithviraj Karak, 2019; Zakaryan et al., 2017). *Marcetia sp* planta neotropical, cuenta con más de 40 especies descritas, la especie *Marcetia taxifolia* crece en la cordillera costera, en el norte de los Andes, su importancia en este estudio radica en la presencia de flavonoides relacionados con miricetina para los cuales se ha descrito poseen actividad antiviral. (ONO et al., 1990; Ortega et al., 2019; Pasetto et al., 2014). Ortega y Colaboradores, demostraron que miricetina y sus derivados miricetina 3-ramnósido (MR) y miricetina 3-(6-ramnosilgalactósido) (MRG) (Figura 1) inhiben la actividad de la transcriptasa inversa del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) *in vitro* (Ortega et al., 2017a). Adicionalmente los mismos autores en estudios posteriores reportaron actividad *in vitro* contra el virus de la hepatitis B, el virus del herpes simple y el poliovirus (Ortega et al., 2019).

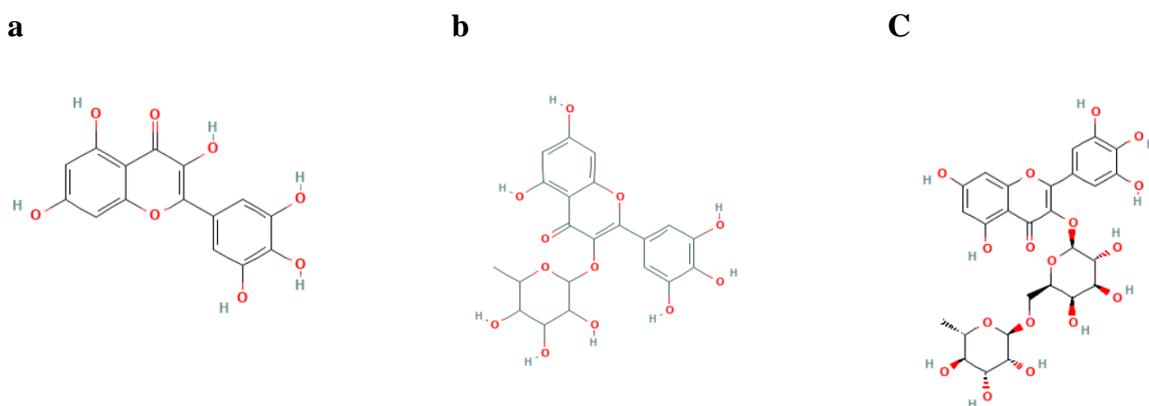


Figura 1. Estructura química de miricetina y sus derivados a) miricetina (M), b) miricetina 3-ramnósido (MR) y c) miricetina 3-(6-ramnosilgalactósido) (MRG). Estructuras tomadas del National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary.

En la búsqueda de nuevos agentes antivirales, es importante contar con modelos eficientes, reproducibles y sensibles, uno de los métodos más utilizados es la inhibición de unidades formadores de placa que hace alusión al daño celular que provocan un número de partículas virales capaces de formar grandes sincitios formando zonas no coloreadas al momento de hacer una tinción, la cual se cuantifica en números enteros. Este es un método tedioso, subjetivo, poco reproducible y de baja sensibilidad (Hope et al., 2010; Matsushita et al., 2006) otro de los métodos usados es la ELISA, con el

problema de que su sensibilidad en estadios tempranos de infección es poco confiable(Boonham et al., 2014; Felmer et al., n.d.; Garcia et al., 1997) ,

De esta manera el objetivo en este estudio fue estandarizar un modelo celular, la detección de material genético viral mediante RT-qPCR basado en SYBR Green para la evaluación de potenciales candidatos antivirales *in vitro*, el modelo se realizó en células de mamífero no humanas susceptibles a CHIKV, ZIKV y DENV-2 que permiten el desarrollo de aislados clínicos de estos tres virus de origen colombiano. Todo ellos con el propósito de evaluar la actividad antiviral de los flavonoides miricetina 3-ramnósido y miricetina 3-(6-ramnosilgalactósido) obtenidos de *Marcetia taxifolia*.

Materiales y Métodos

Se utilizaron dos líneas celulares; células de riñón de mono verde africano (Vero) y células de fibroblastos de riñón Baby Hámster (BHK-21) obtenidas de la Colección Americana de Cultivos por sus siglas en inglés ATCC (American Type Culture Collection); y virus dengue tipo 2 (DENV-2), virus zika (ZIKV) y el virus chikungunya (CHIKV), de aislados clínicos colombianos, donados por el Laboratorio de Virología de la Universidad del Bosque.

1.1. Compuestos puros.

Los compuestos puros se obtuvieron en el Laboratorio de Virología del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). A partir del tallo de *Marctia taxifolia* colectada en el Amazonas Venezolano, este fue sometido por extracción por maceración con metanol (MeOH) y acetato de etilo (ETOAc) de las cuales se obtuvieron dos fracciones purificadas por cromatografía de columna con sílice gel haciendo la elución con CHCl_3 obteniendo dos compuestos: miricetina 3-ramnósido (MR) y miricetina 3-(6-ramnosilgalactósido) (MRG), caracterizados mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos (Baptista et al., 2016)

Las soluciones madre fueron preparadas en dimetilsulfóxido (DMSO) (Corning™) a una concentración de 10mg/mL, y se diluyeron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, LONZA) al momento de realizar las evaluaciones.

1.2. Extracción de ARN viral

El ARN viral se extrajo utilizando un kit comercial de la marca Biomiga Inc. (Ref.VR6568-02) utilizando 100 μL de sobrenadante, por muestra se adicionó 10 μL de proteinasa K, 1 μL de solución L y 150 μL de tampón LYE que contenía β - mercaptoetanol (β -Me) manteniendo la relación de 10 μL de β -Me a 1000 μL de tampón LYE. Las muestras se homogenizaron por pipeteo y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó Isopropanol manteniendo la proporción de (muestra + tampón LYE): isopropanol= 1:1 mezclando suavemente en vortex. seguidamente se transfirió hasta 600 μL de muestra con isopropanol a una columna de separación de ARN y se incubó 1 min para humedecer la columna, pasado el periodo de incubación se centrifugo a 10.000 rpm durante 30

segundos, tras esto, descartó el líquido de elución y, se realizaron dos lavados; el primero agregando 500µL de tampón RB (que contiene isopropanol) seguido por centrifugación a 10.000 rpm por 30 segundos, el segundo agregando 500µL de tampón RNA Wash (que contiene etanol) centrifugando a 10.000 rpm por 30 segundos, desechando el tampón eluido en los dos lavados. Una vez terminado los lavados, se centrifugó la columna vacía a 12.000 rpm por 2 min para eliminar cualquier rastro de etanol y se transfirió la columna a un tubo de 1.5 mL libre de nucleasas, una vez ya la columna instalada, en el tubo se agregaron 40µL de agua tratada con DEPC e incubó por 1 min, para centrifugación final a 10.000 rpm por 30 segundos, este último paso se realizó tres veces, para mejorar la recuperación del ARN total (*The Inventor of EZgene™ and ViraTrap™ Systems Viral RNA Extraction from Respiratory Specimens*, n.d.). Con el ARN obtenido se hicieron alícuotas de 20µL para almacenarse a -80 °C hasta su uso.

La pureza y la cantidad de ARN se determinó por espectrofotometría teniendo en cuenta el parámetro de la absorbancia en las longitudes de onda 260/280 y 260/230 (*T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers*, n.d.) empleando el equipo DS-C Spectrophotometer, marca DeNovix. En adición, la calidad fue evaluada por medio de una electroforesis del ARN mediante el uso de un gel de agarosa al 2.5%, en buffer MOPS 1X e Hydragreen 1 X. La electroforesis se llevó a cabo durante 120 minutos a 100 V. Finalizada la electroforesis el gel fue revelado en un transiluminador UV (Vargas Romero, 2020)

1.3. Estandarización para la detección de ARN viral de CHIKV, ZIKV y DENV-2

1.3.1. Diseño de primers

Para el ensayo de RT-qPCR se diseñaron los primers (forward y reverse) de los genes de interés, gen NS5 para ZIKV y DENV-2, y nsP1 para el caso de CHIKV. Mediante la herramienta NCBI-gene donde se encontró la secuencia del transcrito de interés. Posteriormente, con ayuda de la herramienta primer-BLAST se adecuaron los parámetros específicos teniendo en cuenta: Porcentaje de GC (no superior al 55%), tamaño entre 18 - 25 pb, temperatura de anillamiento entre 55 - 60 °C y un amplicón entre 50 - 110 pb (Vargas Romero, 2020). Las secuencias de primers que se tuvieron en cuenta en el

paso anterior, se analizaron en IDT-Oligo Analyzer (Vargas Romero, 2020) se seleccionaron con valores de ΔG cercanos a cero, como máximo -9 y -7 en el caso de la formación de dímeros y hairpin, respectivamente. Finalmente, en nucleotide-BLAST se confirmó que los primers no anillaran con ADN genómico y ARN del modelo (mono verde africano y hámster) para garantizar la especificidad (Vargas Romero, 2020).

