



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

TESIS

EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO ANTIVIRAL DE TOCOFEROL  
CONTRA EL VIRUS DEL DENGUE

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:  
DENNISE MARLENE ACOSTA OJEDA

DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. SOFÍA LIZETH ALCARAZ ESTRADA

ASESORES INTERNOS:  
DR. OCTAVIO DANIEL REYES HERNÁNDEZ.  
DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO



CIUDAD DE MÉXICO, 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Sofía Alcaraz por haberme dado la oportunidad de ser parte del laboratorio de Medicina Genómica y poder realizar mi proyecto de investigación bajo su supervisión, por sus enseñanzas, su paciencia al haberme guiado durante todo el proceso y el tiempo dedicado.

A la Facultad de Estudios superiores Zaragoza de la Universidad Autónoma de México por mi formación académica y darme la oportunidad de realizar mis estudios de licenciatura.

Al Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado por el apoyo económico otorgado: Programa E-015 de Ciencia y Tecnología.

A mi familia. Mi padre Marco, mis hermanos Marco y Victoria por estar siempre conmigo, su apoyo incondicional y darme ánimos. Mi tía Lucía por sus consejos.

A Paulina Román por escucharme y orientarme siempre que lo necesitaba.

A mis compañeros del laboratorio de Medicina Genómica por toda la ayuda brindada durante mi estadía.

Resumen .....	2
Summary .....	3
Introducción .....	3
Flavivirus .....	3
Dengue .....	4
Epidemiología .....	5
Estructura .....	7
Ciclo replicativo .....	8
Desarrollo de fármacos .....	9
Identificación de moléculas con actividad anti-Dengue .....	10
Antecedente directo .....	11
Vitamina E .....	11
Tocoferoles .....	12
Función antioxidante .....	13
Función no antioxidante .....	15
Justificaión .....	15
Hipótesis .....	16
Objetivo General .....	16
Objetivos particulares .....	16
Estrategia metodológica .....	17
Cultivo celular .....	17
Preparación de tocoferoles .....	18
Extracción RNA .....	18
Determinación de la citotoxicidad .....	18
Ensayo luciferasa .....	19
Infección con DENV2 en células HUH-7 .....	19
Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa en tiempo real ....	20
Plaqueo .....	20
Discusión .....	29
Resultados .....	20
Discusión .....	28
Conclusión .....	30
Bibliografía .....	30

## RESUMEN

En las últimas décadas la incidencia de contagio por el virus del Dengue ha aumentado exponencialmente, provocando más de 300 millones de infecciones al año; el riesgo de desarrollar fiebre hemorrágica del dengue (DHF) o síndrome de shock del dengue (DSS) aumenta tras una segunda infección debido a los anticuerpos de reactividad cruzada desarrollados durante la primera infección, ya que hasta el momento no existe una vacuna antiviral segura, ni un tratamiento antiviral específico contra el virus del Dengue existe una urgencia en desarrollar alguna terapia quimioterapéutica para el tratamiento de esta enfermedad. Este estudio se enfoca en el uso de tocoferoles alfa(- $\alpha$ ) delta (- $\delta$ ) y gamma (- $\gamma$ ) como tratamiento antiviral contra el Dengue; para evaluar el efecto antiviral de los tocoferoles, se llevaron a cabo diversos ensayos en células Vero y células HUH-7. Los resultados obtenidos muestran un efecto positivo de estas moléculas en la inhibición del virus tanto dentro de la célula como fuera de la célula sin afectar su viabilidad.

## SUMMARY

In the last decades the incidence of infection from Dengue has increased exponentially causing more than 300 million infection per year, the risk of developing Dengue hemorrhagic fever (DHF) or Dengue shock syndrome (DSS) increases after a second infection due to cross-reactivity antibodies developed during the first infection, so far there is not a safe approved antiviral vaccine, nor a specific antiviral treatment against Dengue virus, thus. the urgency to develop a chemotherapeutic treatment for this disease. This study focuses on the use of alpha(- $\alpha$ ) delta (- $\delta$ ) and gamma (- $\gamma$ ) tocopherols as an antiviral treatment against Dengue; to evaluate the antiviral effect of tocopherols, several assays were carried out in Vero cells and HUH-7 cells. The results showed these molecules have a positive effect inhibiting the virus both inside the cell and outside the cell without affecting its viability.

# INTRODUCCIÓN

## 1.1 FLAVIVIRUS

La familia *Flaviviridae* son virus icosaédricos envueltos que infectan a los mamíferos (Hasan, 2018). Su genoma es de RNA de polaridad positiva que codifica para un solo marco de lectura. El virus del dengue (DV 1/2/3/4), el virus Zika (ZIKV), el virus de la fiebre amarilla (YFV) y el virus del Nilo Occidental (WNV), entre otros, pertenecen al género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae* (Gravina et al., 2019).

## 1.2 DENGUE

El dengue es la enfermedad viral transmitida por mosquitos más frecuente en los seres humanos. La incidencia global del dengue ha crecido dramáticamente en las recientes décadas y hoy en día alrededor de la mitad de la población mundial vive en áreas de riesgo (Dionicio et al., 2018).

La fiebre del Dengue es una enfermedad viral provocada por un flavivirus y se propaga principalmente mediante la picadura del mosquito *Aedes Aegypti*. Existen cuatro serotipos del virus a los que se refieren como Dengue-1 (DV1); Dengue-2 (DV2), Dengue-3 (DV3) y Dengue-4 (DV4) (Kaur, 2018).

La infección con uno de los serotipos produce inmunidad a largo plazo (de por vida) para ese serotipo, pero solo inmunidad a corto plazo para los demás (González, 2018). Tras la infección primaria con uno de los serotipos, los síntomas generalmente varían de una fiebre subclínica a una autolimitada. Tras una infección secundaria con un serotipo heterólogo, los anticuerpos de reactividad cruzada desarrollados durante la primera infección incrementan el riesgo de desarrollar fiebre hemorrágica del dengue (DHF) o síndrome de shock del dengue (DSS) en un proceso denominado aumento de la infección mediado por

anticuerpos (ADE acrónimo del inglés que significa “Antibody Dependent Enhancement”) (Alayli, 2016).

El ADE es un fenómeno que ocurre cuando los anticuerpos para otros serotipos del Dengue producen anticuerpos no neutralizantes contra los otros serotipos lo que promueve la replicación viral y como consecuencia aumenta la gravedad de la enfermedad (González,6 2018). Aunado a esta complicación por la generación de anticuerpos no neutralizantes por infecciones de serotipos heterólogos por DV, está la respuesta inmune contra el virus del Zika. El virus del Zika, al igual que DENV, también pertenece a los Flavivirus. Fue identificado inicialmente en la selva de Zika, en África en 1947 en un estudio centinela sobre fiebre amarilla. La primera infección en humanos se registró en ese continente en los años sesenta. Desde ese momento Zika era considerado un virus que causaba una infección con sintomatología parecida a dengue. Sin embargo, en el año 2007 se asoció al síndrome Guillain-Barré en las Islas de Yap y en el 2014 en la Polinesia Francesa. No fue hasta el 2015 cuando se asoció a malformaciones congénitas en Brasil (Kindhauser, M. K.,2016). El primer caso confirmado en México se registró en octubre del 2015 y a partir de entonces la vigilancia epidemiológica en el país se ha enfocado a mujeres embarazadas. Adicionalmente, a través de evidencia científica se demostró que Zika, no solo se transmite por vector, sino que también se puede transmitir sexualmente lo que ya no limita esta enfermedad en regiones tropicales donde está el vector.

El virus Zika tiene un solo serotipo y DV tiene 4, la similitud en la secuencia entre las proteínas E y NS1 de estos virus es de 54 a 57.8% (Barba-Spaeth G, et al. 2016; Willis E, et al. 2017). La similitud en secuencia de la proteína E de los cuatro serotipos de DV es de 63% que es un poco más alta que la de Zika y DV (Xu X, et al. 2016). Esta similitud en secuencia resulta en una reactividad cruzada que dificulta los diagnósticos basados en anticuerpos (Lanciotti RS, et al. 2007) y adicionalmente establece la posibilidad de desarrollo de IDA por infecciones de Zika que resultan de anticuerpos no neutralizantes contra DENV. Este último

escenario se ha explotado experimentalmente y se ha observado dos resultados contradictorios: Los anticuerpos contra DV se ha reportado que interaccionan contra Zika, produciendo tanto un efecto protector (Robbiani DF, et al. 2017; Pantoja P, et al. 2017) o un afecto de IDA (Paul LM, et al. 2016; Dejnirattisai W, et al. 2016). Lo anterior implica la necesidad de seguir una vigilancia activa de los pacientes infectados.

### **1.2.1 EPIDEMIOLOGÍA**

El nombre Dengue proviene de la palabra en swahili que significa “fiebre rompe huesos”; el probable primer caso de fiebre del Dengue se registró durante la dinastía Jin (265-420 AD) en China. La primera epidemia reconocida ocurrió casi simultáneamente en Asia, África y Norte América alrededor de 1780, poco después de ser identificada y nombrada por Benjamin Rush en 1779 (Cecilia, 2014).

Los principales vectores del DV son los mosquitos del género *Aedes* predominantemente *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* los cuales se distribuyen ampliamente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, particularmente en Asia y América (Kuadkitkan, 2010). El periodo de incubación es de cuatro a siete días (Rigau-Pérez, 1998).

La incidencia de la fiebre por dengue es el mayor problema de salud pública para más de la mitad de la población mundial; es la principal causa de enfermedad y mortalidad, principalmente en áreas endémicas (Gubler 2012). Se ha reportado que alrededor de 3.9 mil millones de personas están en riesgo de padecer la enfermedad causado por DV, con alrededor de 390 millones de infecciones por año, lo que resulta en más de 100 millones de casos sintomáticos y 10,000 muertes (Acharya et al. 2018; Simo et al. 2019; Messina et al. 2020). La carga de la enfermedad (definiéndolo como impacto en la salud media por costo financiero mortalidad y morbilidad) se ha multiplicado por 30 en las últimas cinco décadas



(Naish et al. 2014; Ebi & Nealon, 2016), y el número de países endémicos de la enfermedad aumentó de 9 a 125 durante las últimas cuatro décadas (Naish et al. 2014). Se prevé que la distribución geográfica de la incidencia se amplíe en el futuro debido al cambio climático (Ryan, et al. 2019; Campbell-lendrum, et al. 2015), esto a que se considera que se ampliará la presencia del vector.

En México, se está observando que gradualmente está incrementando los casos de dengue grave, así como dengue con signos de alarma (Figura 1).

