

“Evaluación de la actividad antiviral,
lipo/inmunomoduladora y biooxidativa del
CURMERIC contra la infección por DENV-2 *in vitro*”

Tesis para optar por el título de Master en Virología

Autor: Lic. Hector A. Granela Gutierrez

Tutoras: Dra. Beatriz de la C. Sierra Vázquez DrC.

Dra. Ana B. Pérez Díaz DrC.

Asesores:

Prof. Luis F. Morier Díaz

Prof. Lizette Gil del Valle

Prof. María G. Guzmán Tirado DrCs.

La Habana, Cuba

Marzo de 2024

A mis padres, por haberme ayudado
a forjar la persona que soy.

“Two seconds away from 2007 Britney”

Hector Granela, 2023

Agradecimientos

Quisiera agradecer a mis tutores por todo el cariño, la comprensión, la paciencia y el apoyo mostrado durante todo este proceso. Nunca faltaron sus palabras de aliento y representaron una fuente de inspiración inagotable, tanto en lo profesional como en lo personal.

A la profesora Lizzette Gil, Melisa, Anita y Claudia por toda la ayuda en el laboratorio. Igualmente agradecer a todas las personas del centro que de una manera u otra hicieron posible la realización de este trabajo.

A las profesoras del departamento que tuvieron la misión de formarnos. Gracias por siempre esforzarse para convertirnos en mejores profesionales.

Al equipo de trabajo del proyecto Curmeric por el profesionalismo y el espíritu científico. Compartir con ustedes esta tarea me ayudó a ser mejor profesional y a aprender a transitar los senderos de la ciencia.

A mis compañeros de trabajo. Agradecer especialmente a Aliana, Camila y Liri, sin ustedes este año para mí no hubiese sido lo mismo. Las risas, los días de estudio y el apoyo mutuo son solo algunas de las maravillosas experiencias que se quedarán conmigo siempre.

Por último, el más grande e importante de los agradecimientos va dedicado a mis padres, por su guía y tenaz esfuerzo para hacer de mí una mejor persona, apoyándome en todas mis decisiones. Este, y todos mis logros venideros serán siempre dedicados a ustedes.

Resumen

El dengue es considerado una de las diez mayores amenazas para la salud global y se ha convertido en la enfermedad viral transmitida por vectores de mayor propagación en todo el mundo. Recientemente, se desarrolló en nuestro país una formulación derivada de la planta *Curcuma longa* cosechada en algunas regiones de Cuba, conocida como Curmeric® y que ha demostrado efectos antioxidantes, antiinflamatorios, citotóxicos y regulador de los lípidos celulares. Estos efectos podrían influir en los mecanismos patogénicos clave de la enfermedad por dengue alterando la replicación viral y las respuestas inmuno-inflamatorias. Con el objetivo de estudiar el efecto del Curmeric y la infección por dengue, se realizó un ensayo de citotoxicidad celular en las líneas celulares Vero y THP-1 por la técnica de reducción del MTT. Se evaluó la actividad antiviral en las líneas celulares. Adicionalmente se evaluó la citotoxicidad y actividad antiviral de un estándar de curcumina. Para la determinación de las propiedades inmunomoduladoras y reguladoras del metabolismo lipídico se evaluó mediante qRT-PCR la expresión relativa de diversos genes en la línea celular THP-1 tratadas con Curmeric en el contexto de la infección por DENV-2. Para evaluar los efectos biooxidativos se cuantificó la formación de marcadores redox en el medio de cultivo de células THP-1 tratadas con varias concentraciones de Curmeric e infectadas con DENV-2. Como resultado de esta investigación se comprobó un efecto antiviral selectivo por parte del Curmeric sobre el DENV-2 en las líneas celulares estudiadas. Se observó también que este compuesto potenciaba la expresión del Receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR) y la Proteína de unión al Oxisterol tipo 10 (OSBP10) a su vez que disminuía la del Receptor de ácido retinoico alfa (RARA) lo que regula el metabolismo lipídico celular y puede contribuir, a su vez, a limitar la replicación del virus dengue por un efecto antiviral indirecto. También se evidenciaron los efectos inmunomoduladores al incrementar la expresión de la Proteína inflamatoria de macrófagos (MIP), Interleuquina-6 (IL-6) e Interleuquina 10 (IL-10) y disminuir la expresión del Gen inducible por ácido retinoico (RIG-1) lo que también podría potencia un efecto antiviral indirecto y un manejo más eficiente de