1.3.2. Condiciones de ciclos térmicos para ensayos de RT-qPCR

La temperatura de anillamiento de los genes seleccionados fue optimizada evaluando tres temperaturas (60, 62 y 64 °C para CHIKV y ZIKV y de 62, 64, 66 °C para DENV-2), teniendo en cuenta las temperaturas de anillamiento obtenidas en la herramienta de diseño de primers “Primer blast” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), mediante los valores de Ct y de la curva de disociación.

En cada reacción de 5 μ L, se agregó 1.9 μ L de ARN de ZIKV, DENV-2 o CHIKV probando tres concentraciones de partida diferentes (100, 10 y 1 ng para el caso de CHIKV y ZIKV, y de 10, 1 y 0.1ng para DENV-2), a la mezcla de qMAX Green One-Step RT-qPCR (Accuris PR2120-H-500) que contenía 2.5 μ L de 2X qMax Green One-Step Mix, 0.25 μ L de 20X RTase Blend y 0.8 μ L de cada uno de los primers, probando tres concentraciones diferentes (0.2, 0.3 y 0.4 μ M).

La amplificación se realizó utilizando el termociclador modelo QuantStudio 3 (bloque 96 pozos, 0.2 mL, Applied Biosystems), aplicando un (1) ciclo de 45°C por 10 min, para la retro transcripción, 1 ciclo de 95°C por 2 min para una desnaturalización inicial y la activación de la polimerasa, y 40 ciclos de 95°C por 5 seg (desnaturalización), y las tres temperatura de alineamiento de prueba como se describió, por 30 segundos y elongación de 72°C por 30 seg. El análisis de la curva de fusión se realizó posteriormente a una temperatura de 65 °C por 5 seg a 95 °C por 5 seg para verificar la especificidad del ensayo. Durante las corridas se incluyeron dos controles negativos, Mezcla de RT-qPCR más agua libre de RNAsas (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen™), ARN de células sin infectar, como control positivo se utilizó ARN viral de ZIKV, DENV-2 o CHIKV, cada muestra se analizó por duplicado.

Las cantidades absolutas de ARN viral en las muestras de ZIKV, DENV-2 y CHIKV se midieron con una curva estándar que se generó al cuantificar ARN viral en diluciones seriadas base 1:10 extraído de inóculos provenientes de sobrenadantes de cultivos infectados de ZIKV, DENV-2 y CHIKV de título conocido. Para cada concentración se analizaron replicas biológicas (n=2) y se incluyeron los controles positivos y negativos anteriormente mencionados.

1.3.3. Límite de detección (LoD)

Se realizó un ensayo de RT-qPCR utilizando 10 diluciones en serie 1:10 de ARN de CHIKV, ZIKV y DENV-2 (a partir de 100ng/μL) con 6 réplicas de cada dilución. El LoD se determinó con la última dilución a la cual hubo amplificación.

1.3.4. Reactividad cruzada

Se diseñó un ensayo de RT-qPCR utilizando ARN de CHIKV, ZIKV y DENV-2, de manera simultánea para cada par de primers. Donde la reactividad cruzada se determinó verificando la amplificación cuando se usaban virus diferentes para los primers específicos diseñados.

1.4. Determinación de la susceptibilidad viral de Vero y BHK-21 a CHIKV, ZIKV y DENV-2

Se infectaron células Vero y BHK-21, para ello se sembraron 30.000 células/pozo en microplacas de cultivo de 96 pocillos a una multiplicidad de infección de 10^{-4} TCDI50/ mL por sus siglas en inglés de Tissue Culture Infectious Dose 50%, que hace referencia a la Dosis infecciosa de cultivo de tejidos 50%. Controlando el desarrollo del efecto citopático (CPE de sus siglas en inglés cytopathic effect) que son los cambios morfológicos y de viabilidad celular, visibles por microscopia óptica, se midieron los niveles de ARN de CHIKV y ZIKV mediante RT-qPCR en lisado celular y en sobrenadante recolectados a intervalos de 10 horas hasta llegar a la hora 118 para el de CHIKV y 166 horas para ZIKV, estos intervalos de tiempo fueron definidos de acuerdo con la visualización del CPE por microscopia. Durante las corridas se incluyeron los controles negativos descritos anteriormente.

La cinética de replicación del ARN de DENV-2 se examinó de la misma manera a nivel metodológico que con CHIKV y ZIKV, con la diferencia que para DENV-2 se utilizaron dos multiplicidades de infección (MOI) de, 0.01 y 0.001, adicionalmente los intervalos de recolección del

lisado celular se realizaron en días post infección partiendo del día 1 hasta el día 10, de acuerdo la observación del CPE.

1.5. Evaluación del efecto de los derivados de miricetina de *Marcetia taxifolia* en la carga viral de CHIKV, ZIKV y DENV-2

Para evaluar los efectos citotóxicos de MR y MRG obtenidos y caracterizados de la planta *Marcetia taxifolia*, se llevó a cabo por un ensayo de citotoxicidad sobre células BHK21. Para esto se sembraron 30,000 células/pozo en placas de 96 pozos y se permitió su adherencia durante toda la noche. Las células fueron incubadas por triplicado con diluciones seriadas de cada uno de los compuestos. La viabilidad fue monitorizada a las 72 horas. Pasado el periodo de incubación se adicionaron 10µL de MTT a 5 mg/mL (Roche) e incubando las placas durante 4 horas a 37°C. Posteriormente, el medio fue retirado y se adicionaron 100µL de DMSO para disolver los cristales formados. La placa fue leída a una longitud de onda de 570nm usando un espectrofotómetro de la marca thermo Fisher. la concentración letal cincuenta (CL₅₀), fue calculada usando interpolación logarítmica.

La actividad antiviral de MR y MRG sobre la infección de CHIKV, ZIKV y DENV-2 en células BHK-21 se midió sembrando 30.000 células/pozo en una microplaca de 96 pocillos y se permitió su adherencia toda la noche para obtener una monocapa pre-confluyente. Posteriormente el medio fue removido y se le adiciono el tratamiento con MR y MRG, seguido a esto se le aplico la dilución viral con una multiplicidad de infección 10⁻⁴ TCDI₅₀/mL para CHIKV y ZIKV, y de un MOI de 0,01 para DENV-2, con presencia o ausencia de MR y MRG durante 72 horas para la absorción del virus. Se utilizaron diluciones en serie base 1:2 de MR y MRG, teniendo como punto de partida no alcanzar la CL₅₀ obtenida para los compuestos contra BHK-21. Las placas se incubaron a 37°C. Terminado el tiempo de incubación se recogieron 300µl de sobrenadantes de cultivo, para extracción y purificación el ARN de ZIKV, DENV-2 y CHIKV y se determinó por RT-qPCR con el método seleccionado.

1.6. Análisis estadístico

La curva estándar se realizó usando el promedio de los Ct de al menos 6 repeticiones contra el logaritmo en base 10 de la cantidad la muestras, con una desviación estándar inferior a 0.5. Para

determinar la carga viral o cantidades absolutas de virus se determinó despejando la x de la ecuación de la recta ($y=mx+b$), donde y es el valor del C_t obtenido directamente del equipo de PCR en tiempo real, m hace referencia a la pendiente y b la ordenada al origen de la recta (Álvarez-Díaz et al., 2021a).

Los análisis estadísticos se realizaron usando el software GraphPad Prism, versión 8.0 para Windows. Para determinar las diferencias entre las susceptibilidades de las líneas celulares, se empleó la prueba de t de Student.

Para determinar si los datos de actividad antiviral mostraban una distribución normal se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para comparar las diferencias entre la presencia y ausencia del tratamiento se aplicó una t de Student para datos paramétricos. Donde valores con un $p < 0.05$ son considerados estadísticamente significativos. Adicionalmente estos mismos datos usando logaritmo base 10, posterior a ello se normalizaron los C_t obtenido bajo las condiciones estándar del programa con la finalidad de poder determinar la concentración letal cincuenta (EC_{50}), mediante el algoritmo de dosis-respuesta.

2. Resultados y Discusión

2.1. Estandarización de Rt-qPCR para la detección y cuantificación de CHIKV, ZIKV y DENV-2.

En Colombia, CHIKV, ZIKV y DENV-2 circulan simultáneamente, transmitidos por mosquitos vectores del género *Aedes*, altamente distribuidos en todo el país, generando un riesgo alto de transmisión y de enfermedad asociados a estos patógenos (Álvarez-Díaz et al., 2021a; Segura et al., 2021b) la ausencia de medicamentos y vacunas, demanda que la comunidad científica los desarrolle con urgencia, y eso requiere de métodos eficientes de cuantificación y detección a ARN viral que permita el tamizaje de nuevos compuestos candidatos con actividad antiviral.

Tras la pandemia causada por el COVID-19 (Ishige et al., 2020) , se evidenció la necesidad de metodologías y métodos de alta sensibilidad, reproducibles, con capacidad de llevarse al tamizaje masivo y con baja subjetividad, para la búsqueda de nuevos medicamentos. Características que no cumplían por ejemplo los métodos basados en el estudio del efecto citopático, la detección de antígenos por medio de ELISA, entre otros, es así como los métodos moleculares como la qPCR se ha convertido en la técnica predilecta para estudios de biología básica y aplicada de infecciones virales debido a su alta sensibilidad y la posibilidad de cuantificación absoluta o relativa de la cantidad de partículas virales (Álvarez-Díaz et al., 2019), dentro de las múltiples variedades de qPCR, los modelos “*one step*” o de un solo paso presentan ventajas sobre la Rt-qPCR en dos pasos, al disminuir el tiempo e insumos para obtener un resultados confiable, por esta razón se estandarizó un ensayo de RT-qPCR para la detección de CHIKV, ZIKV y DENV-2 a partir de sobrenadantes y lisados celulares infectados con aislamientos clínicos de los tres agentes virales, para desarrollar un método para la evaluación de actividad antiviral

Inicialmente se realizó el diseño de primers enunciados en la tabla 1. Donde se observa la secuencia obtenida para cada uno de los genes.