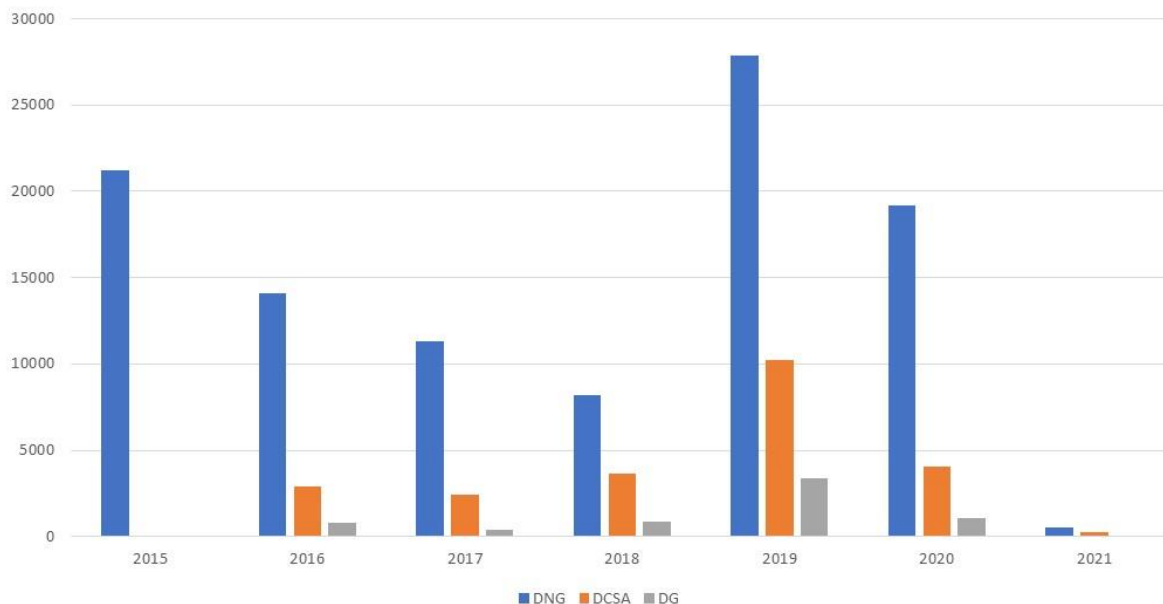


Figura 1. Panorama epidemiológico hasta el 2021. Usando la información Dirección General de Epidemiología, se graficaron los casos de Dengue no grave (DNG), dengue con signos de alarma (DCSA) y dengue grave (DG) desde el 2015 hasta la semana 5 del 2021.

## 1.2.2 ESTRUCTURA

El virión está envuelto y el genoma consiste en una molécula de ARN monocatenaria de polaridad positiva de aproximadamente 11 Kb. El genoma de DV codifica 3 proteínas estructurales (cápside, C; membrana precursora y membrana prM / M y envoltura, E) y para 7 proteínas no estructurales (NS1,

NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5), que son todas derivado del procesamiento proteolítico de una poliproteína de aproximadamente 3400 aminoácidos (Dionicio, et al. 2018).

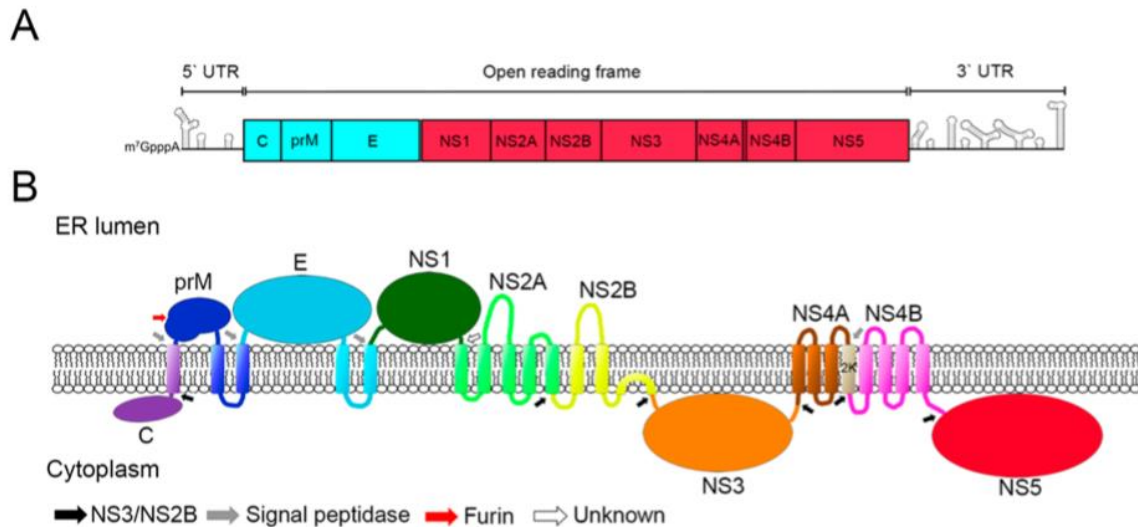


Figura 2. (A) Genoma flaviviral. (B) Topología de la proteína flaviviral y sus dominios transmembranales (Barrows, N. J. et al 2018).

### 1.3 CICLO REPLICATIVO

La replicación de DENV se produce en el citoplasma en estrecha asociación con el retículo endoplasmático rugoso (RER) e involucra las proteínas NS, así como la asistencia de proteínas celulares, para la replicación, traducción y encapsulación del genoma y para el apropiado plegamiento de las proteínas virales (Dionicio, 2018).

Los ciclos de vida intracelulares de los flavivirus son muy similares. La infección con uno de los flavivirus transmitidos por artrópodos comienza cuando el vector se alimenta y el virus se introduce en el huésped. El virus se une y entra en una célula huésped permisiva a través de la endocitosis mediada por receptor. Tras la internalización y acidificación del endosoma, la fusión de las membranas víricas y vesiculares permite la entrada de la nucleocápside en el citoplasma y el genoma

no cubierto. La traducción de la cadena iniciadora toma lugar: el virus cambia de traducción a síntesis de una cadena negativa intermediaria la cual sirve como plantilla para la producción de múltiples copias de ARN viral de cadena positiva (ARNv). Las rondas sucesivas de traducción producen altos niveles de proteínas virales; la proteína estructural o núcleo (C), premembrana (prM), y la envoltura (E), junto con el vRNA, son ensamblados en viriones progenie, los cuales son transportados a través del complejo de Golgi y secretados (Clyde, 2006) (Figura 3).

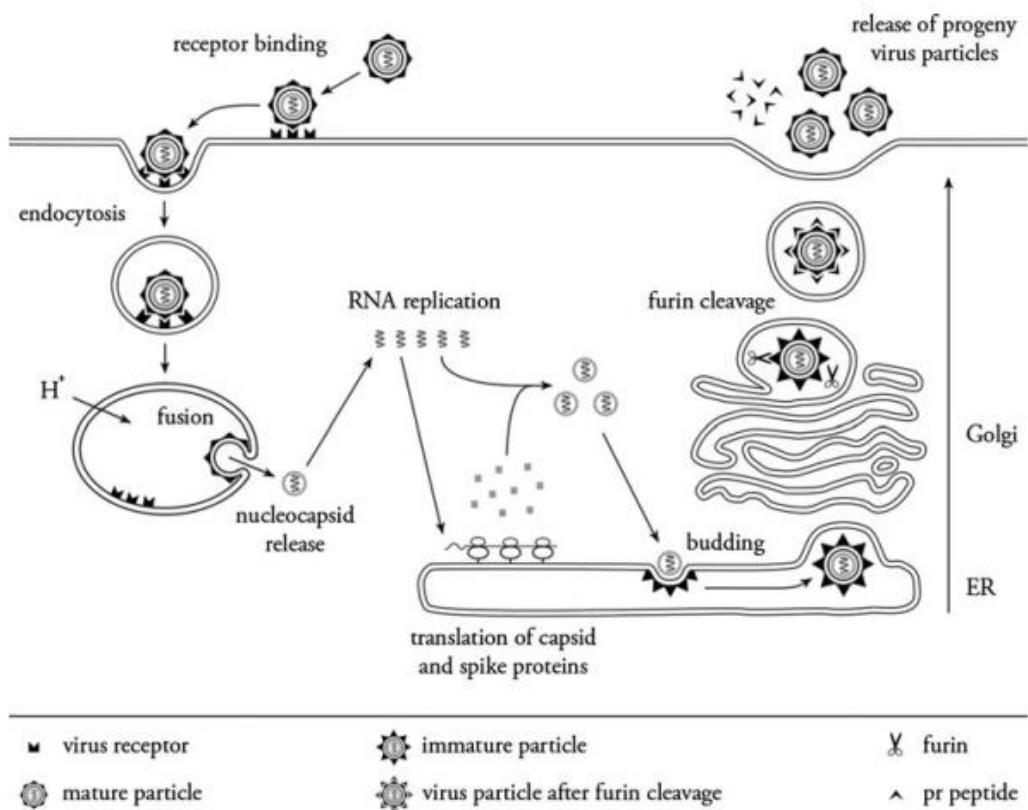


Figura 3. Ciclo de vida del virus Dengue (Rodenhuis-Zybert, 2010)

#### 1.4 DESARROLLO DE FÁRMACOS ANTIVIRALES

Las enfermedades virales afectan a millones de personas a nivel mundial, que tiene un impacto en la salud humana y en el desarrollo socio económico

(Haagmans, et al. 2009) (De Clercq, 2004). Se han desarrollado vacunas para algunos de los patógenos virales más importantes (Rerks-Ngarm, et al. 2009) (Wedemeyer, et al. 2009), sin embargo, para algunas infecciones virales crónicas, el desarrollo de una vacuna es un reto importante ya que se requeriría de una vacuna terapéutica para controlar la enfermedad.

Estos retos enfatizan la importancia de la terapia quimioterapéutica para el tratamiento de enfermedades virales (De Clercq, 2007). Existen alrededor de 40 compuestos antivirales en uso clínico para tratar varias enfermedades virales (la mitad de ellos se están usando para el tratamiento contra VIH), mientras que aún no hay tratamiento para la mayoría de las enfermedades agudas, como las que causan fiebre hemorrágica, encefalitis e incluso cáncer (Dykhhoorn, et al. 2006) (Blackburn, et al. 2006) (Bharti, et al. 2009) (Chander, et al., 2002). La eficacia de la mayoría de los fármacos que están disponibles actualmente es limitada y tienen diversos efectos secundarios (Dykhhoorn et al. 2006).

## **1.5 IDENTIFICACIÓN DE MOLÉCULAS CON ACTIVIDAD ANTI-DENGUE**

El área de investigación que se basa en buscar nuevas moléculas con actividad antiviral contra DV está obteniendo mayor importancia en los últimos años. Esto se debe a la observación de que las manifestaciones clínicas más severas coinciden con una mayor cantidad de virus circulante en la sangre de los pacientes que desarrollan DHF y el síndrome de choque por DV comparados con los pacientes que solo presentan las manifestaciones clínicas menos severas (Olsen, et al. 2004) (Gonclavez, et al. 2007) (Halstead, 1979). Estas observaciones sugieren que se puede revertir el progreso de la enfermedad si se administra, de manera oportuna, moléculas antivirales que tengan como blanco inhibir etapas importantes del ciclo replicativo viral, disminuyendo la carga viral.