la enfermedad sintomática. Nuestros resultados aportan nuevas alternativas para el manejo de la enfermedad por dengue, empleando la medicina natural, de forma efectiva y sostenible.

Abstract

Dengue is considered one of the top ten global health threats and has become the fastest-spreading viral disease worldwide. Recently, a Cuban formulation derived from locally harvested *C. longa*, known as "Curmeric," was developed and has shown antioxidant, anti-inflammatory, cytotoxic, and lipid-regulating effects. These effects could also influence key mechanisms of dengue infection, such as the role of cholesterol and lipids in viral replication and disease progression, as well as the pathogenesis of the disease associated with systemic immune-inflammatory responses. In order to study the relationship between Curmeric and dengue infection, a cell cytotoxicity assay was performed on Vero and THP-1 cell lines using the MTT reduction technique. Subsequently, antiviral activity was evaluated in the tested cell lines. Additionally, the cytotoxicity and antiviral activity of a Curcumin standard were also evaluated. For the determination of immunomodulatory and lipid metabolism-regulating properties, the relative expression of various genes in THP-1 cell line treated with Curmeric in the context of DENV-2 infection was evaluated using qRT-PCR. As a result of this research, a moderate antiviral effect of Curmeric on DENV-2 was observed in the studied cell lines. Additionally, it was found that this compound enhanced the expression of PPAR and OSBP10 while reducing the expression of RARA, thereby regulating cellular lipid metabolism and potentially limiting dengue virus replication through an indirect antiviral effect. Furthermore, the immunomodulatory effects of Curmeric were evidenced by the increased expression of RIG-1, MIP, IL-6, and IL-10, which could also potentiate an indirect antiviral effect and more efficient management of symptomatic disease. These results give new insights for the managements of dengue disease, applying the natural medicine, in an effective and sustainable way.

Lista de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

EMCV: Virus de la encefalomiocarditis (por sus siglas del inglés Encephalomyocarditis virus).

HDL: Lipoproteínas de alta densidad (por sus siglas del inglés high density lipoprotein).

HLA: antígenos leucocitarios humanos (por sus siglas del inglés human leukocyte antigens).

IFN: Interferón.

IL: Interleuquina.

IRF: Factor regulador del interferón (por sus siglas del inglés interferon-regulatory factors).

LDL: Lipoproteína de baja densidad (por sus siglas del inglés del inglés low density lipoprotein).

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (por sus siglas del inglés major histocompatibility complex).

NK: Células naturales asesinas (por sus siglas del inglés *natural killer*).

OSBPL10: Proteína de unión al oxisterol tipo 10 (por sus siglas del inglés *oxysterol binding protein-like 10*).

PPAR: Receptor activado por proliferadores de peroxisomas (por sus siglas del inglés *peroxisomal proliferator activated receptor*).

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (del inglés *quantitative real time polymerase chain reaction*).

RANTES: Quimioquina de regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos T (por sus siglas del inglés regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted).

RARA: Receptor de ácido retinoico alfa (por sus siglas del inglés retinoic acid receptor alpha).

RIG-1: gen inducible-1 de ácido retinoico (por sus siglas del inglés retinoic acid-inducible gene-1).

TGF: Factor de crecimiento transformante (por sus siglas del inglés transforming growth factor).

TNF: Factor de necrosis tumoral (por sus siglas del inglés tumor necrosis factor).

UTR: Regiones no traducidas de un gen (por sus siglas del inglés *untranslated región*).