Tabla 1. *Primers seleccionados para la detección de CHIKV, ZIKV y DENV-2.*

Primer	Cadena molde	Secuencia	%GC	T_m(°C)	Producto (pb)
nsP1-CHIKV	Forward	ACGTGGATATAGACGCTGACAG	50	60	100
	Reverse	ACGTGGATATAGACGCTGACAG	50		
NS5- ZIKV	Forward	GACTGGGTTCCAACCTGGGAG	60*	60	96
	Reverse	CCACACTCTGTTCCACACCA	55		
NS5- DEN-2	Forward	CTGAGTGGAGTGGGAAGGAGA	55	62*	75
	Reverse	TCCTCCCTCTTTCTTGCTCA	50		

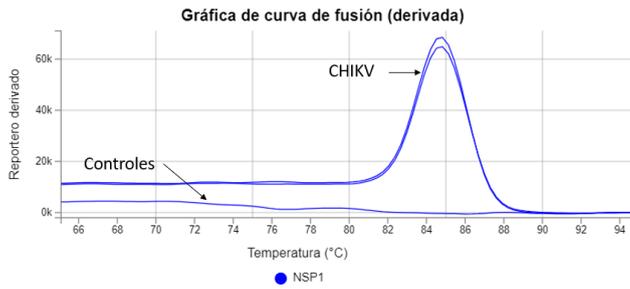
Donde la temperatura de fusión (T_m) es proporcionada por la herramienta NCBI hace referencia a la temperatura donde el 50% de las copias de la secuencia en una reacción se encuentra en una sola hebra, interactuando con secuencias complementarias (Cuevas-Reyes et al., 2016). * Parámetros no ideales.

Teniendo en cuenta la información proporcionada por las herramientas (IDT-Oligo Analyzer, primer-BLAST y nucleotide-BLAST), se evidenció que todos los primers cumplen con la mayoría los parámetros para ser considerados óptimos: temperatura de anillamiento sobre los 60°C a excepción del primer forward de ZIKV, la longitud no supera los 25pb, el producto que se sintetiza a partir de ellos es inferior 110 pb, adicionalmente un porcentaje de guanina-citocina menor a 55% en la mayoría de los casos a excepción del primer forward de ZIKV.

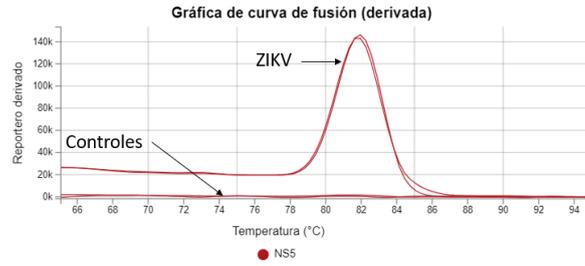
Las curvas de fusión (figuran 2), demuestran la especificidad de los primers, al no verse una amplificación diferente al agente viral esperado para cada prueba, adicionalmente no hay reacciones inespecíficas en los controles negativos.

El experimento realizado para determinar la concentración adecuada de primers mostró que usar concentraciones de 0.3 y 0.4 μM no presenta diferencia significativa con respecto al valor de Ct, a comparación de la condición de 0.2μM en el cual aumenta el número del Ct en más de 4 unidades, por debajo de lo que se considera un buen CT (Ct ideal entre 14-18) (Lanser et al., 2021). Esto permitió elegir a la concentración de 0.4 μM como adecuada para estandarizar las condiciones relacionadas con la concentración de la muestra y no se dé la formación de homodímeros y heterodímeros.

A. CHIKV



B. ZIKV



C. DENV-2

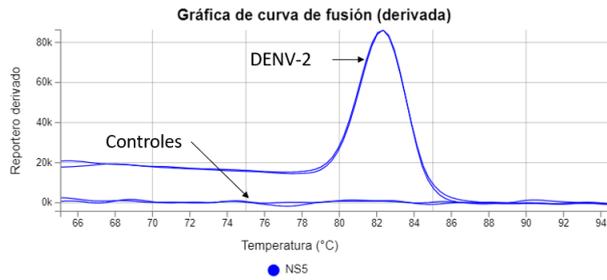


Figura 2. Especificidad de RT-qPCR para la detección de A. CHIKV, B. ZIKV y C. DENV-2. Curva de fusión de el gen nsP1 para CHIKV y de NS5 para ZIKV y DENV-2 donde los picos muestran el valor de la temperatura de fusión $T_m = 85,36$ para el gen nsP1 de CHIKV, $T_m=82,04$ gen NS5 de ZIKV y $T_m=82,20$ para el gen NS5 de DENV-2. Donde los controles fueron agua libre de nucleasa y ARN de células sin infectar. Sin reactividad cruzada ya que los otros virus no amplifican.

Para determinar la concentración de muestra a servir, se tuvo presente el límite máximo que puede soportar el kit de RT-qPCR 100ng, a partir de esto se hicieron diluciones seriadas teniendo en cuenta tres concentraciones para el caso de CHIKV y ZIKV [100, 10 y 1 ng], donde 100 y 10ng no presentaron diferencia en el valor de Ct y se descartaron ya que su pico de fluorescencia estaba en un Ct muy temprano lo cual podría ser una limitante a la hora de cuantificar. Se seleccionó la concentración de 1ng por mostrar un valor de Ct promedio óptimo de 16-17(Lanser et al., 2021). Para el caso de DENV-2 se tomaron concentraciones de 10, 1 y 0.1 ng, ya que a concentraciones mayores se encontraron valores de Ct tempranos, además en las gráficas de amplificación se observó saturación de muestra, seleccionando la concentración de 0.1ng la cual no evidenció ningún rastro de saturación en las gráficas y su valor de Ct fue similar a los obtenidos con CHIKV y ZIKV.

Las curvas estándar fueron realizadas a partir de diluciones en serie de ARN a partir de título conocido de cada uno de los virus, esto permitió la cuantificación absoluta de CHIKV, ZIKV y DENV-

2 en sobrenadantes de cultivos celulares inoculados con alguno de los tres virus. Las eficiencias fueron de 100,6%, 99,63% y 100,8% para CHIKV, ZIKV y DENV-2 respectivamente (figura 3). Además, se confirmó el comportamiento lineal de los ensayos de detección de CHIKV, ZIKV, DENV-2 de acuerdo a los valores de R^2 , que es una medida estadística que sugiere que tan cerca permanecen los datos de una línea de regresión, aceptables y lineales, adicional se considera un valor de R^2 bueno cuando es ≥ 0.95 , como los que se obtuvieron en las curvas estándar. El límite de detección hallado fue de 1.3pg, 0.052pg y 0.0015pg para CHIKV, ZIKV y DENV-2 respectivamente, no se observó reactividad cruzada entre CHIKV, ZIKV y DENV-2 (Figura 2).