Hasta el momento se han probado en ensayos clínicos 5 tipos de moléculas para tratar las infecciones por DV, estas son estatinas (Martinez-Gutierrez M, et al.

2011; Martinez-Gutierrez M, et al. 2014; Whitehorn J, et al. 2016), cloroquina (Tricou V, et al. 2010; Farias KJ, et al. 2014; Farias K.J, et al. 2015;), iminoazucars (Wu SF, et al. 2002; PerryST, et al. 2013; Low JG, et al. 2014; Sayce AC, et al. 2016), corticosteroides (Sayce AC, et al. 2013; Tam DT, et al. 2012; Kularatne SA, et al. 2009; Tassniyom S, et al.1993; Sumarmo, et al. 1982) y análogos de nucleósidos (Kaptein & Neyts, 2016; Nguyen 2012). Hasta el momento no han mostrado resultados relevantes para controlar la infección.

### 1.5.1 ANTECEDENTE DIRECTO

Realizando un análisis in silico de las moléculas aprobadas por la FDA (1884 moléculas diferentes desde 1939 al 2018) (<http://chemoinfo.ipmc.cnrs.fr/>) que interaccionaban con la polimerasa viral, obtuvimos a Delta ( $\delta$ ) tocoferol ( $\delta$ T) como una molécula con potencial en 3 evaluaciones independientes que realizamos.

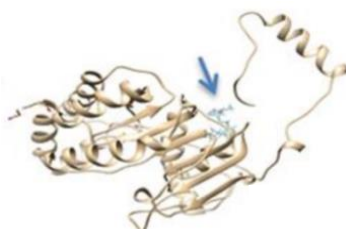


Figura 4. Estructura de la polimerasa viral con delta tocoferol. Representación del dominio de metiltransferasa de DV (que se obtuvo de una dinámica molecular de 20 ns) con la delta tocoferol.

### 1.6 VITAMINA E

El término Vitamina E se refiere a tococromanoles, los cuales son producidos exclusivamente por organismos fotosintéticos y por lo tanto presentes en distintas concentraciones en la mayoría de los alimentos de origen vegetal (Podszun, 2014).

Los tococromanoles naturales comprenden dos series homólogas: los tocoferoles con una cadena lateral saturada y los tocotrienoles con una cadena lateral

insaturada. Adicionalmente los tocotrienoles se diferencian de los tocoferoles porque poseen un farnesilo en lugar de una cadena lateral C16 isoprenoide saturada (Figura 5) (Colombo, 2010). Los homólogos de la vitamina E del tococromanol con mayor difusión en la naturaleza son cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ - tocoferol y  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ - tocotrienol (Figura 5).

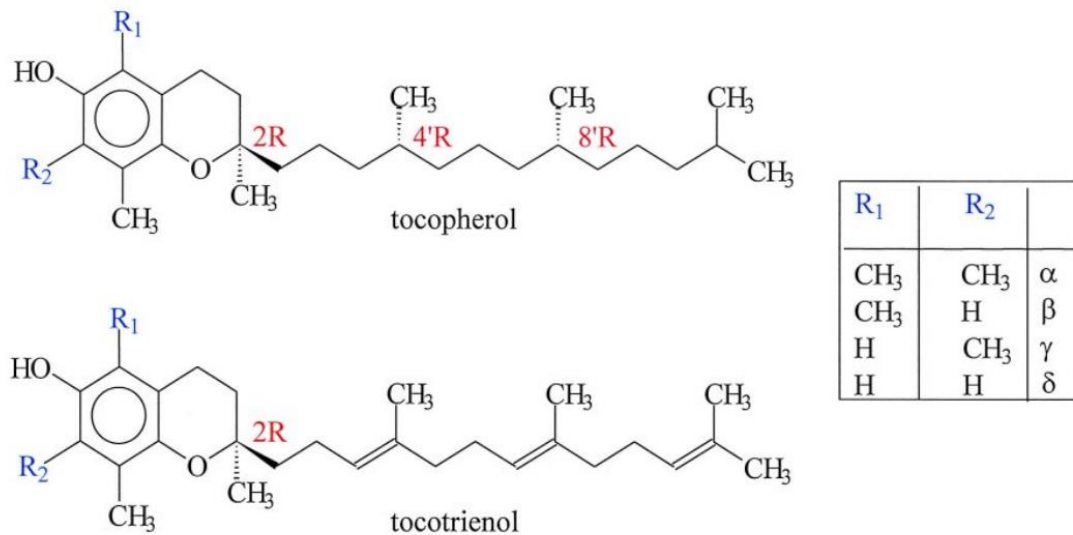


Figura 5. Componentes de la vitamina E

### 1.6.1 TOCOFEROLES

Los tocoferoles son reconocidos debido a que inhiben la oxidación de lípidos. Sus propiedades antioxidantes son en su mayoría debido a los anillos fenólicos en el anillo de cromanol que son donados a los radicales libres de los lípidos. La diferencia estructural en el anillo de cromanol puede ser el responsable por la diferencia en la actividad de cada forma de tocoferol (Smolarek, 2011).

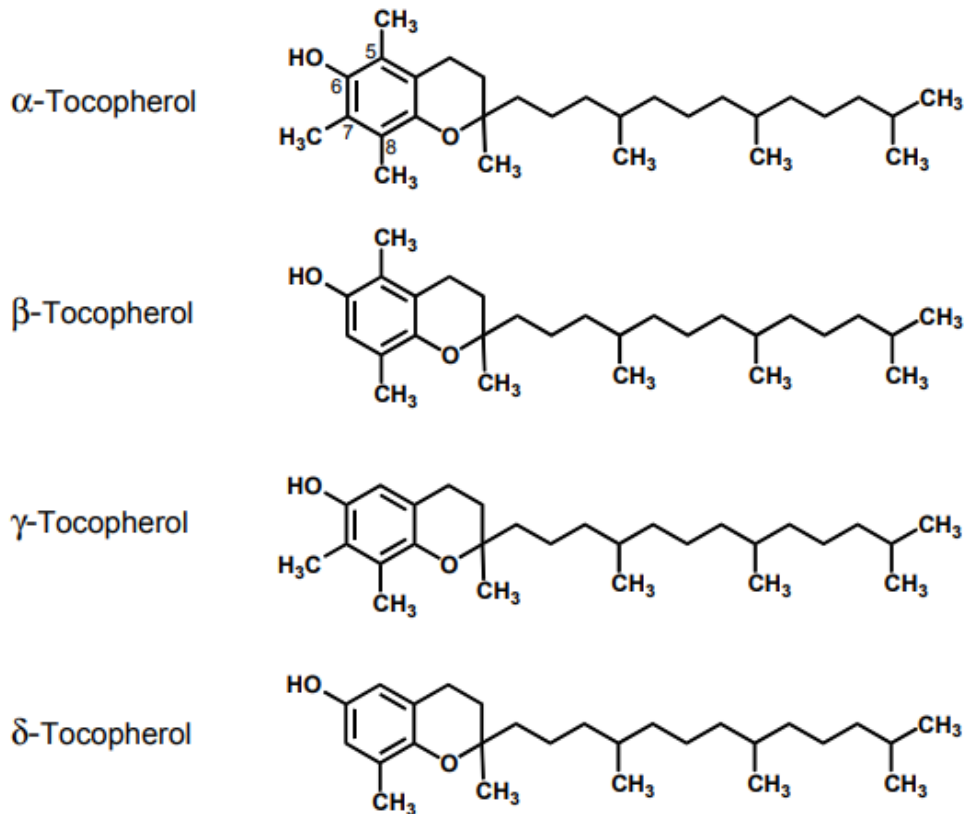


Figura 6. Estructura química de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - tocoferol.

### 1.6.2 FUNCIÓN ANTIOXIDANTE

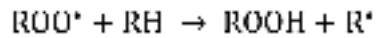
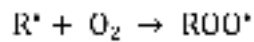
La vitamina E es un potente antioxidante que rompe cadenas e inhibe la producción de moléculas de especies reactivas del oxígeno cuando la grasa sufre una peroxidación durante la propagación de las reacciones de radicales libres. Se localiza principalmente en la membrana de las células y organelos donde puede ejercer protección al máximo (Rizvi, 2014). Estudios tanto *in vitro* como en animales muestran que los tocoferoles pueden apagar eficientemente el singlete de oxígeno y eliminar varios radicales derivados de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS), terminando así las reacciones en cadena de peroxidación lipídica (Maeda, 2007).

Los antioxidantes pueden dividirse en dos grupos. Preventivos, los cuales reducen la velocidad de la iniciación y los rompe-cadenas, que interfieren con uno o más pasos de propagación en el proceso de peroxidación lipídica (Van Acker et al. 1993), el cual puede ser representado por:

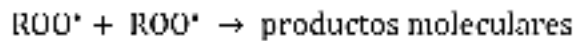
Iniciación:

Producción de R\*

Propagación:

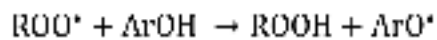


Terminación

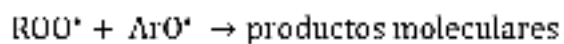


(RH representa una molécula lipídica y R\* el radical de carbono derivado de este por eliminación de un átomo de hidrógeno).

Los tocoferoles pertenecen al grupo de antioxidantes fenólicos que pueden interrumpir la autoxidación lipídica al interferir con la propagación en cadena o con los procesos de iniciación (Frankel, 1989). En este proceso de interferencia los radicales peroxilo portadores de la cadena son "atrapados":



Puesto que los radicales de fenoxilo producidos se estabilizan, generalmente no continúan la cadena, sino que son destruidos eventualmente por la reacción con un segundo radical peroxilo:





Debido a esto, la reactividad frente a los radicales peroxilo juega un papel importante en la eficacia de un antioxidante rompe-cadenas como es el caso de los tocoferoles (Burton & Ingold, 1986).

### **1.6.3 FUNCIÓN NO ANTIOXIDANTE**

Todas las isoformas de tocoferol que se encuentra en la naturaleza tienen la forma RRR, ya que todos los carbonos quirales de la cadena lateral que se une al grupo cromanol tiene una configuración "R" en vez de "S". Una de las mejores evidencias de la función no antioxidante de  $\alpha$ -tocoferol está relacionada a su reconocimiento y transferencia. La isoforma con mayor concentración en suero es RRR- $\alpha$ -tocoferol y la proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol en el hígado específicamente separa RRR- $\alpha$ -tocoferol de todos los tocoferoles entrantes para incorporarlos en el plasma de lipoproteínas. Se ha sugerido que la proteína cinasa C es originalmente regulada a nivel celular por  $\alpha$ -tocoferol, el cual también produce una reducción significativa en la liberación del anión superóxido de monocitos, oxidación lipídica, liberación y adhesión al endotelio de interleucina-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), por lo que  $\alpha$ -tocoferol tiene el efecto biológico de inhibir la liberación de la citosina pro-inflamatoria IL-1  $\beta$  a través de la inhibición de la vía 5-lipoxigenasa (Azzi, 2000).