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

GSH: Glutación

SOD: Superóxido dismutasa

MDA: Malondialdehído

Contenido

1. Introducción	1
2. Revisión bibliográfica	5
Dengue, emergencia como un problema de salud global.	5
Virus Dengue, características generales y replicación viral	7
Papel de los lípidos en la replicación del virus dengue	9
Patogenia de la infección por dengue	10
Respuesta inmune	11
Cuadro clínico de la enfermedad	22
Tratamientos disponibles	24
Estudio de posibles antivirales	24
<i>Polifenoles y flavonoides</i>	26
Cúrcuma, curcuminoides	27
<i>Actividad biológica de los curcuminoides</i>	28
Curmeric	29
3. Materiales y métodos.....	31
3.1. Líneas Celulares y Virus	31
3.2. Medios para cultivo celular.....	31
3.3. Ensayo de citotoxicidad por reducción del compuesto MTT	31
3.4. Ensayo de actividad antiviral.....	32
3.5. Titulación viral mediante método de placa	33
3.6. Cuantificación del título viral mediante biología molecular	34
3.6.1. <i>Extracción de ARN viral</i>	34
3.6.2. <i>Cuantificación de la carga viral por qRT-PCR</i>	34
3.7. Ensayo de cuantificación de la expresión de citoquinas y mediadores lipídicos en THP-1.....	34
3.8 Extracción de ARNm.....	35
3.9. Determinación de los niveles de expresión de citoquinas.....	35

3.10 Determinación de la actividad antioxidante del IFA del CURMERIC sobre el estado de oxidación-reducción en las líneas celulares Thp-1 ante la infección por dengue.	38
3.11. Análisis estadístico.....	39
4. Resultados.....	39
Ensayos de citotoxicidad por reducción del compuesto MTT	39
Cuantificación de la producción de ARNm de mediadores del metabolismo lipídico	48
Cuantificación de la producción de ARNm de citoquinas.....	50
Determinación de la actividad antioxidante del IFA del CURMERIC sobre el estado de oxidación-reducción en las líneas celulares Thp-1 ante la infección por dengue.	53
5. Discusión	54
6. Conclusiones	71
Referencias Bibliográficas.....	12

1. Introducción

Las enfermedades causadas por flavivirus son consideradas actualmente patologías re-emergentes debido al creciente número de casos reportados. De ellas el dengue es la más importante en términos de morbilidad y mortalidad humana (1), particularmente en las regiones tropicales y subtropicales del planeta, como Sudeste y Sur de Asia, Centro y Suramérica, y el Caribe. Se estima que 2 500 millones de personas viven en áreas de riesgo (2). Esta es causada por uno de los cuatro serotipos del virus dengue (DENV), perteneciente a la familia *Flaviviridae* y transmitido al hombre fundamentalmente por el mosquito *Aedes aegypti* (3). La enfermedad por dengue puede cursar de modo asintomático o presentar diferentes cuadros clínicos que van desde una fiebre aguda indiferenciada, hasta las formas más severas (4, 5).

Hasta el momento, no existe un antiviral específico para tratar el dengue en humanos, a pesar de los esfuerzos realizados en ese sentido (6). El manejo de la enfermedad se basa en medidas de soporte como el uso de analgésicos, la reposición de líquidos y el reposo en cama. En los casos más graves de dengue, es crucial prestar especial atención a la administración de líquidos y al tratamiento de la hemorragia (7).

El costo del dengue para la sociedad es considerable, desde la pérdida de salarios y la disminución de la productividad hasta los costos relacionados con la prestación de cuidados y los gastos médicos directos. Se estima que el costo del dengue sólo en el hemisferio occidental es de 2.100 millones de dólares al año [13]. En vista de estos problemas, una vacuna o antiviral eficaz contra el dengue es muy deseable.