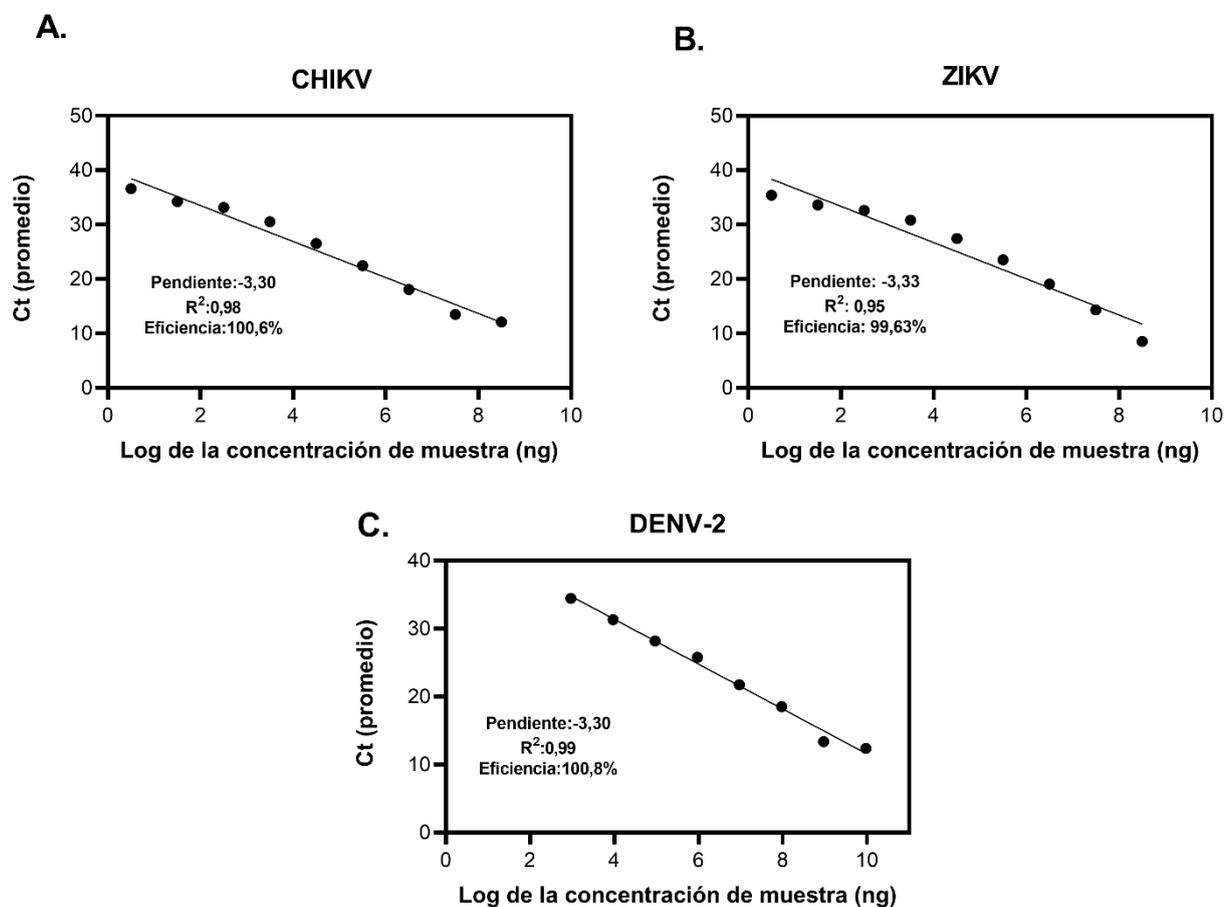


Figura 3. Curva de calibración para cuantificación de la carga viral por RT-qPCR de CHIKV, ZIKV y DENV-2. Se muestra la eficiencia y la linealidad obtenida a partir de diluciones en serie del ARN título viral de A. CHIKV, B. ZIKV y C. DENV-2. Cada punto experimental en la serie de dilución representa al menos 6 repeticiones.

Consolidando nuestros hallazgos se desarrolló un método RT-qPCR que permitió la detección y cuantificación individual CHIKV, ZIKV y DENV-2, este es aplicable en estudios que pretenden

cuantificar el desarrollo de la infección viral *in vitro*.

Adicionalmente nuestro método utilizo SYBR Green y primers convencionales, eliminando el costo de la síntesis de sondas, esta estrategia permitió la detección de la carga viral para CHIKV, ZIKV y DENV-2 con alta sensibilidad, esto representa una ventaja debido a que la detección no está afectada por secuencias heterogéneas en la región que los primers tiene en cuenta, como puede ocurrir cuando se usan sondas acopladas a la RT-qPCR (Papin et al., 2004).

Este método basado en PCR, tiene ventajas frente a estudios basados en la detección de proteínas de la cápside de CHIKV, ZIKV y DENV-2 mediante ELISA, donde los autores no encontraban diferencias en la carga viral, baja sensibilidad y una probabilidad alta de dar falsos positivos (Shan et al., 2017; Yap et al., 2010), adicionalmente con otras variantes de RT-qPCR como es el caso de análisis de detección múltiple de estos tres patógenos (Álvarez-Díaz et al., 2021) se evidenció un mejor rendimiento por parte de detección individual de los virus, obteniendo mejor eficiencia y un límite de detección mucho menor. Este método permitiría estudiar diversos aspectos de la biología del virus, con forme a la respuesta a diferentes líneas celulares o tejidos a las infecciones causadas por CHIKV, ZIKV y DENV-2, los efectos relacionados con acumulación de los virus en células de insecto, por medio de la cuantificación de las cantidades de partículas virales.

2.2.Determinación de la susceptibilidad viral de Vero y BHK-21 a CHIKV, ZIKV y DENV-2

La búsqueda de una terapia antiviral contra CHIKV, ZIKV y DENV-2 ha hecho necesario el desarrollo de modelos celulares, que permitan observar el curso de las infecciones causadas por Arbovirus. Las líneas celulares son ampliamente utilizadas ya que tienen un genotipo y fenotipo conocido permitiendo tener resultados reproducibles sobre sucesos biológicos, respuestas y diseño de vacuna o agentes contra infecciones virales (Lopes-Ramos et al., 2017).

De acuerdo con diversos estudios de tropismo para los tres virus, las líneas celulares de humanos no son el modelo ideal para la replicación de CHIKV, ZIKV o DENV-2 ya que su tasa de replicación viral es menor comparada con líneas celulares de mamíferos no humanas como las líneas de insecto,

primates o roedores (Begum et al., 2019; Chan et al., 2016; Miner & Diamond, 2017; Sudeep et al., 2019).

En nuestro estudio, se utilizaron las líneas celulares de origen no humano BHK-21 y Vero, ambas ampliamente usadas en la comunidad científica para el desarrollo de vacunas antivirales y determinar la susceptibilidad viral a medicamentos. (K. il Lim et al., 2006; Sofía et al., 2020). En nuestro caso se tomó como criterio de selección, la línea celular que fuera más permisiva a la infección por los aislados clínicos provenientes de pacientes colombianos usados en este estudio. Este comportamiento lo mostró la línea BHK-21 la cual adicionalmente tiene otros ventajas para su uso como rápido crecimiento, alta eficiencia de plaqueo en los modelos virales, otros autores han demostrado su superioridad para la producción de adenovirus humano D, reovirus 3 y el virus de la estomatitis vesicular (Cepa India), por otro lado, se conoce que son refractantes a poliovirus 2 y vesivirus de conejo (RaV) (K. il Lim et al., 2006)

Experimentalmente, se tomó el sobrenadante de cada uno de los tiempos y del lisado celular para realizar la extracción de material genético, se observó una mayor concentración de ARN en el lisado celular (~50 a 100ng) que en el sobrenadante (~ 2 a 10ng), por esta razón se seleccionaron las muestras de lisado como ideales para valorar la evolución de la infección y susceptibilidad celular.

Teniendo en cuenta lo anterior, para el caso de CHIKV la línea celular BHK-21 tuvo una mayor susceptibilidad a partir del tiempo 10 hasta el punto final donde se observó mayor cantidad virus con ~5.756 copias de ARN viral/ μ L de CHIKV (Figura 4). Para ZIKV y DENV-2 en sus dos MOI, no se observa diferencia significativa entre las dos líneas celulares en ninguno de los Tiempos (Figura 4 y 5), adicionalmente para el caso de DENV-2 hay mayor producción de virus en el transcurso del tiempo para el MOI de 0.01 que en el MOI de 0.001 como se observa en la figura 5.

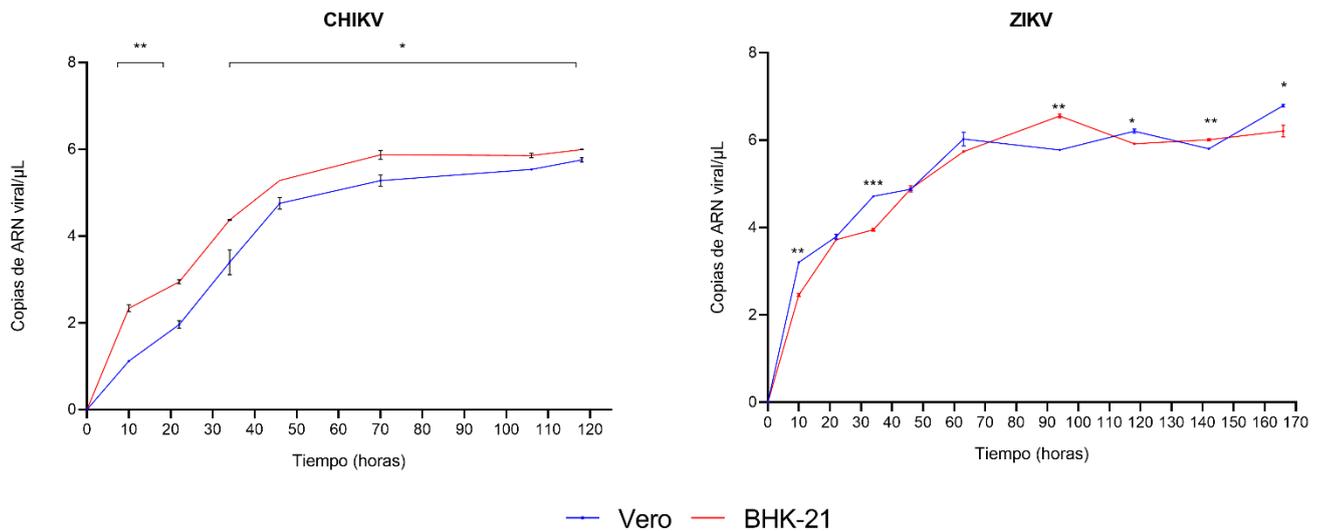


Figura 4. Susceptibilidad de líneas celulares a la infección de CHIKV y ZIKV. Vero (azul), BHK-21 (rojo), eje X es el tiempo en horas que transcurre la infección en los modelos celulares y en el eje Y es el número de copias de ARN de CHIKV y ZIKV / μ L, todos los ensayos se realizaron dos veces (n=2). Los niveles de copias de ARN viral se midieron en lisado celular por medio de RT-qPCR. Las diferencias significativas se analizaron mediante una prueba t de Student, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ y *** $p < 0.0009$.