También se ha reportado actividad no antioxidante que involucra la regulación de genes celulares sobre todo los que tiene que ver con la regulación de la síntesis de lípidos CD36, SR-BI, SR-AI7II, TROPOMIOSINA, COLAGENO ALFA I, MMP-1, MMP-19, E-Selectina, VCAM-1, ICAM-1, Integrinas, Glycoproteina IIB, CTGF, IL-2, IL-4, IL-1B, TGF-B, alfa-TTP, Citocromo p450, Bcl2-L1, p27, Ciclina D1, Ciclina E, LDL receptor, HMG.CoA PPARgamma, Leptina, CD 95L y BACE (Zingg y Azzi, 2004).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

En este momento no hay una vacuna antiviral segura aprobada contra DV, ni un tratamiento antiviral específico. El manejo de la enfermedad está enfocado en controlar las densidades poblaciones del vector y el manejo de los síntomas de las personas infectadas. Por lo anterior, existe en el mundo una urgencia de encontrar diversas alternativas para prevenir o tratar la enfermedad por DV. En la actualidad una de las áreas en las que se ha enfocado la investigación en salud, es en la búsqueda de moléculas con actividad antiviral, principalmente moléculas ya aprobadas por la FDA. Esta aproximación, consiste en reutilizar moléculas usadas para tratar otros padecimientos para tratar otros nuevos, esto con el objetivo de acortar el tiempo en que este descubrimiento pueda llegar y beneficiar a la población afectada.

## **3. HIPÓTESIS**

Alfa(- $\alpha$ ) delta (- $\delta$ ) y gamma (- $\gamma$ ) tocoferol tienen efecto antiviral contra la infección por el virus del Dengue en líneas celulares de mamífero.

## **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto antiviral del alfa(- $\alpha$ ) delta (- $\delta$ ) y gamma (- $\gamma$ ) tocoferol contra el virus Dengue in vitro en líneas celulares de mamífero.

### **4.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar la viabilidad celular al ser tratadas con tocoferoles por separado y de manera combinada en células Huh-7 y en células Vero con el replicón de dengue serotipo 4.
- Comprobar el efecto antiviral a través de la detección del genoma viral dentro de la célula y fuera de la célula.
- Establecer el IC50 de los tocoferoles en las células Vero con el replicón de Dengue serotipo 4.

- Establecer el IC50 de los tocoferoles en las células Huh-7 infectadas con Dengue serotipo 2.

## 5. ESTRATEGIA METODOLÓGICA



### 5.1 CULTIVO CELULAR

En este estudio se utilizaron dos tipos de células: células Vero con replicón de DV4 (Alcaraz-Estrada, 2014) (línea celular epitelial de mono verde africano) y células HUH-7 (línea celular de hepatoma humano) ya que estas células son blancos de infección del DV. Se cultivaron a 37°C en medio Gibco™

DMEM completo (8% de suero fetal bovino, 1x de penicilina, estreptomicina y 2x glutamina).

## **5.2 PREPARACIÓN DE TOCOFEROLES**

Se preparó una solución stock 100 mM de cada uno de los tocoferoles; alfa (- $\alpha$ ) y delta (- $\delta$ ) utilizando DMSO como diluyente.

## **5.3 EXTRACCIÓN RNA**

Se realizó extracción del RNA utilizando alícuotas de 100  $\mu$ l de sobrenadante del virus al cual se le adicionaron dos volúmenes de trizol, se mezcló y se dejó incubar durante 10 minutos. Después se agregaron dos volúmenes de etanol al 100%, se mezcló, se colocaron las muestras en columnas y se centrifugo a 12 000 rpm durante 75 segundos. Se decantó el sobrenadante, se agregaron 500  $\mu$ l de buffer de trabajo (Tris HCl 10 mM, EDTA 1mM, H<sub>2</sub>O, Etanol) y se centrifugo a 12 000 rpm durante 75 segundos (se repitió el proceso dos veces).

Una vez decantado el sobrenadante, se centrifugó a 12 000 rpm durante 60 segundos y se pasaron las columnas a tubos de 1.5 ml, después se agregaron 35  $\mu$ l de agua inyectable (precalentada a 37 °C en baño María) y se centrifugo a 12 000 rpm durante 75 segundos. El RNA fue almacenado a -20°C para su posterior cuantificación.

## **5.4 DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD**

Para determinar si los tocoferoles tienen efectos negativos en la proliferación celular se realizaron ensayos MTS. Se sembraron 5x10<sup>4</sup> de células Vero con el replicón de DV4 y HUH-7 en una multiplaca de 96 pozos y se trataron las células con alfa (- $\alpha$ ), delta (- $\delta$ ) y gamma (- $\gamma$ ) tocoferol durante 48 horas. Posteriormente se retiró el medio a toda la placa y se agregaron 100  $\mu$ l de reactivo de viabilidad MTS

(dilución 1:10); se dejó incubar 15 minutos, se leyó la viabilidad en el espectrofotómetro utilizando el programa Magellan; se dejó incubar 15 minutos más y se volvió a leer viabilidad a una longitud de onda de 490 nm. La concentración citotóxica (CC50) se determinó mediante una regresión lineal al graficar la concentración del extracto contra el porcentaje de viabilidad.

## **5.5 ENSAYO DE LUCIFERASA**

El ensayo de luciferasa se utilizó para evaluar la efectividad antiviral de los tocoferoles contra el virus del Dengue a nivel extracelular; para esto se sembraron  $5 \times 10^4$  de células Vero con el replicón de DV4 en una multiplaca de 96 pozos y se dejó incubar a  $37^\circ\text{C}$  durante una hora. Se retiró el sobrenadante y se realizó un lavado con 100  $\mu\text{l}$  de PBS (amortiguador salino de fosfatos). Se agregaron 30  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis 1x y con la punta de la pipeta se raspó cada pozo para ayudar al lisado de las células, después se enjuagaron tres veces con una jeringa de insulina. Se recolectó cada muestra en tubos eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 30  $\mu\text{l}$  de la mezcla del sustrato de luciferasa y buffer de ensayo resuspendiendo 3 veces para mezclar; posteriormente se leyó a 10 segundos. Cada experimento se realizó por triplicado. La concentración inhibitoria (IC50) se calculó utilizando el programa Quest Graph™ IC50 Calculator (AAT Bioquest, Inc).

## **5.6 INFECCIÓN CON DENV2 EN CÉLULAS HUH-7**

Se sembraron  $5 \times 10^4$  células HUH-7 en una multiplaca de 96 pozos y se infectaron con 50  $\mu\text{l}$  de virus DV2 con una multiplicidad de infección (MOI) de 0.5, y se dejaron incubar durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . Pasada la hora de infección, se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de glicina ácida (8  $\mu\text{L}$  de glicina en 42  $\mu\text{L}$  de medio DMEM sin suero y antibiótico) para inactivar el virus, se retiró la glicina ácida y se realizaron dos lavados con medio DMEM sin suero y sin antibiótico. Posteriormente se retiró el medio, se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de las diluciones de alfa ( $-\alpha$ ) y delta ( $-\delta$ ) tocoferol en concentraciones de 0.096  $\mu\text{M}$  a 300  $\mu\text{M}$  respectivamente (diluciones en base a 5),

se realizó ese experimento por lo menos tres veces por duplicado; utilizando DMSO (dimetil sulfóxido) como control y se dejó incubar durante 48 horas a 37°C. Se tomaron alícuotas del cultivo pasadas las 48 horas.

## **5.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA DE TRANSCRIPCIÓN INVERSA EN TIEMPO REAL (RT-PCR)**

Se realizó una RT-PCR de un solo paso para confirmar la presencia *in vitro* de DV2, a partir del RNA aislado utilizando el kit AgPath-ID™ (Thermo Fisher™), los iniciadores D2F, D2C y la sonda D2.

## **5.8 PLAQUEO**

El título viral se determinó por plaqueo. Se sembraron células  $5 \times 10^4$  de células Vero y se infectaron con DV2 a una MOI de 1 por una h. Posteriormente se eliminó el virus y se lavaron las células con glicina acida para remover el virus que no se absorbió. Se trataron las células con 2 uM de alfa (- $\alpha$ ), delta (- $\delta$ ) y gamma (- $\gamma$ ) tocoferol durante 48 horas. Posteriormente se colectó el sobrenadante y se guardó a -80 °C hasta su uso. Se realizaron diluciones seriadas en base a 10 de los sobrenadantes colectados y se agregó a  $2 \times 10^5$  de células Vero sembradas en una multiplaca de 24. Se dejó 1 h para que se absolviera el virus y posteriormente se agregó carboximetilcelulosa al 0.5%. A los 5 días se eliminó la carboximetilcelulosa las células se fijaron y tiñeron con cristal violeta. El título viral se expresa en PFU/mL.

# **6. RESULTADOS**

## **DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR**

Un paso inicial para determinar la eficacia de una molécula es determinar si estas moléculas tienen algún efecto citotóxico sobre las células modelo de estudio, para esto se realizan ensayos de viabilidad usando la sal MTS. Este ensayo se basa en

la reducción de MTS, por parte de células viables de mamífero para generar un colorante de formazán soluble en medios de cultivo celular, conversión que llevan a cabo las enzimas deshidrogenasa dependiente de la NADPH en células metabólicamente activas. El colorante resultante se cuantifica midiendo la absorbancia a 490-500 nm.

Los resultados de la viabilidad a concentraciones bajas de 0.096 uM hasta 2500 uM y 300uM para células Vero y Huh-7, respectivamente, se obtuvieron a las 48h post tratamiento (figura 7 y 9). No se observan resultados negativos en la proliferación celular para ninguno de los tocoferoles ya sea individualmente o en combinaciones (figura 8); alfa (-α) y gamma (-γ) tocoferol muestran un efecto positivo a partir de 300uM en células Vero y desde 0.096uM para Huh-7.

En combinaciones se usaron concentraciones de 0.48 uM hasta 2500 uM (figura 8). Alfa-delta (-αδ), y delta-gamma (-δγ) tocoferol tienen efecto positivo de los 300uM a los 1000uM mientras que para alfa-gamma (-αγ) se observa a partir de 300uM hasta 2000uM.