Se han utilizado diferentes enfoques en la búsqueda de antivirales contra el dengue, como la detección de compuestos contra las enzimas del dengue (8) y el descubrimiento computacional basado en estructuras (9). Durante las últimas décadas, los investigadores han centrado su atención en la naturaleza, intentando identificar compuestos que puedan utilizarse como antivirales contra el dengue. De hecho, la naturaleza es una fantástica reserva de sustancias con efectos

farmacológicos demostrados o que pueden servir como estructuras principales para la optimización y el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos (10-12). Estos medicamentos incluyen productos naturales, análogos semisintéticos derivados de productos naturales activos y compuestos enteramente sintéticos diseñados utilizando productos naturales como modelos. Desde los primeros días del descubrimiento de fármacos, los componentes químicos aislados de fuentes naturales se han explorado como fuente de nuevas terapias (13). Estadísticamente, alrededor del 50% de las nuevas entidades químicas se obtienen a partir de productos naturales o análogos de productos naturales (14).

Se ha demostrado que varias plantas poseen actividades anti-DENV. Según una hoja informativa de la OMS, el 80% de la población de ciertos países asiáticos y africanos depende de las medicinas tradicionales para la atención primaria de salud debido a limitaciones económicas y geográficas (15). Debido a sus pocos (o desconocidos) efectos adversos, el uso mundial de plantas medicinales o medicamentos a base de plantas está creciendo constantemente. Aunque varias plantas son conocidas por sus actividades anti-DENV, se han publicado pocas investigaciones sobre el aislamiento (identificación) y evaluación de compuestos de plantas con actividades anti-DENV (15).

La curcumina (1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona), también llamada diferuloilmetano, es el mejor ejemplo de un derivado vegetal con una enorme cantidad de propiedades farmacológicas, como actividad antioxidante, anticancerígena, antidiabética, antimicrobiana y antiviral (16). En la medicina ayurvédica tradicional india, la curcumina se aplicó ampliamente en muchos remedios terapéuticos (17). Este compuesto es una sustancia polifenólica natural y una forma activa de la hierba tradicional que se encuentra en el rizoma de *Curcuma longa* (cúrcuma) y en otras especies de *Curcuma*. La curcumina es la molécula mayoritaria de los curcuminoides presentes en el rizoma. La proporción de curcuminoides encontrados es de curcumina (77%), bisdemetoxicurcumina (BDMC) (17%) y demetoxicurcumina (DMC) (6%) (18).

La primera sugerencia de que la curcumina tenía propiedades antivirales se produjo en la década de 1990, con el descubrimiento de que la curcumina y los complejos de curcumina y boro podían inhibir la proteasa viral del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) *in vitro*, con una concentración inhibidora promedio (CI₅₀) de 100 μ M (19). Desde entonces, numerosos estudios han evidenciado que la curcumina tiene actividad antiviral contra un conjunto diverso de virus, incluidos virus de ARN y ADN, tanto con envoltura como sin envoltura (20).

Desde el año 2016, se ha llevado a cabo un proyecto de investigación asociado al Programa Nacional de Medicina Natural y Tradicional del Ministerio de Salud Pública de Cuba (MINSAP) con el fin de desarrollar un nutracéutico a partir de *Curcuma longa*. Recientemente, se ha creado un nutracéutico cubano llamado Curmeric® a partir de *C. longa* cosechada en la Provincia de Artemisa, con el respaldo de las autoridades sanitarias y el gobierno de La Habana, así como de los Departamentos de Servicios Farmacéuticos y Medicina Natural y Tradicional del MINSAP (21). Estudios clínicos y de laboratorio también han evidenciado que este extracto es seguro y presenta efectos antiinflamatorios y antivirales contra el coronavirus bovino, el cual pertenece al mismo subgénero que el SARS-CoV-2 (22). Estos efectos también podrían influir en los mecanismos claves de la infección por dengue, como el papel del colesterol y los lípidos en la replicación viral y la progresión de la enfermedad, así como en la patogénesis de la enfermedad asociada a las respuestas sistémicas inmune-inflamatorias.