De acuerdo con estos resultados se seleccionó a BHK-21 como modelo celular para los ensayos celulares de antiviral para los tres virus, ya que se observaron diferencias significativas con CHIKV, que es uno de los virus más complejos ya que es altamente citopático en cultivos de células, y las células infectadas experimentan rápidamente muerte celular apoptótica. Este patrón de replicación probablemente gobierna las propiedades patológicas del virus y a esto se debe su nivel de seguridad tipo 3 (Richardson et al., 2009; Schwartz & Albert, 2010) comparados con ZIKV y DENV-2.

Las células BHK-21 demostraron ser permisibles a la infección por CHIKV, ZIKV y DENV-2, además no presentaron una disminución radical del título viral ni pérdida de la viabilidad celular (Kaur et al., 2013), durante todo el periodo de estudio.

DENV-2

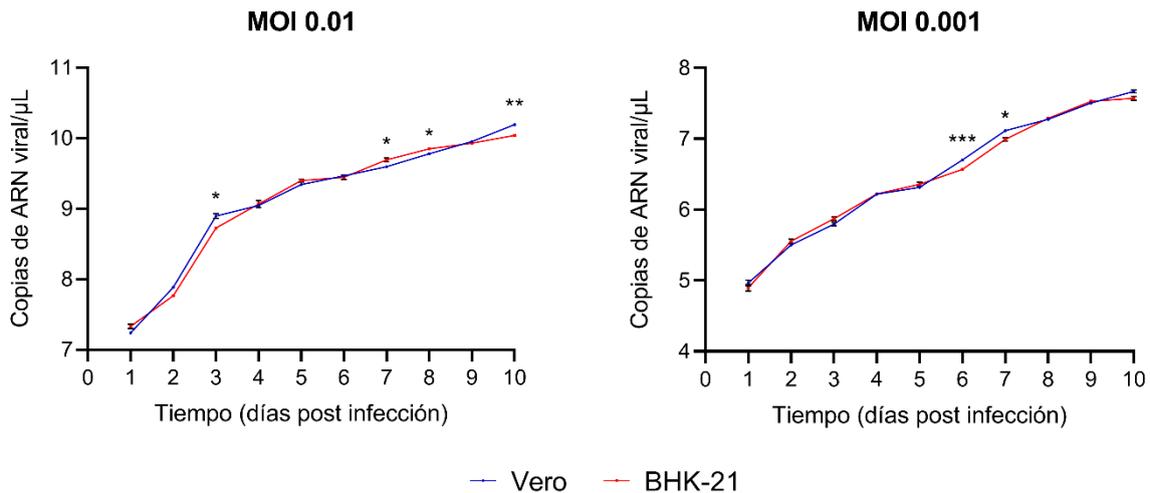


Figura 5. Susceptibilidad de líneas celulares a la infección de DENV-2 a dos MOI. Vero (azul), BHK-21 (rojo), eje X es el tiempo en horas que transcurre la infección en los modelos celulares y en el eje Y es el número de copias de ARN de DENV-2 / μ L, todos los ensayos se realizaron dos veces (n=2). Los niveles de copias de ARN viral se midieron en lisado celular por medio de RT-qPCR. Las diferencias significativas se analizaron mediante una prueba t de Student, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ y *** $p < 0.0009$.

Resultados similares fueron reportados por Sudeep y colaboradores (Sudeep et al., 2019) en un estudio de susceptibilidad de ciertas cepas de CHIKV (Africanas y mutantes de Asia), ellos observaron que tanto BHK-21 y Vero son susceptibles a CHIKV, al igual que se muestra en estos resultados BHK-21 es la línea con mayor infectividad, definida esta como la capacidad del agente infeccioso para invadir y multiplicarse en las líneas celulares (Lopes-Ramos et al., 2017). También este estudio, realizó la cinética de desarrollo viral para CHIKV y ZIKV demostrando que las evaluaciones biológicas se deben realizar en horas, lo que coincide con nuestros hallazgos, logrando disminuir el tiempo de evaluación, evitando posibilidades de contaminación del cultivo y de una pérdida de la viabilidad celular del 100% lo cual no es recomendado. Para el caso de DENV-2 nosotros solo encontramos CPE a partir de las 24 horas, lo que hizo necesario realizar el seguimiento en días, lo que coincide con otros autores que realizan seguimientos por periodos de tiempo incluso mayores a 10 días (Zandi et al., 2012).

2.3. Evaluación del efecto de los derivados de miricetina de *Marcetia taxifolia* en la carga viral de células BHK-21 infectadas con CHIKV, ZIKV y DENV-2

Ante la falta de una terapia antiviral para las infecciones por CHIKV, ZIKV y DENV-2, se propusieron dos derivados de miricetina puros, miricetina 3-ramnósido (MR) y miricetina 3-(6-

ramnosilgalactósido) (MRG) como potenciales antivirales. Se obtuvieron concentraciones letales cincuenta (CL_{50}) $<250 \mu\text{g/mL}$ para MR y de $170.5 \pm 1.04 \mu\text{g/mL}$ para MRG. La actividad antiviral se evaluó en diluciones seriadas partiendo de 75 a $0,58 \mu\text{g/mL}$ para MRG y de 150 a $1,17 \mu\text{g/mL}$ para MR. MR fue efectivo contra los tres virus con un CE_{50} de $49.11 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$, $14.41 \pm 0.67 \mu\text{g/mL}$ y de $10,38 \pm 0.82 \mu\text{g/mL}$ contra CHIKV (Figura 6-A), ZIKV (Figura 6-B) y DENV-2 (Figura 6-C) respectivamente. Por su parte para MRG las CE_{50} fueron de $22.43 \pm 0.69 \mu\text{g/mL}$, $10.07 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$ y de $10.92 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$ para CHIKV (Figura 7-A), ZIKV (Figura 7-B) y DENV-2 (Figura 7-C).

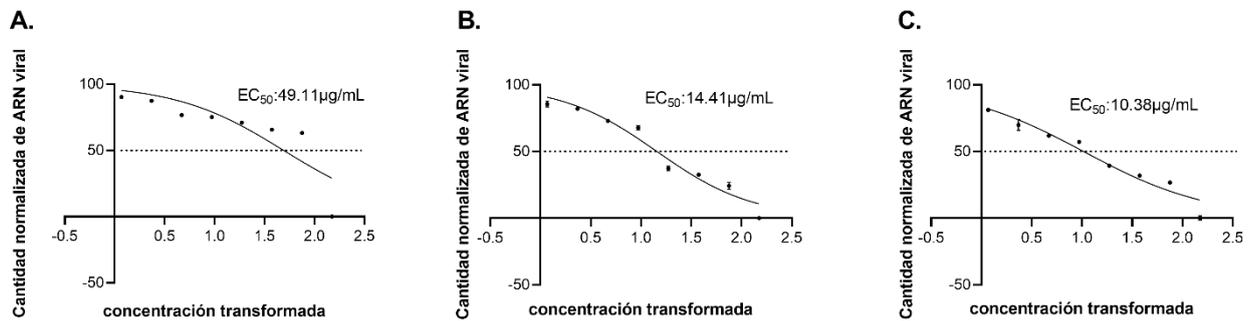


Figura 6. Actividad antiviral de MR contra CHIKV A, ZIKV B, y DENV-2 C. Eje x concentración transformada, eje y cantidad normalizada de ARN viral. La línea punteada y el valor en la parte superior derecha representa la CE_{50} . Los paneles representan la efectividad contra A. CHIKV; B. ZIKV y C. DENV-2.

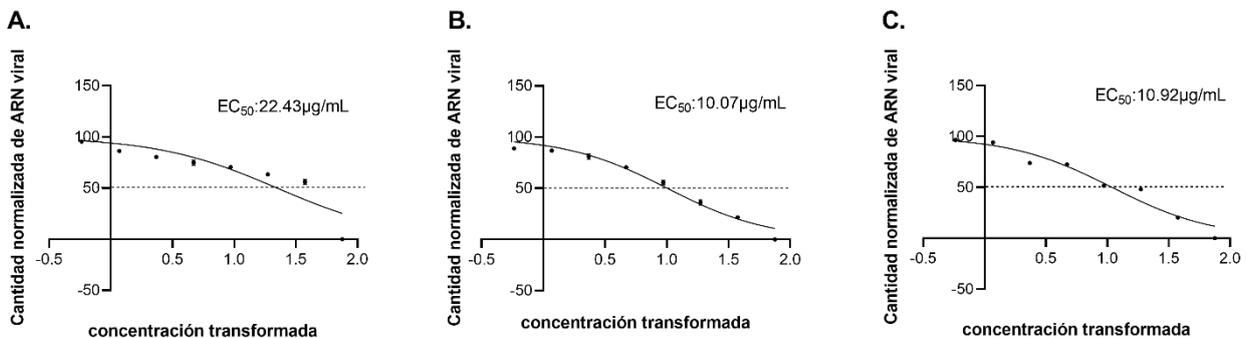


Figura 7. Actividad antiviral de MRG contra CHIKV A, ZIKV B, y DENV-2 C. Eje x concentración transformada, eje y cantidad normalizada de ARN viral. La línea punteada y el valor en la parte superior derecha representa la CE_{50} . Los paneles representan la efectividad contra A. CHIKV; B. ZIKV y C. DENV-2.