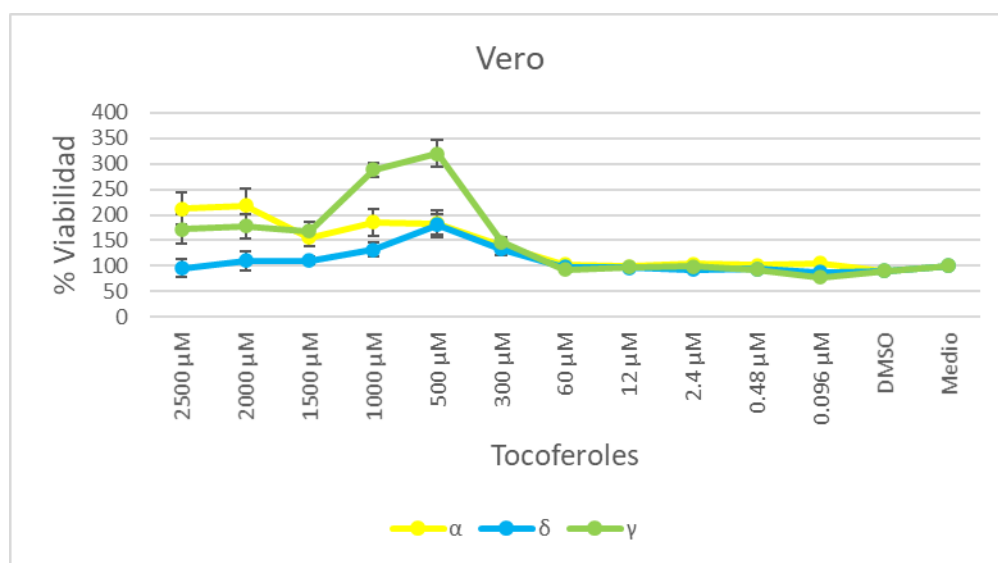


Figura 7. Ensayo MTS en células Vero con replicón de DENV4 tratadas durante 48 h con alfa (-α) tocoferol, delta (-δ), gamma (-γ) tocoferol y su combinación a concentraciones de 0.096μM a 2500μM. Medio DMEM y DMSO como controles.

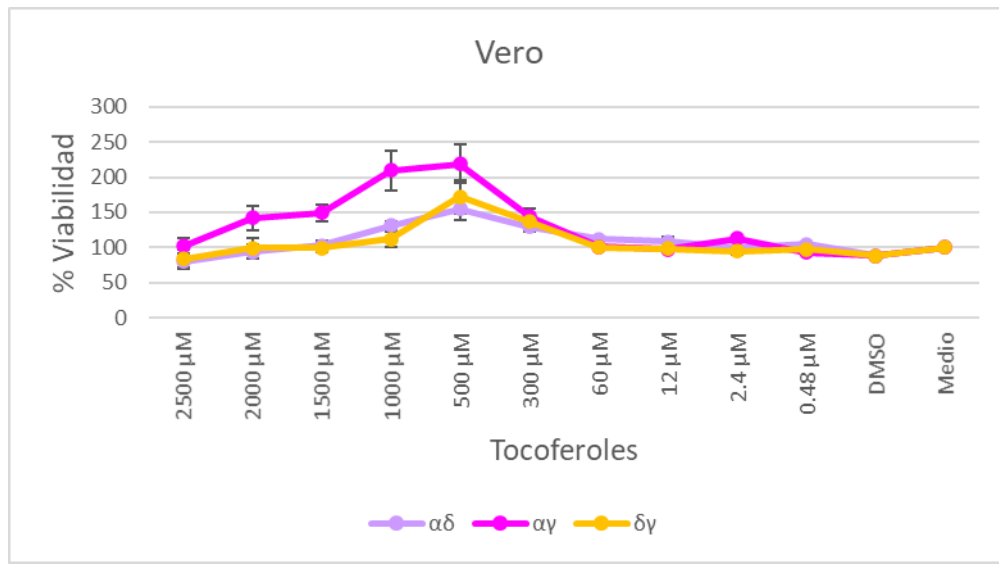


Figura 8. Ensayo MTS en células Vero con replicón de DENV4 tratadas durante 48 h con combinaciones de alfa-delta ( $-\alpha\delta$ ), delta-gamma ( $-\delta\gamma$ ) y alfa-gamma ( $-\alpha\gamma$ ) tocoferol a concentraciones de  $0.48\mu\text{M}$  a  $2500\mu\text{M}$ . Medio DMEM y DMSO como controles.

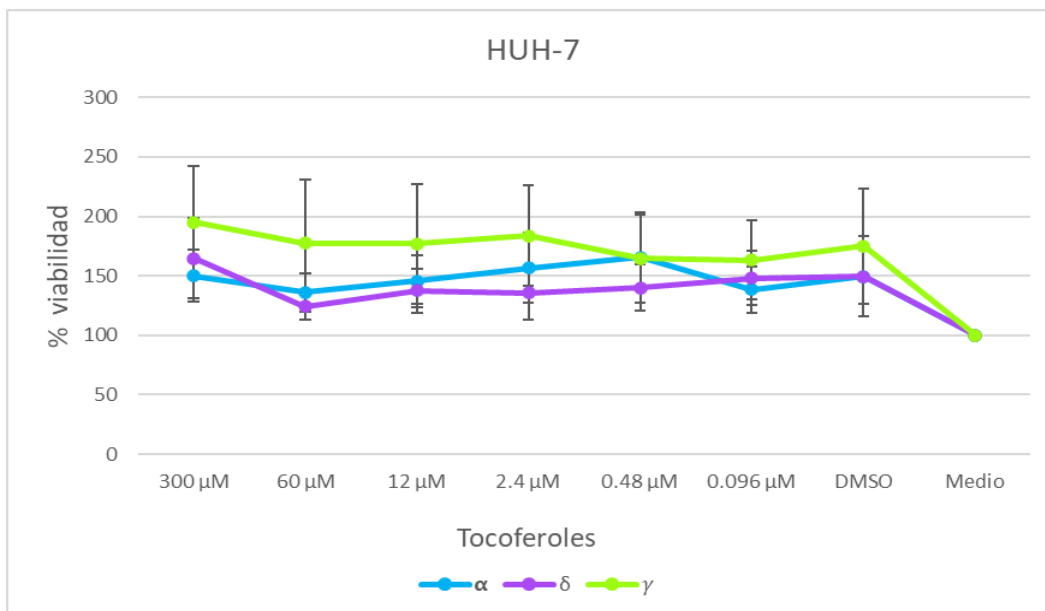


Figura 9. Ensayo MTS en células Huh-7 infectadas con DENV2 tratadas durante 48 h con alfa ( $-\alpha$ ) tocoferol, delta ( $-\delta$ ), gamma ( $-\gamma$ ) tocoferol y su combinación a concentraciones de  $0.96\mu\text{M}$  a  $300\mu\text{M}$ . Medio DMEM y DMSO como controles.



## EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL A TRAVÉS DE ENSAYOS DE LUCIFERASA

Para evaluar la actividad antiviral de los tocoferoles contra el virus Dengue a nivel extracelular, se realizó el ensayo de actividad de luciferasa a células Vero que expresan de manera estable el replicón de DENV4, tratadas con alfa ( $\alpha$ ), delta ( $\delta$ ) y gamma ( $\gamma$ ) tocoferol y sus combinaciones durante 48 horas. Delta ( $\delta$ ) tocoferol con sus combinaciones, muestra una actividad antiviral a partir de 500  $\mu$ M, mientras que alfa ( $\alpha$ ) y gamma ( $\gamma$ ) tocoferol únicamente en combinaciones (figura 10 y 11).

Ya que delta ( $\delta$ ) tocoferol muestra una actividad antiviral mayor a los demás tocoferoles y alfa ( $\alpha$ ) tocoferol es el más abundante de manera natural, se realizaron tres ensayos a 48, 72 y 96 h manteniendo delta ( $\delta$ ) tocoferol a una concentración constante de 500  $\mu$ M y 100  $\mu$ M en combinación con alfa ( $\alpha$ ) tocoferol. Delta tocoferol con sus combinaciones, muestra una actividad antiviral a partir de 500  $\mu$ M a las 48 h, 300  $\mu$ M a las 72 h y 60  $\mu$ M a las 96 h (figura 9).

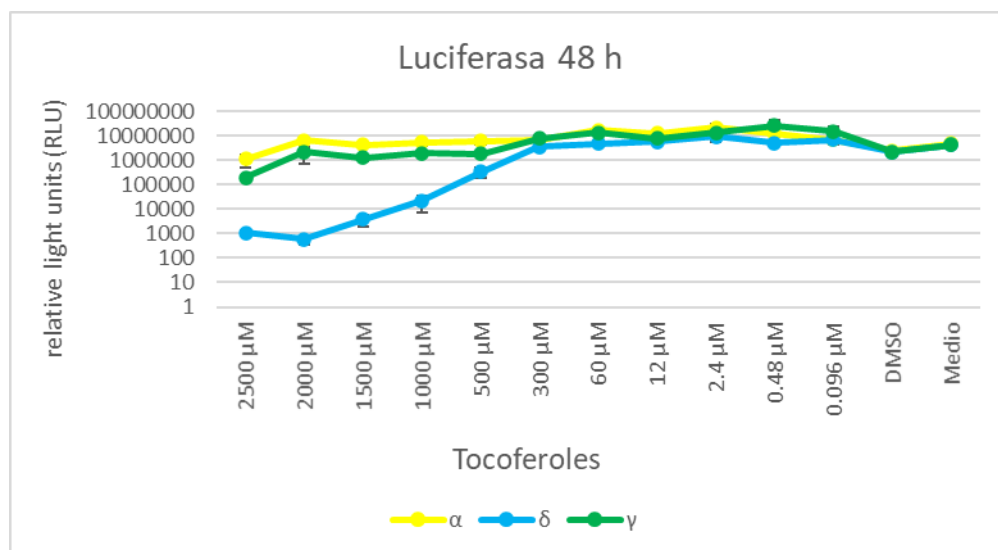


Figura 10. Ensayo de luciferasa realizado en células Vero con replicón de DENV4 tratadas durante 48h, alfa ( $\alpha$ ) tocoferol, delta ( $\delta$ ), gamma ( $\gamma$ ) tocoferol a concentraciones de 0.096  $\mu$ M a 2500  $\mu$ M.