Este trabajo de investigación tiene como finalidad evaluar la capacidad de este producto cubano, de origen natural y sin efectos colaterales perjudiciales, de reducir la replicación del virus dengue, modular la respuesta redox y potenciar una respuesta inmune antiinflamatoria, lo que pudiese reducir el riesgo de la enfermedad severa por dengue. De esta forma se le proporcionaría a nuestro sistema de salud y a nuestra población una nueva herramienta para tratar esta enfermedad. Además, se cumpliría con la voluntad del Gobierno de impulsar la medicina natural y tradicional (MNT), la cual desde el 2011 se incluyó como un Lineamiento de la Política Económica y Social del Partido.

Ojetivo general:

Evaluar el efecto antiviral,lipo/inmunomodulador y bioxidativo del Curmeric® contra la infecci3n por dengue virus 2 *in vitro*.

Objetivos espec3ficos:

- Determinar la actividad antiviral del Curmeric frente al DENV-2 en la l3nea celular no tumoral de mam3fero Vero y de monocitos humanos Thp-1.
- Explorar la actividad reguladora sobre los l3pidos celulares del Curmeric mediante la cuantificaci3n de la expresi3n de tres genes de metabolismo lip3dico, RARA, OSBPL10 y PPAR, en la l3nea celular THP-1 en el contexto de la infecci3n por dengue.
- Cuantificar la actividad inmunomoduladora del Curmeric mediante la expresi3n de siete genes de respuesta inmune, IL-6, IL-10, IL-12, B2M, RIG-1, TNF y MIP-1, en la l3nea celular Thp-1 durante la infecci3n por DENV-2.
- Determinar la actividad bioxidativa del Curmeric sobre el equilibrio redox celular mediante la cuantificaci3n de cuatro marcadores redox HPO, MDA, GSH y SOD en sobrenadantes de la l3nea celular THP-1 durante la infecci3n por DENV-2.

2. Revisión bibliográfica

Dengue, emergencia como un problema de salud global.

El dengue es una enfermedad viral, aguda, causada por cualquiera de los cuatro serotipos del virus dengue (DENV) perteneciente al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* y transmitida al hombre a través de la picadura de mosquito del género *Aedes* (23). El principal vector es *Aedes aegypti*, aunque *Aedes albopictus* posee importantes evidencias como vector en algunas áreas geográficas (24).

El dengue ha evolucionado de ser una enfermedad esporádica para convertirse en un problema de salud pública global con importantes efectos económicos y sociales, producto de su extensión geográfica, número de casos y la severidad de la enfermedad (25). El dengue es endémico en más de 100 países en el sudeste de Asia, las Américas, el Pacífico Occidental, África y el Mediterráneo Oriental y su incidencia se ha incrementado 30 veces en los últimos 50 años (26).

La OMS estima que 2 500 millones de personas están en riesgo de ser afectados por el dengue, con 50 millones de infecciones anuales. Aproximadamente 500 000 personas con dengue hemorrágico requieren de hospitalización al año, de las que el 2,5 % muere (26). De acuerdo a la OPS, en América Latina para el cierre del año 2019 se notificaron un total de 3 139 335 casos de dengue (incidencia de 321,58 casos por 100 000 habitantes) y 1 538 defunciones, con una tasa de letalidad del 0,049 % (27).

Su rápida emergencia global está relacionada con los cambios sociales y demográficos de los últimos 50-60 años, incluyendo la sobrepoblación sin precedentes, el incremento en los movimientos de las personas, la urbanización descontrolada y la ineficiencia de los programas de salud y control de los vectores (2).

En el caso de Cuba estudios serológicos realizados en la primera mitad de la década del 70 demostraron la baja prevalencia de anticuerpos para DENV-1 en el país hasta ese momento (28). En 1977 se desarrolla en Cuba una gran epidemia de dengue

(DENV-1), donde aproximadamente la mitad de la población, casi 4,5 millones de personas, habrían desarrollado la infección (29). En 1981, Cuba reporta la primera epidemia de dengue hemorrágico ocurrida fuera del Sudeste Asiático y Pacífico Oriental (30), causada por el DENV-2, la cual afectó a todas las provincias del país y se reportaron más de 344 203 enfermos. La transmisión se detuvo después de una intensa campaña de control del vector que duró 4 meses, y se logró su eliminación (31).