Los flavonoides son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en la naturaleza, son compuestos divididos estructuralmente en diferentes tipos, como polifenólicos con diferentes subclases, como flavonoles, flavonas, flavanonoles, flavanonas, flavanoles (o catequinas), isoflavonas, chalcona y antocianidinas (J. Xiao et al., 2016). En fisiología vegetal estos se encargan de dar color a semillas,

flores y frutos, y se ha documentado su importancia como agentes microbicidas contra fitopatógenos (Godinho et al., 2021). Algunos pueden tener otro tipo de modificaciones como la glicosilación denominándose glicosilflavonoides, en los cuales se pueden encontrar diferentes azúcares, como glucosa, galactosa ramnosa, arabinosa y rutinosa (J. Xiao, 2017). Donde esta parte glicosilada le otorga características importantes desde el punto de vista del diseño de fármacos como lo son la solubilidad (Godinho et al., 2021) , mejor absorción, y reconocimiento celular y (Behl et al., 2021). Incluso esta característica disminuye la toxicidad (Plaza et al., 2014). Adicionalmente se ha descrito que estos flavonoides pueden ser sustrato de transportadores de glucósidos dependientes de sodio (SGLT1) en la membrana de enterocitos, y dentro de la célula son escindidos por glucosidasas (Tapiero et al., 2002), teniendo en cuenta este proceso se podría concluir que esto podría contribuir a su acumulación dentro de la célula (Ortega et al., 2017b).

Los antecedentes enunciados hasta aquí, sugieren que la actividad antiviral de MR y MRG podría relacionarse con los residuos de carbohidratos en la molécula, nosotros encontramos que MR molécula que posee la menor cantidad de residuos de glúcidos evidencia la mayor actividad antiviral; especialmente en las concentraciones más altas para todos los virus siendo CHIKV en el que mayor disminución de la carga viral tuvo, con una disminución de $80.78 \pm 0.46 \%$, para ZIKV fue de $44.6 \pm 0.42 \%$ y finalmente para DENV-2 fue de $60.91 \pm 1.22 \%$. Por su parte MRG a la concentración más alta obtuvo reducciones de la carga viral de $52.46 \pm 0.12 \%$ para CHIKV, $40.1 \pm 0.45 \%$ para ZIKV y $54.03 \pm 0.12 \%$ para DENV-2. A pesar de nuestra afirmación de que MR es más efectivo a nivel estadístico ambos compuestos evidencian tener el mismo patrón de actividad.

La miricetina un flavonoide no glicosilado que ha sido poco estudiando a nivel de actividad antiviral contra virus tropicales, pero para la cual se sabe tiene acción contra la hepatitis B, el coronavirus y el virus de la influenza (Ortega et al., 2017b; Semwal et al., 2016). Incluso se ha postulado como mecanismo de acción sugiriendo la actividad ATPasa de la helicasa viral, promoviendo así una acción antiviral contra de SARS-CoV-2 *in vitro* e *in Silico* (T. Xiao et al., 2021). Además, la miricetina se relacionó con una actividad inhibidora eficaz contra la hepatitis B y el virus

de la influenza (Zakaryan et al., 2017). Asimismo, se mostró que al igual que en este estudio la glicosilación de MR y MRG podría aumentar la actividad anti-VIH-1 de la miricetina, lo que permitiría una mejor internalización de este compuesto en la célula y luego actuaría sobre la transcriptasa inversa del VIH-1 (Ortega et al., 2017). De acuerdo con estos hallazgos nuestra hipótesis fue que los derivados glicosilados MR y MRG podrían tener actividad contra los Arbovirus circulantes en Colombia y que esta actividad podría tener asociación con el grado de glicosilación de miricetina [miricetina (R = aglicona) > MR (R = monoglucosilado) > MRG (R = Bi-glicosilado)], lo cual comprobó Ortega y colaboradores, en nuestro caso MR mostró una actividad mayor al disminuir la carga viral en mayor proporción que lo obtenido con MRG, pero no hubo diferencias estadísticamente significativas entre la actividad de ambos compuestos, evidenciando que ambos tienen una potente actividad antiviral con $CE_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$. Estos hallazgos coinciden con otros autores en los cuales en ensayos *in silico* de compuestos de *Marcetia taxifolia* contra ZIKV y DENV-2 mostraron que MR presenta una puntuación de AutoDock Vina mostrando que MR tenía el valor de puntuación más alto (-9.60 kcal/mol) frente a MRG, valores que indican que MR mostró una mayor afinidad por ZIKV-NS5-ARN polimerasa, lo que demuestra que podrían estar relacionados con el proceso de transcripción y allí radica su actividad. MR y MRG, corroboran el potencial de estos flavonoides glicosilados como antivirales, sugiriéndose continuar en el conocimiento de su mecanismo de acción.

Conclusiones

Desarrollamos un método de RT-qPCR de un solo paso, usando Sybr Green adecuado para la cuantificación de partículas virales de CHIKV, ZIKV y DENV-2, colectadas en modelos celulares y su detección. Este método puede aplicarse a diferentes tipos de estudios como la determinación de susceptibilidad viral, la dinámica de la infección viral, la evaluación de posibles terapias viricidas o antivirales de manera rápida, con alta sensibilidad y especificidad.

Las líneas celulares Vero y BHK-21, demostraron ser susceptibles a los aislamientos clínicos probados de CHIKV, ZIKV y a DENV-2, sugiriendo que son modelos celulares para la proliferación viral de estos tres virus, por su estabilidad en el título viral, resaltando que BHK-21 para el caso de CHIKV, que es un virus difícil de trabajar por su alta patogenicidad y alta capacidad de generar efecto citopático en cultivos celulares causando rápidamente muerte celular, es la línea celular más susceptible a esta infección.

El presente estudio demuestra que los compuestos glicosilados derivados de miricetina, miricetina 3-ramnósido y miricetina 3-(6-ramnosilgalactósido) tienen actividad antiviral *in vitro* contra CHIKV, ZIKV y DENV-2, disminuyendo la carga de la infección.

Perspectivas

El ensayo de RT-qPCR enunciado aquí cuenta la posibilidad de extrapolarse para la detección de estos virus de manera múltiple, con utilidad en ensayos de infecciones virales mixtas.

Teniendo en cuenta que estos dos compuestos son buenos candidatos antivirales contra estos patógenos, se debe buscar el mecanismo de acción; si se da por en la inhibición del receptor encargado de reconocer al virus a la célula, si inhibe procesos de replicación a nivel celular o si su efecto está directamente relacionado a daño al virus tras la salida de la célula.

Los dos compuestos puestos a prueba en este estudio son candidatos para realizar ensayos de actividad antiviral contra otro tipo de virus olvidados que son un problema grave en salud pública en todo el mundo similares a los enunciados aquí. Adicionalmente deberían tenerse en cuenta para estudios contra los otros genotipos o serotipos de los virus usados para validar si es un posible tratamiento antiviral de amplio espectro.

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por El Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación (Minciencias) (CTO 153-2019, código 124380864546). Agradezco al grupo de investigación en Biología celular y funcional e ingeniería de biomoléculas de la Facultad de Ciencias. A la profesora Mónica Losada Barragán por enseñarme, guiarme, corregirme y ser gran apoyo en los momentos difíciles. Por otro lado, agradecer a la profesora Ana Luisa Muñoz por su colaboración y perfeccionamiento, y a la profesora Yulieth Apegui por su guía y apoyo. Adicionalmente, a la Universidad Antonio Nariño por brindarme cada uno de los elementos para el desarrollo del proyecto y Adicionalmente por su formación académica. Finalmente quiero agradecer a mis papas y mi hermana y amigos, por hacer parte del proceso y siempre acompañarme.