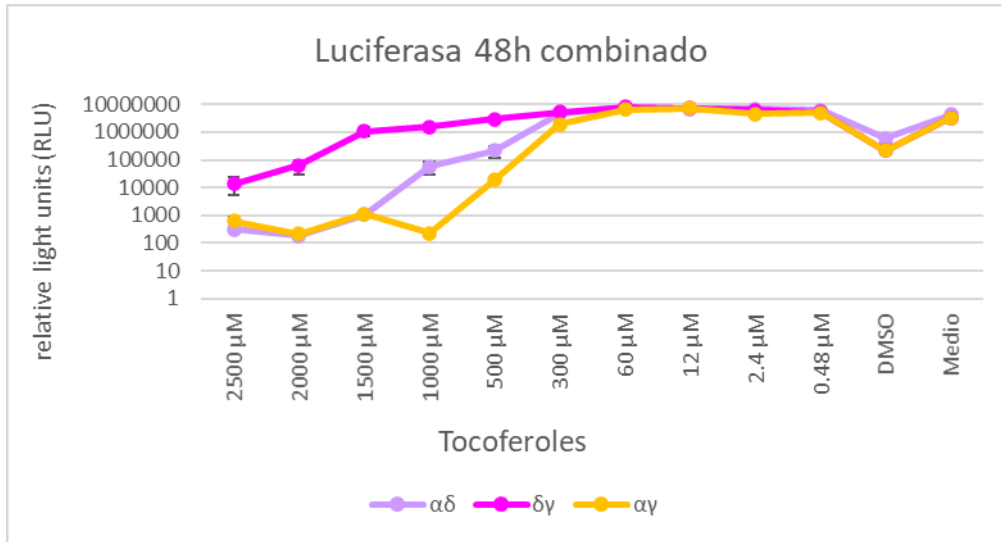
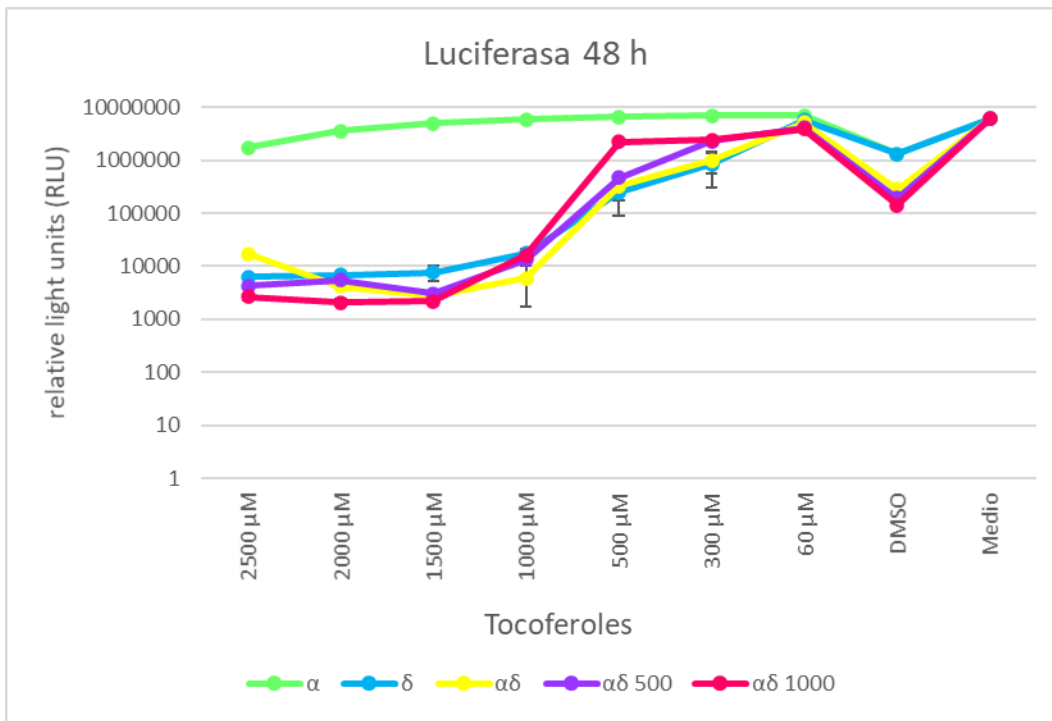
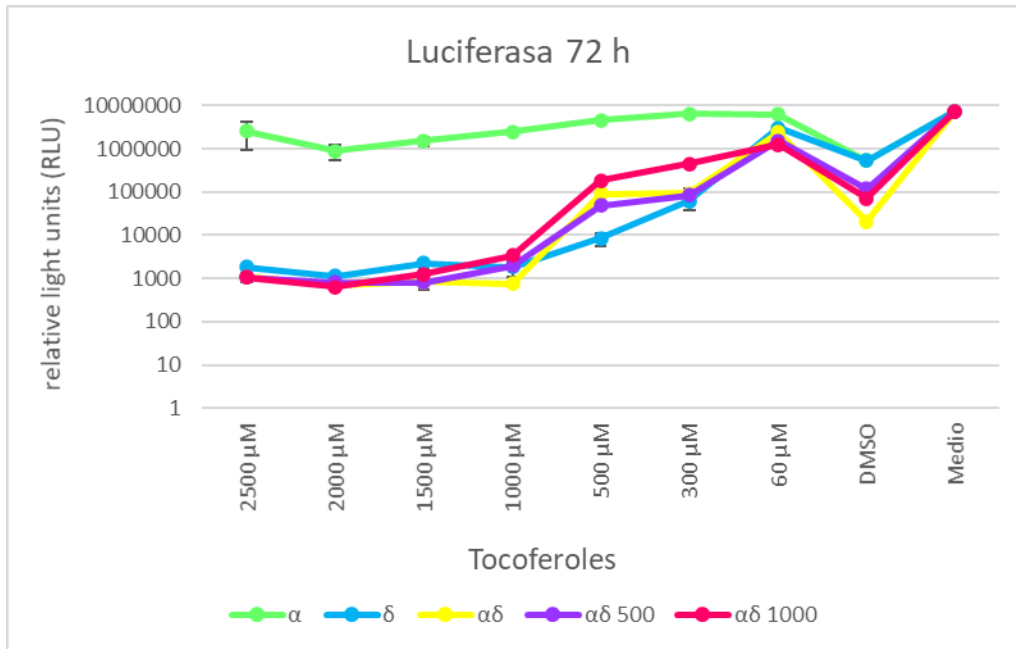


Figura 11. Ensayo de luciferasa realizado en células Vero con replicón de DENV4 tratadas durante 48h con combinaciones de alfa-delta ( $-\alpha\delta$ ), delta-gamma ( $-\delta\gamma$ ) y alfa-gamma ( $-\alpha\gamma$ ) tocoferol a concentraciones de 0.48 $\mu\text{M}$  a 2500 $\mu\text{M}$ . Medio DMEM y DMSO como controles.

A)



B)



C)

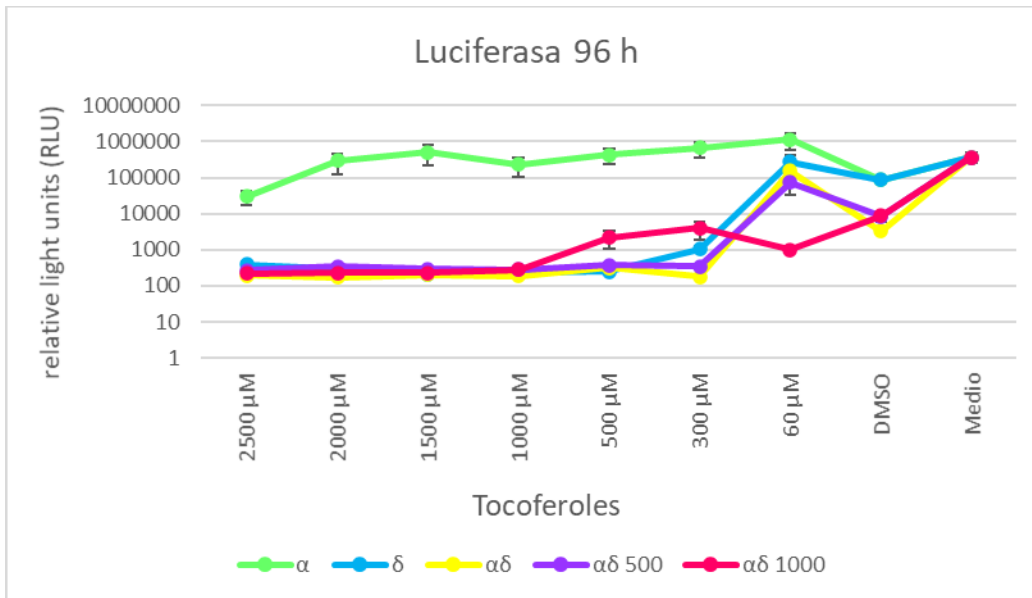


Figura 12. Ensayo de luciferasa realizado en células Vero con replicón de DENV4 tratadas durante 48 (A), 72 (B), y 96 h (C), con alfa (-α) y delta (-δ) tocoferol a concentraciones de 60µM a 2500µM. Para la primera muestra en combinaciones se utilizó la misma concentración de cada tocoferol,

mientras que para las combinaciones  $\alpha\delta 500$  y  $\alpha\delta 1000$ , delta ( $-\delta$ ) tocoferol se mantuvo constante a 500  $\mu\text{M}$  y 1000  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

## POTENCIAL INHIBITORIO DE TOCOFEROL SOBRE LA INFECCIÓN POR DENGUE

Las decisiones sobre la idoneidad de nuevas propuestas de tratamientos se basan principalmente en los tres parámetros básicos CC50 (como medida de toxicidad) que es la concentración a la cual se reduce la viabilidad celular en un 50%, IC50 (como medida del potencial inhibitorio) que es la concentración necesaria de un inhibidor para reducir la actividad biológica de interés en un 50% y el índice terapéutico que producen ( $TI = CC50 / IC50$ ), es decir la relación entre la concentración en la que el compuesto se vuelve tóxico y en la que es efectivo.

En este caso se tuvo la fortuna que en los tiempos y concentraciones experimentales probadas no se pudo determinar el CC50, sin embargo, esto también impidió que se determinara el índice terapéutico (tabla 1 y 2).

Tocoferol	IC50
$\alpha$	1999.95 $\mu\text{M}$
$\delta$	232.458 $\mu\text{M}$
$\alpha\delta$	251.105 $\mu\text{M}$
$\alpha\delta 500 \mu\text{M}$	376.678 $\mu\text{M}$
$\alpha\delta 1000 \mu\text{M}$	619.098 $\mu\text{M}$

Tabla 1. Concentración Inhibitoria Media (IC50) evaluada a partir de los resultados de la expresión de luciferasa y viabilidad de células Vero 48, 72 y 96 h post-tratamiento con alfa ( $-\alpha$ ) y delta ( $-\delta$ ) tocoferol a concentraciones de 60 $\mu\text{M}$  a 2500 $\mu\text{M}$ . Para las combinaciones  $\alpha\delta 500$  y  $\alpha\delta 1000$  la concentración de delta ( $-\delta$ ) tocoferol se mantuvo constante a 500  $\mu\text{M}$  y 1000  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Tocoferol	IC50
$\alpha$	391.527 $\mu$ M
$\delta$	14.099 $\mu$ M
$\gamma$	3.849 $\mu$ M

Tabla 2. Concentración Inhibitoria Media (IC50) evaluada a partir de los resultados de la RT-PCR de células Huh-7 infectadas con DV2 y tratadas con alfa (- $\alpha$ ), delta (- $\delta$ ), y gamma (- $\gamma$ ) tocoferol durante 48 h a concentraciones de 0.096  $\mu$ M a 300 $\mu$ M, DMSO y medio como controles.