Referencias

- Álvarez-Díaz, D. A., Quintero, P. A., Peláez-Carvajal, D., Ajami, N. J., & Usme-Ciro, J. A. (2019). Novel pan-serotype control RNA for dengue virus typing through real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 271. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113677>
- Álvarez-Díaz, D. A., Valencia-Álvarez, E., Rivera, J. A., Rengifo, A. C., Usme-Ciro, J. A., Peláez-Carvajal, D., Lozano-Jiménez, Y. Y., & Torres-Fernández, O. (2021a). An updated RT-qPCR assay for the simultaneous detection and quantification of chikungunya, dengue and zika viruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 93. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104967>
- Alvis-Zakzuk, N. J., Díaz-Jiménez, D., Castillo-Rodríguez, L., Castañeda-Orjuela, C., Paternina-Caicedo, Á., Pinzón-Redondo, H., Carrasquilla-Sotomayor, M., Alvis-Guzmán, N., & De La Hoz-Restrepo, F. (2018). Economic Costs of Chikungunya Virus in Colombia. *Value in Health Regional Issues*, 17(51), 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.vhri.2018.01.004>
- Baptista, J., Chávez, K., Torrico, F., Trejo, E., Garcia, C. C., Urbina, J., Carrasco, J., Taddei, A., Tillett, S., & Suárez, A. I. (2016). Constituyentes químicos y actividad antiinflamatoria de *Marcetia taxifolia*. In *Scientific Journal from the Experimental Faculty of Sciences, at the Universidad del Zulia* (Vol. 24). Abril-Junio.
- Begum, F., Das, S., Mukherjee, D., Mal, S., & Ray, U. (2019). Insight into the tropism of dengue virus in humans. In *Viruses* (Vol. 11, Issue 12). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v11121136>
- Behl, T., Rocchetti, G., Chadha, S., Zengin, G., Bungau, S., Kumar, A., Mehta, V., Uddin, M. S., Khullar, G., Setia, D., Arora, S., Sinan, K. I., Ak, G., Putnik, P., Gallo, M., & Montesano, D. (2021). Phytochemicals from Plant Foods as Potential Source of Antiviral Agents: An Overview. *Pharmaceuticals*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/ph14040381>
- Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J., & Mumford, R. (2014). Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. *Virus Research*, 186, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.007>
- Brinton, M. A., & Basu, M. (2015). Functions of the 3' and 5' genome RNA regions of members of the genus *Flavivirus*. *Virus Research*, 206, 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.02.006>
- Buendía-Atencio, C., Pieffet, G. P., Montoya-Vargas, S., Martínez Bernal, J. A., Rangel, H. R., Muñoz, A. L., Losada-Barragán, M., Segura, N. A., Torres, O. A., Bello, F., Suárez, A. I., & Rodríguez, A. K. (2021). Inverse Molecular Docking Study of NS3-Helicase and NS5-RNA Polymerase of Zika Virus as Possible Therapeutic Targets of Ligands Derived from *Marcetia taxifolia* and Its Implications to Dengue Virus. *ACS Omega*, 6(9), 6134–6143. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04719>
- Carabali, M., Jaramillo, G.-I., Rivera, V., Restrepo, B. N., Zinser, K., & gloria.jaramillor@campusucc.edu.co. (2019). Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud. In *XVII Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical*. Universidad Cooperativa de Colombia, Facultad de Ciencias de la Salud, Medicina, Villavicencio. <https://repository.ucc.edu.co/handle/20.500.12494/18362>
- Castrillón, J. C., Castaño, J. C., & Urcuqui, S. (2015). Dengue en Colombia: Diez años de evolución. *Revista Chilena de Infectología*, 32(2), 142–149. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182015000300002>
- Chan, J. F. W., Yip, C. C. Y., Tsang, J. O. L., Tee, K. M., Cai, J. P., Chik, K. K. H., Zhu, Z., Chan, C. C. S., Choi, G. K. Y., Sridhar, S., Zhang, A. J., Lu, G., Chiu, K., Lo, A. C. Y., Tsao, S. W., Kok, K. H., Jin, D. Y., Chan, K. H., & Yuen, K. Y. (2016). Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. *Emerging Microbes and Infections*, 5(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.99>
- Chen, S., Wu, Z., Wang, M., & Cheng, A. (2017). Innate immune evasion mediated by flaviviridae non-structural proteins. *Viruses*, 9(10), 1–19. <https://doi.org/10.3390/v9100291>
- Cuevas-Reyes, E., Carrillo-Morales, M., Treviño-Quintanilla, L. G., Aparicio-Fabre, R., & Hernández-Romano, J. (2016). OLIGONUCLEOTIDES EVALUATION FOR MEASURING GENE EXPRESSION DURING TOMATO BACTERIAL WILT. In *Artículo Científico Rev. Fitotec. Mex* (Vol. 39, Issue 2). <http://www.revistafi->
- Dyer, O. (2017). Philippines halts dengue immunisation campaign owing to safety risk. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 359(December), j5759. <https://doi.org/10.1136/bmj.j5759>
- Felmer, R., Zúñiga, J., & Recabal, M. (n.d.). *Comparative study of nested PCR, ELISA and AGID tests in the detection of bovine leukaemia virus infection in serum, blood and milk samples*.
- García, M. L., de La Torre, M. E. S., Dal Bo, E., Djelouah, K., Rouag, N., Luisoni, E., Milne, R. G., & Grau, O. (1997). Detection of citrus psorosis-ringspot virus using RT-PCR and DAS-ELISA. *Plant Pathology*, 46(6), 830–836. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1997.d01-81.x>

- Gé Rardin, P., Barau, G., Michault, A., Bintner, M., Randrianaivo, H., Choker, G., Lenglet, Y., Touret, Y., Bouveret, A., Grivard, P., le Roux, K., Verine Blanc, S., & Schuffenecker, I. (2008). *Multidisciplinary Prospective Study of Mother-to-Child Chikungunya Virus Infections on the Island of La Réunion*. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050060.t001>
- Godinho, P. I. C., Soengas, R. G., & Silva, V. L. M. (2021). Therapeutic potential of glycosyl flavonoids as anti-coronaviral agents. In *Pharmaceuticals* (Vol. 14, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ph14060546>
- Grillet, M. E., & Ventura, F. D. V. (2016). Transmisión del virus Zika: Patrones y mecanismos eco-epidemiológicos de una arbovirosis. *Tribuna Del Investigador*, 17(May), 42–61.
- Hope, K. M., Casey, R. N., Groocock, G. H., Getchell, R. G., Bowser, P. R., & Casey, J. W. (2010). Comparison of quantitative RT-PCR with cell culture to detect viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) IVb infections in the Great Lakes. *Journal of Aquatic Animal Health*, 22(1), 50–61. <https://doi.org/10.1577/H09-028.1>
- Instituto Nacional de Salud. (2015). *Boletín epidemiológico Semana 52-2015*.
- Instituto Nacional de Salud. (2019). *Semana Epidemiológica 18: Boletín Epidemiológico Chikungunya*.
- Instituto Nacional de Salud. (2022). *Semana epidemiológica 33*.
- Instituto Nacional de Salud, O. (2012). Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de dengue. *Instituto Nacional de Salud, OPS*, 21, 1–124.
- Ishige, T., Murata, S., Taniguchi, T., Miyabe, A., Kitamura, K., Kawasaki, K., Nishimura, M., Igari, H., & Matsushita, K. (2020). Highly sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA by multiplex rRT-PCR for molecular diagnosis of COVID-19 by clinical laboratories. *Clinica Chimica Acta*, 507(April), 139–142. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.04.023>
- Jaramillo, B. N. R. (2014). Infección por el virus del Chikungunya. *CES MEDICINA*, 28(2), 313–323. <https://doi.org/10.14482/sun.31.3.7352>
- Jaramillo, R., & Nelly, B. (2014). *Redalyc. Infección por el virus del Chikungunya*. 28, 313–323.
- Jucá, M. M., Cysne Filho, F. M. S., de Almeida, J. C., Mesquita, D. da S., Barriga, J. R. de M., Dias, K. C. F., Barbosa, T. M., Vasconcelos, L. C., Leal, L. K. A. M., Ribeiro, J. E., & Vasconcelos, S. M. M. (2020). Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. In *Natural Product Research* (Vol. 34, Issue 5, pp. 692–705). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1493588>
- Kaur, P., Thiruchelvan, M., Lee, R. C. H., Chen, H., Chen, K. C., Ng, M. L., & Chu, J. J. H. (2013). Inhibition of Chikungunya virus replication by harringtonine, a novel antiviral that suppresses viral protein expression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1), 155–167. <https://doi.org/10.1128/AAC.01467-12>
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. In *The Scientific World Journal* (Vol. 2013). ScientificWorld Ltd. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Lani, R., Hassandarvish, P., Chiam, C. W., Moghaddam, E., Chu, J. J. H., Rausalu, K., Merits, A., Higgs, S., Vanlandingham, D., Abu Bakar, S., & Zandi, K. (2015). Antiviral activity of silymarin against chikungunya virus. *Scientific Reports*, 5, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep11421>
- Lani, R., Hassandarvish, P., Shu, M. H., Phoon, W. H., Chu, J. J. H., Higgs, S., Vanlandingham, D., Abu Bakar, S., & Zandi, K. (2016). Antiviral activity of selected flavonoids against Chikungunya virus. *Antiviral Research*, 133, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.07.009>
- Lanser, L., Bellmann-Weiler, R., Öttl, K. W., Huber, L., Griesmacher, A., Theurl, I., & Weiss, G. (2021). Evaluating the clinical utility and sensitivity of SARS-CoV-2 antigen testing in relation to RT-PCR Ct values. In *Infection* (Vol. 49, Issue 3, pp. 555–557). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01542-0>
- Lim, K. il, Lang, T., Lam, V., & Yin, J. (2006). Model-based design of growth-attenuated viruses. *PLoS Computational Biology*, 2(9), 1001–1016. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0020116>
- 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 Research*, 100(2), 500–519. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.09.013>
- Lopes-Ramos, C. M., Paulson, J. N., Chen, C. Y., Kuijjer, M. L., Fagny, M., Platig, J., Sonawane, A. R., DeMeo, D. L., Quackenbush, J., & Glass, K. (2017). Regulatory network changes between cell lines and their tissues of origin. *BMC Genomics*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4111-x>
- Martins, K. A. O., Dye, J. M., & Bavari, S. (2016a). Considerations for the development of Zika virus vaccines. *Vaccine*, 34(33), 3711–3712. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.06.01>
- Matsushita, T., Matsui, Y., & Shirasaki, N. (2006). Analysing mass balance of viruses in a coagulation - Ceramic microfiltration hybrid system by a combination of the polymerase chain reaction (PCR) method

and the plaque forming units (PFU) method. *Water Science and Technology*, 53(7), 199–207.