### DETERMINACIÓN DE INHIBICIÓN DE LA REPLICACIÓN VIRAL POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA DE TRANSCRIPCIÓN INVERSA EN TIEMPO REAL (RT-PCR)

Un órgano blanco de la infección de DV es el hígado por lo tanto se decidió probar estas moléculas en células de hígado (Huh-7). Se realizó una RT-PCR de un solo paso para confirmar la presencia *in vitro* del genoma viral de DV2 en células Huh-7 infectadas con el virus y tratadas durante 48 h con alfa (- $\alpha$ ), delta (- $\delta$ ) y gamma (- $\gamma$ ) tocoferol. Alfa (- $\alpha$ ) tocoferol inhibió la expresión de DV2 a concentraciones de 0.096, 60 y 300 $\mu$ M mientras que delta (- $\delta$ ) y gamma(- $\gamma$ ) tocoferol lo hicieron a 0.096 $\mu$ M.

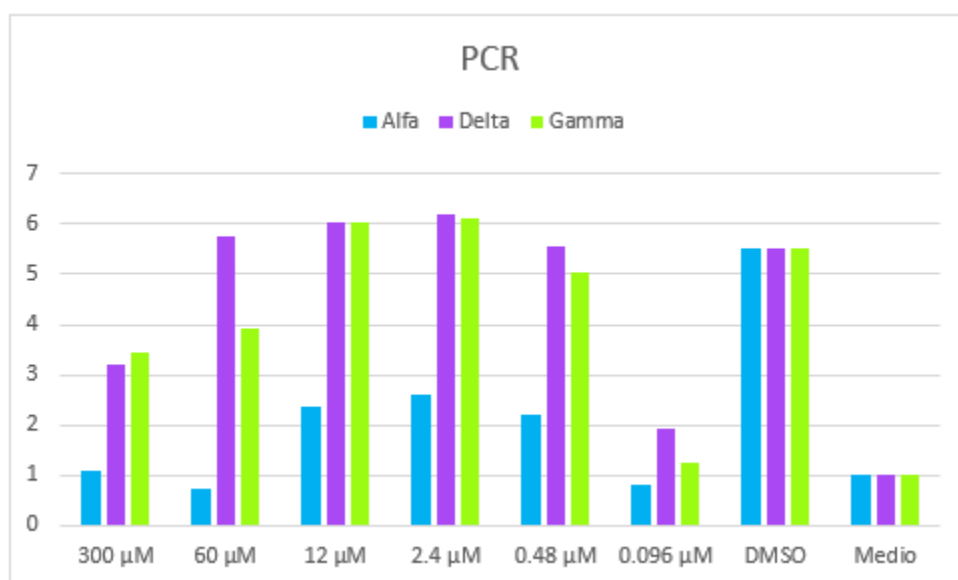


Figura 13. Efecto de alfa (- $\alpha$ ), delta (- $\delta$ ) y gamma (- $\gamma$ ) tocoferol en la inhibición de la transcripción de DV2 en células Huh-7.

## DETERMINACIÓN EN LA INHIBICIÓN DE LA INFECCION POR DV2 POR PLAQUEO EN CELULAS VERO.

Ante la discrepancia de que no se observó inhibición en células HUH7 por (- $\gamma$ ) tocoferol, se decidió determinar la inhibición de la infección por plaqueo en células Vero (figura 14). En este ensayo se pudo observar que delta (- $\delta$ ) tocoferol muestra una reacción de más de dos logaritmos en comparación con el control de medio.

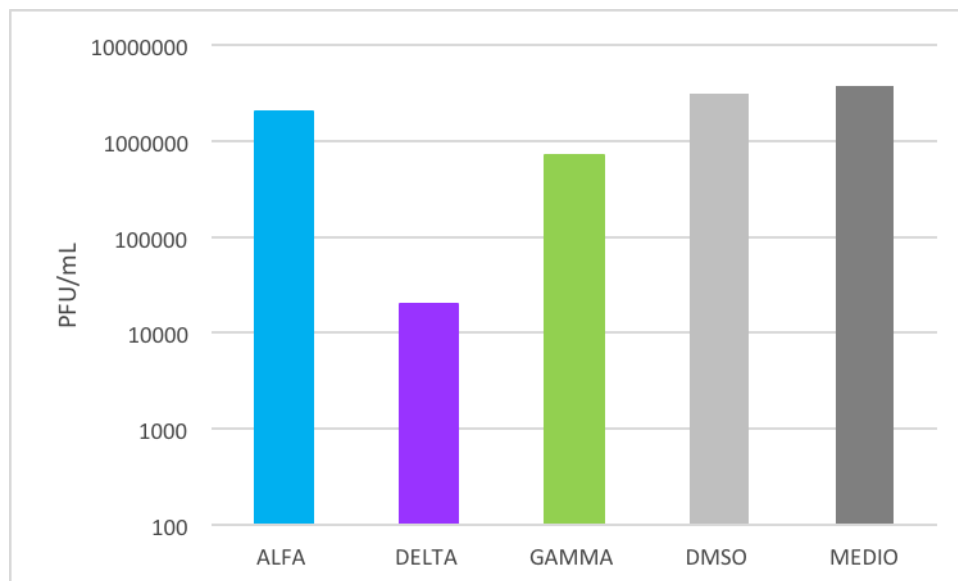


Figura 14. Delta (- $\delta$ ) tocoferol inhibe infección de DV2 en células Vero. Titulo viral determinado por plaqueo. Células fueron infectadas con DV2 y posteriormente tratadas con alfa (- $\alpha$ ), delta (- $\delta$ ) y gamma (- $\gamma$ ) tocoferol durante 48 h a una concentración de 2  $\mu$ M.

## 7. DISCUSIÓN

Se cree que, tras la picadura de mosquito el virus del Dengue se comienza a replicar inicialmente en las células dendríticas de la piel activando la producción de IFN tipo I, estos IFN secretados se unen a receptores IFN en las mismas células y

células vecinas activando la vía JAK/STAT. Las proteínas no estructurales NS2A, NS4A, NS4B y NS5 que forman parte del complejo de replicación bloquean la señalización de IFN reduciendo la activación de STAT. NS4A y NS4B se unen a AUP1 y promueven la traslocación de las gotas lipídicas a los autofagos para inducir lipofagia resultando en un incremento del metabolismo lipídico.

La infección del virus del Dengue altera las rutas metabólicas en los humanos incluyendo la síntesis de ácidos grasos,  $\beta$ -oxidación y catabolismo de fosfolípidos; esta reorganización tiene como objetivo crear un ambiente adecuado para la replicación viral y el ensamblaje, debido a esto los lípidos juegan un papel importante en distintos puntos de la replicación viral durante el proceso de infección.

Al utilizar moléculas que puedan modificar el proceso de síntesis de lípidos y su metabolismo como es el caso de los tocoferoles, puede ser posible inhibir el virus ya que este depende de la maquinaria de las células huésped para producir los elementos necesarios para su replicación. Así mismo, las propiedades antioxidantes de la Vitamina E pueden ayudar a evitar la trombocitopenia provocada por el estrés oxidativo, reduciéndolo y restaurando los niveles de plaquetas. Además, se ha comprobado que mejora la respuesta inmune celular y humoral mejorando la diferenciación de células T, la actividad de células NK, la proliferación de linfocitos y el funcionamiento de macrófagos.

Al utilizar células con replicón de DENV4 que codifica para renilla luciferasa (Rluc) se puede comprobar si los tocoferoles influyen en el mecanismo de replicación del virus; se observa una disminución en la expresión de la luciferasa en las células tratadas con combinaciones de alfa ( $-\alpha$ ) tocoferol y delta ( $-\delta$ ) tocoferol a concentraciones de 500 $\mu$ M y 1000 $\mu$ M 48 horas post tratamiento sin afectar su viabilidad.

## 8. CONCLUSIÓN

Alfa ( $-\alpha$ ), delta ( $-\delta$ ) y gamma ( $-\gamma$ ) tocoferol no muestran efectos negativos en la viabilidad celular ya sea utilizados individualmente o en combinaciones, sino que al contrario muestran un efecto positivo en su proliferación para la mayoría de las concentraciones probadas.

Alfa ( $-\alpha$ ), delta ( $-\delta$ ) y gamma ( $-\gamma$ ) tocoferol tocoferol tienen efecto antiviral contra el virus del Dengue, siendo delta ( $-\delta$ ) junto con sus combinaciones el que muestra un mayor efecto tanto de forma intracelular como extracelular.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- ✚ Alcaraz-Estrada, S. L., del Angel, R., & Padmanabhan, R. (2014). *Construction of Self-Replicating Subgenomic Dengue Virus 4 (DENV4) Replicon*. *Methods in Molecular Biology*, Vol 1138: 131–150.
- ✚ Alcaraz-Estrada, S. L., Manzano, M. I. M., Del Angel, R. M., Levis, R., & Padmanabhan, R. (2010). *Construction of a dengue virus type 4 reporter replicon and analysis of temperature-sensitive mutations in non-structural proteins 3 and 5*. *Journal of General Virology*, Vol. 91, 2713–2718.
- ✚ Alayli F., Scholle F. (2016) *Dengue Virus NS1 Enhances Viral Replication and pro-inflammatory Cytokine Production in Human Dendritic Cells*. *Virology*, Vol. 496, 227–236.
- ✚ Azzi, A., & Stocker, A. (2000). *Vitamin E: non-antioxidant roles*. *Progress in Lipid Research*, Vol. 39, 231-255.
- ✚ Barba-Spaeth G, Dejnirattisai W, Rouvinski A, Vaney MC, Medits I, Sharma A, et al. (2016). *Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization*. *Nature*, Vol. 536, 48–53.
- ✚ Barrows, N. J., Campos, R. K., Powell, S. T., Prasanth, K. R., Schott-Lerner, G., Soto-Acosta, R., Garcia-Blanco, M. A. (2016). *A Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection*. *Cell Host & Microbe*, Vol. 20, 259–270.



- ✚ Barrows, N. J., Campos, R. K., Liao, K.-C., Prasanth, K. R., Soto-Acosta, R., Yeh, S.-C. Garcia-Blanco, M. A. (2018). *Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses*. Chemical Reviews, Vol. 118, 4448–4482.
- ✚ Bharti, A.C.; Shukla, S.; Mahata, S.; Hedau, S.; Das, B.C. (2009) *Anti-human papillomavirus therapeutics: Facts & future*. Indian Journal of Medical Research, Vol. 130, 296–310.
- ✚ Blackburn, G.M.; Gait, M.J.; Loakes, D.; Williams, D.M. (2006) *Nucleosides and Nucleotides*. Nucleic Acids in Chemistry and Biology, 3rd Ed.; 77–142.
- ✚ Burton, G. W., & Ingold, K. U. (1986). *Vitamin E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function*. Accounts of Chemical Research, Vol 19, 194–201.
- ✚ Cecilia D., (2014). *Current status of Dengue and Chikungunya in India*. WHO South-East Asia Journal of Public Health, Vol 3, 22–27.
- ✚ Chander, G.; Sulkowski, M.S.; Jenckes, M.W.; Torbenson, M.S.; Herlong, H.F.; Bass, E.B.; Gebo, K.A. (2002) *Treatment of chronic hepatitis C: A systematic review*. Hepatology Vol. 36, 135–144.
- ✚ Chandra P., Sharma H., Guptal A., Rai Y., (2013). *Role of Antioxidant Vitamin E and C on Platelet Levels in Dengue Fever*. International Journal of Basic and Applied Medical Science, Vol 3, 287-291.
- ✚ Clyde, K., Kyle, J. L., & Harris, E. (2006). *Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis*. Journal of Virology, Vol. 80, 11418–11431.
- ✚ De Clercq, E. (2004). *Antiviral drugs in current clinical use*. Journal of Clinical Virology, Vol 30, 115–133.
- ✚ De Clercq, E. (2007) *The Design of Drugs for HIV and HCV*. Nature Reviews Drug Discovery, Vol. 6, 1001-1018.
- ✚ Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, Rouvinski A, Barba-Spaeth G, Duangchinda T, et al. (2016) *Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus*. Nature Immunology, Vol. 17, 1102–1108.

- ✚ Dionicio, C. L., Peña, F., Constantino-Jonapa, L. A., Vazquez, C., Yocupicio-Monroy, M., Rosales, R., Ludert, J. E. (2018). *Dengue virus induced changes in Ca<sup>2+</sup> homeostasis in human hepatic cells that favor the viral replicative cycle*. *Virus Research*, Vol. 245, 17–28
  
- ✚ Dykxhoorn DM, Lieberman J (2006) *Silencing Viral Infection*. *PLoS Medical* Vol. 3, e242.
  
- ✚ Farias KJ, et al. (2014) *Chloroquine interferes with dengue-2 virus replication in U937 cells*. *Microbiology and Immunology*, Vol. 58, 318–26.
  
- ✚ Farias KJ, et al. (2015) *Antiviral activity of chloroquine against dengue virus type 2 replication in Aotus monkeys*. *Viral Immunology*. Vol. 28, 161–9.
  
- ✚ Frankel, E. N. (1989). *The Antioxidant and Nutritional Effects of Tocopherols, Ascorbic Acid and  $\beta$ -Carotene in Relation to Processing of Edible Oils*. *Nutritional Impact of Food Processing*, Vol. 43, 297–312.
  
- ✚ Gravina, H. D., Suzukawa, A. A., Zanluca, C., Cardozo Segovia, F. M., Tschá, M. K., Martins da Silva, A., Duarte dos Santos, C. N. (2019). *Identification of insect-specific flaviviruses in areas of Brazil and Paraguay experiencing endemic arbovirus transmission and the description of a novel flavivirus infecting Sabethes belisarioi*. *Virology*, Vol. 527, 98–106.
  
- ✚ Haagmans B. L, Andeweg A. C, Osterhaus A. D., (2009). *The Application of Genomics to Emerging Zoonotic Viral Diseases*. *PLoS Pathogens*, Vol 5, e1000557.
  
- ✚ Hasan, S. S., Sevvana, M., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2018). *Structural biology of Zika virus and other flaviviruses*. *Nature Structural & Molecular Biology*, Vol. 25, 13-20.
  
- ✚ Kaptein, S. J., & Neyts, J. (2016). *Towards antiviral therapies for treating dengue virus infections*. *Current Opinion in Pharmacology*, Vol. 30, 1–7.
  
- ✚ Kindhauser, M. K., Allen, T., Frank, V., Santhana, R. S., & Dye, C. (2016). *Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus*. *Bulletin of the World Health Organization*, Vol. 94, 675-686.

- ✚ Kuadkitkan, A., Wikan, N., Fongsaran, C., & Smith, D. R. (2010). *Identification and characterization of prohibitin as a receptor protein mediating DENV-2 entry into insect cells*. *Virology*, Vol. 406, 149–161.
- ✚ Kularatne, S A., et al. *Efficacy of low dose dexamethasone in severe thrombocytopenia caused by dengue fever: a placebo-controlled study*. *Postgraduate Medical Journal*, Vol. 85, 525–529.
- ✚ Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. (2008). *Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007*. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 14, 1232–1239.
- ✚ Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (2003). *Molecular Biology of Flaviviruses*. *Advances in Virus Research*, Vol. 5, 23–61.
- ✚ Low, J. G., Sung, C., Wijaya, L., Wei, Y., Rathore, A. P. S., Watanabe, S., Vasudevan, S. G. (2014). *Efficacy and safety of celgosivir in patients with dengue fever (CELADEN): a phase 1b, randomised, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept trial*. *The Lancet Infectious Diseases*, Vol. 14, 706–715
- ✚ Maeda, H., DellaPenna, D. (2007). *Tocopherol functions in photosynthetic organisms*. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 10, 260–265.
- ✚ Martínez-Gutierrez, M., Castellanos, J. E., & Gallego-Gómez, J. C. (2011). *Statins Reduce Dengue Virus Production via Decreased Virion Assembly*. *Intervirology*, Vol. 54, 202–216
- ✚ Martinez-Gutierrez, M., Correa-Londoño, L. A., Castellanos, J. E., Gallego-Gómez, J. C., & Osorio, J. E. (2014). *Lovastatin Delays Infection and Increases Survival Rates in AG129 Mice Infected with Dengue Virus Serotype 2*. *PLoS ONE*, Vol. 9, e87412.
- ✚ Nguyen, N. M., Tran, C. N. B., Phung, L. K., Duong, K. T. H., Huynh, Huy le Anh, Farrar, J. Simmons, C. P. (2012). *A Randomized, Double-Blind Placebo Controlled Trial of Balapiravir, a Polymerase Inhibitor, in Adult Dengue Patients*. *The Journal of Infectious Diseases*, Vol. 207, 1442–1450.
- ✚ Pantoja P, Pérez-Guzmán EX, Rodríguez IV, White LJ, González O, Serrano C, et al. (2017) *Zika virus pathogenesis in rhesus macaques is*

*unaffected by pre-existing immunity to dengue virus.* Nature Communications, Vol. 8, 15674.

- ✚ Pardigon, N. (2017). *Pathophysiological mechanisms of Flavivirus infection of the central nervous system.* Transfusion Clinique et Biologique, Vol. 24, 96–100.
- ✚ Paul LM, Carlin ER, Jenkins MM, Tan AL, Barcellona CM, Nicholson CO, et al. (2016) *Dengue virus antibodies enhance Zika virus infection.* Clinical and Translational Immunology, Vol. 5, e117
- ✚ PerryST,etal (2013). *An iminosugar with potent inhibition of dengue virus infection in vivo.* Antiviral Research, Vol. 98, 35–43.
- ✚ Podzun., Jan F., (2014). *Vitamin E interactions: molecular basis and clinical relevance.* Nutrition research reviews, Vol. 27, 215-231
- ✚ Rerks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., Nitayaphan, S., Kaewkungwal, J., Chiu, J., Paris, R., ... & Benenson, M. (2009). *Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand.* New England Journal of Medicine, Vol. 36, 2209-2220.
- ✚ Rigau-Pérez J., Clark G., Gubler D., Reiter P., Sanders E., Vorndam A. (1998). *Dengue and dengue haemorrhagic fever.* The Lancet, Vol. 352, 971–77.
- ✚ Rizvi S., Raza S., Ahmed F., Ahmad A., Abbas S., Mahdi F., (2013). *The Role of Vitamin E in Human Health and Some Diseases.* Sultan Qaboos University Medical Journal, Vol. 14, 157-165.
- ✚ Robbiani DF, Bozzacco L, Keeffe JR, Khouri R, Olsen PC, Gazumyan A, et al. (2017) *Recurrent potent human neutralizing antibodies to Zika virus in Brazil and Mexico.* Cell, Vol. 169, 597–609.
- ✚ Sayce, A. C., Alonzi, D. S., Killingbeck, S. S., Tyrrell, B. E., Hill, M. L., Caputo, A. T., Zitzmann, N. (2016). *Iminosugars Inhibit Dengue Virus Production via Inhibition of ER Alpha-Glucosidases—Not Glycolipid Processing Enzymes.* PLOS Neglected Tropical Diseases, Vol. 10, e0004524.

- ✚ Smolarek A., Suh N., (2011) *Chemoprotective Activity of Vitamin E in Breast Cancer: A Focus on  $\gamma$ - $\gamma$ - $\delta$  tocoferol*. *Nutrients*, Vol. 3, 962-986.
- ✚ Sumarmo, D., Talogo, W., Asrin, A., Isnuhandoyo, B., Sahudi, A. (1982). *Failure of Hydrocortisone to Affect Outcome in Dengue Shock Syndrome*. *Pediatrics*, Vol. 69, 9-45.
- ✚ Tam, D. T., et al. (2012) *Effects of short-course oral corticosteroid therapy in early dengue infection in Vietnamese patients: a randomized, placebo-controlled trial*. *Clinical Infection Disease*. Vol. 55, 1216–1224.
- ✚ Tassniyom, S., Vasanawathana, S., Chirawatkul, A., Rojanasuphot, S. (1993). *Failure of High-Dose Methylprednisolone in Established Dengue Shock Syndrome: A Placebo-Controlled, Double-Blind Study*. *Pediatrics*, Vol. 92, 5-11.
- ✚ Van Acker, S. A. B. E., Koymans, L. M. H., & Bast, A. (1993). *Molecular pharmacology of vitamin E: Structural aspects of antioxidant activity*. *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 15, 311–328.
- ✚ Whitehorn, J, et al. (2016) *Lovastatin for the treatment of adult patients with dengue: a randomized, double-blind placebo-controlled trial*. *Clinical Infection Disease*, Vol. 62, 468–476.
- ✚ Wu, S. F., Lee, C.-J., Liao, C. L., Dwek, R. A., Zitzmann, N., & Lin, Y. L. (2002). *Antiviral Effects of an Iminosugar Derivative on Flavivirus Infections*. *Journal of Virology*, Vol. 7, 3596–3604.
- ✚ Xu X, Vaughan K, Weiskopf D, Grifoni A, Diamond MS, Sette A, et al. (2016) *Identifying candidate targets of immune responses in Zika virus based on homology to epitopes in other flavivirus species*. *PLoS Currents*, Vol. 8
- ✚ Zhang F., Aslam M., Cheng H., Liang L., (2019) *Co-encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol and resveratrol within zein nanoparticles: Impact on antioxidant activity and stability*. *Journal of Food Engineering*, Vol. 247, 9–18.
- ✚ Zingg, J. M., & Azzi, A. (2004). *Non-antioxidant activities of vitamin E*. *Current Medicinal Chemistry*, Vol. 11, 1113-1133.