<https://doi.org/10.2166/wst.2006.225>

- Miner, J. J., & Diamond, M. S. (2017). Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. In *Cell Host and Microbe* (Vol. 21, Issue 2, pp. 134–142). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.01.004>
- Murali, K. S., Sivasubramanian, S., Vincent, S., Murugan, S. B., Giridaran, B., Dinesh, S., Gunasekaran, P., Krishnasamy, K., & Sathishkumar, R. (2015). Anti-chikungunya activity of luteolin and apigenin rich fraction from *Cynodon dactylon*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8(5), 352–358. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60343-6](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60343-6)
- Murray, N. E. A., Quam, M. B., & Wilder-Smith, A. (2013). Epidemiology of dengue: Past, present and future prospects. *Clinical Epidemiology*, 5(1), 299–309. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S34440>
- Ninfali, P., Antonelli, A., Magnani, M., & Scarpa, E. S. (2020). Antiviral Properties of Flavonoids and Delivery Strategies. *Nutrients*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/nu12092534>
- ONO, K., NAKANE, H., FUKUSHIMA, M., CHERMANN, J. -C, & BARRÉ-SINOUSI, F. (1990). Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *European Journal of Biochemistry*, 190(3), 469–476. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15597.x>
- Ortega, J. T., Serrano, M. L., Suárez, A. I., Baptista, J., Helene, F., Cavallaro, L. V., Campos, H. R., & Rangel, H. R. (2019). Antiviral activity of flavonoids present in aerial parts of *Marcetia Taxifolia* against hepatitis b virus, poliovirus, and herpes simplex virus In Vitro. *EXCLI Journal*, 18, 1037–1048. <https://doi.org/10.17179/excli2019-1837>
- Ortega, J. T., Suárez, A. I., Serrano, M. L., Baptista, J., Pujol, F. H., & Rangel, H. R. (2017a). The role of the glycosyl moiety of myricetin derivatives in anti-HIV-1 activity in vitro. *AIDS Research and Therapy*, 14(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12981-017-0183-6>
- Padilla, J. C., Lizarazo, F. E., Murillo, O. L., Mendigaña, F. A., Pachón, E., & Vera, M. J. (2017). Transmission scenarios of major vector-borne diseases in Colombia, 1990-2016. *Biomedica : Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 37(0), 27–40.
- Papin, J. F., Vahrson, W., & Dittmer, D. P. (2004). SYBR Green-Based Real-Time Quantitative PCR Assay for Detection of West Nile Virus Circumvents False-Negative Results Due to Strain Variability. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4), 1511–1518. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1511-1518.2004>
- Parra, B., Lizarazo, J., Jiménez-Arango, J. A., Zea-Vera, A. F., González-Manrique, G., Vargas, J., Angarita, J. A., Zuñiga, G., Lopez-Gonzalez, R., Beltran, C. L., Rizcala, K. H., Morales, M. T., Pacheco, O., Ospina, M. L., Kumar, A., Cornblath, D. R., Muñoz, L. S., Osorio, L., Barreras, P., & Pardo, C. A. (2016). Guillain-Barré Syndrome Associated with Zika Virus Infection in Colombia. *New England Journal of Medicine*, 375(16), 1513–1523. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1605564>
- Pasetto, S., Pardi, V., & Murata, R. M. (2014). Anti-HIV-1 activity of flavonoid myricetin on HIV-1 infection in a dual-chamber in vitro model. *PLoS ONE*, 9(12), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115323>
- Plaza, M., Pozzo, T., Liu, J., Gulshan Ara, K. Z., Turner, C., & Nordberg Karlsson, E. (2014). Substituent effects on in vitro antioxidizing properties, stability, and solubility in flavonoids. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 62, Issue 15, pp. 3321–3333). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/jf405570u>
- Prithviraj Karak. (2019). *BIOLOGICAL ACTIVITIES OF FLAVONOIDS: AN OVERVIEW*.
- Richardson, J., Barkley, W. E., Richmond, D. J., & McKinney, R. W. (2009). *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*.
- Rodriguez, A. K., Muñoz, A. L., Segura, N. A., Rangel, H. R., & Bello, F. (2019). Molecular characteristics and replication mechanism of dengue, zika and chikungunya arboviruses, and their treatments with natural extracts from plants: An updated review. In *EXCLI Journal* (Vol. 18, pp. 988–1006). Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors. <https://doi.org/10.17179/excli2019-1825>
- Rodriguez-Morales, A. J., Patiño-Valencia, S., Villamil-Gómez, W. E., Alvarado-Socarras, J. A., & Jimenez-Canizales, C. E. (2016). Situación del Zika en Colombia: experiencia de miembros de la Red Colombiana de Colaboración en Zika (RECOLZIKA). *Acta Medica Peruana*, 33(1), 79. <https://doi.org/10.35663/amp.2016.331.22>
- Rodríguez-Morales, A. J., & Anaya, J. M. (2016a). Impact of emerging arthritogenic arboviruses in Colombia and Latin America. *Revista Colombiana de Reumatología*, 23(3), 145–147. <https://doi.org/10.1016/j.rcreu.2016.08.001>
- Schwameis, M., Buchtele, N., Wadowski, P. P., Schoergenhofer, C., & Jilma, B. (2016). Chikungunya vaccines in development. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 12(3), 716–731. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1101197>

- Schwartz, O., & Albert, M. L. (2010). Biology and pathogenesis of chikungunya virus. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 8, Issue 7, pp. 491–500). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2368>
- Segura, N. A., Muñoz, A. L., Losada-Barragán, M., Torres, O., Rodríguez, A. K., Rangel, H., & Bello, F. (2021a). Minireview: Epidemiological impact of arboviral diseases in Latin American countries, arbovirus-vector interactions and control strategies. In *Pathogens and Disease* (Vol. 79, Issue 7). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftab043>
- Semwal, D. K., Semwal, R. B., Combrinck, S., & Viljoen, A. (2016). Myricetin: A dietary molecule with diverse biological activities. In *Nutrients* (Vol. 8, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu8020090>
- Shan, C., Ortiz, D. A., Yang, Y., Wong, S. J., Kramer, L. D., Shi, P.-Y., Loeffelholz, M. J., Ren, P., Shan, C. C., & P-y, S. (2017). Evaluation of a Novel Reporter Virus Neutralization Test for Serological Diagnosis of Zika and Dengue Virus Infection. In *Journal of Clinical Microbiology Downloaded* (Vol. 55). <https://journals.asm.org/journal/jcm>
- Sofía, D., Colmenares, L., Karely, A., Fersaca, R., Losada Barragán, M., Jesús, F., García, B., Alfredo, O., García, T., & Luisa Muñoz Ramírez, A. (2020). “Evaluación *in vitro* de la citotoxicidad de extractos vegetales de *Marcetia taxifolia* en cultivos celulares para inhibir la proliferación del virus del Zika [Universidad Antonio Nariño]. <http://repositorio.uan.edu.co/handle/123456789/1497>
- Sudeep, A. B., Vyas, P. B., Parashar, D., & Shil, P. (2019). Differential susceptibility & replication potential of Vero E6, BHK-21, RD, A-549, C6/36 cells & *Aedes aegypti* mosquitoes to three strains of chikungunya virus. *Indian Journal of Medical Research*, 149(6), 771–777. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_453_17
- Suwanmanee, S., & Luplertlop, N. (2017). Dengue and Zika viruses: lessons learned from the similarities between these *Aedes* mosquito-vectored arboviruses. *Journal of Microbiology*, 55(2), 81–89. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6494-4>
- T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers. (n.d.). www.nanodrop.com
- Tapiero, H., Tew, K. D., Nguyen Ba, G., & Mathé, G. (2002). *Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?*
- The Inventor of EZgene™ and ViraTrap™ Systems Viral RNA Extraction from Respiratory Specimens. (n.d.).
- Vargas Romero, L. A. (2020). *Relación entre el perfil inflamatorio y la expresión de los factores de transcripción PPAR en leucocitos de niños con obesidad.* [Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.]. <http://repositorio.uan.edu.co/handle/123456789/1490>
- Weaver, S. C., & Reisen, W. K. (2010). Present and future arboviral threats. In *Antiviral Research* (Vol. 85, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>
- Xiao, J. (2017). Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 57, Issue 9, pp. 1874–1905). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1032400>
- Xiao, J., Capanoglu, E., Jassbi, A. R., & Miron, A. (2016). Advance on the Flavonoid C-glycosides and Health Benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, S29–S45. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1067595>
- Xiao, T., Cui, M., Zheng, C., Wang, M., Sun, R., Gao, D., Bao, J., Ren, S., Yang, B., Lin, J., Li, X., Li, D., Yang, C., & Zhou, H. (2021). Myricetin Inhibits SARS-CoV-2 Viral Replication by Targeting Mpro and Ameliorates Pulmonary Inflammation. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.669642>
- Yap, G., Pok, K. Y., Lai, Y. L., Hapuarachchi, H. C., Chow, A., Leo, Y. S., Tan, L. K., & Ng, L. C. (2010). Evaluation of chikungunya diagnostic assays: Differences in sensitivity of serology assays in two independent outbreaks. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000753>
- Zakaryan, H., Arabyan, E., Oo, A., & Zandi, K. (2017). Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. In *Archives of Virology* (Vol. 162, Issue 9, pp. 2539–2551). Springer-Verlag Wien. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3417-y>
- 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 Complementary and Alternative Medicine*, 12. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-214>

Documento realizado por: Alicia Romero
Modificado por: Diana Martínez Pachón
Actualizado por: Alejandra Baena
2021-II