El país estuvo libre de transmisión desde 1982 a 1996. En 1997, el municipio Santiago de Cuba reportó una epidemia de dengue hemorrágico causada por el DENV-2 en la cual se reportaron 3 012 casos (32). En el período de 2001 a 2002 una nueva epidemia de dengue, causada por el DENV-3, afectó principalmente la Ciudad de La Habana, en la cual se reportaron 12 889 casos positivos (33). En 2006 se produjo otra epidemia por DENV 3 y 4 que afectó a 12 provincias, con circulación en 5 de ellas de ambos serotipos, la epidemia fue controlada a principios de 2007; las cifras de los infectados en esta epidemia no han sido publicadas (34).

En el período de 2007 a 2017, se han registrado pequeños brotes de dengue en diferentes provincias que han sido controlados con circulación de varios serotipos virales (35). En el año 2019 según los reportes del Ministerio de Salud Pública de Cuba el acumulado de casos fue de 42 029, de los cuales el 6,4 % fueron hemorrágicos (2 690) y la tasa de morbilidad acumulada fue de 0,15% (36).

A partir de mayo de 2022 se observó un incremento en la transmisión de dengue en el país precedido por elevados niveles de infestación de *Aedes aegypti* que conllevó a un incremento en los casos sospechosos y confirmados. Se observó, además, un incremento de los niños con casos graves y muy graves por encima de lo observado en años precedentes. Actualmente circulan los 4 serotipos en el país predominando el serotipo 3 cuyo último reporte antes de 2022 fue en 2015. Particularmente en La Habana, se han detectado los serotipos 1, 2 y 3 (37)

Virus Dengue, características generales y replicación viral

El virus dengue pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*. Existen cuatro serotipos del virus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4), para los que se ha descrito una homología de secuencia de un 70 % aproximadamente (38).

Este virus posee una envoltura lipídica de 10 nm de espesor rodeando una nucleocápside icosaédrica, la cual contiene una molécula de ácido ribonucleico (ARN) de simple cadena con orientación positiva de 10700 nucleótidos y peso molecular de 4,2 kD (39). El ARN viral está estructurado como un ARN mensajero (ARNm) y contiene un único marco de lectura abierto flanqueado en los extremos 5' y 3' por UTR (UTR del inglés Untranslated Regions), que tienen una longitud aproximada de 100 y 50 nucleótidos respectivamente. Estas UTR contienen elementos ARN conservados que son esenciales para la síntesis del ARN, control de la traducción viral y formación del virión (40).

El genoma está compuesto por los genes que codifican para tres proteínas estructurales: de la cápside (C, 100 aa), de la membrana (M, 75 aa), de la envoltura (E, 599 aa) y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). El orden de las proteínas en la región codificable es 5'-C-prM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3' (41, 42).

A diferencia de los ARNm celulares, el genoma de DENV carece de cola poliadenilada en su extremo 3'. Contiene un solo marco abierto de lectura (ORF del inglés Open Reading Frame) de unos 3400 codones (10 250 nucleótidos) flanqueado por regiones UTR 5' y 3', que codifica para un precursor polipeptídico, del cual se derivan 10 proteínas virales a través del procesamiento co y post-traducciona por proteasas celulares y virales (43). Estas regiones UTR influyen en la traducción del genoma viral y en la replicación, ya que a la región UTR 5' se une la ARN polimerasa-ARN dependiente/metiltransferasa viral (NS5). La síntesis de la poliproteína ocurre en el citoplasma y en el Retículo Endoplasmático (RE). El procesamiento proteolítico resulta en la formación de tres proteínas estructurales: proteína de la cápside (C) y las dos proteínas de superficie, membrana (M) y

envoltura (E), así como siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (44).

La entrada del virus a la célula ocurre mediante endocitosis y está mediada por la unión del virión a receptores específicos expresados en las células como los receptores de manosa, los receptores de adhesión intracelular 3 no asociada a integrina, específica de células dendríticas (DC-SING), CD14, heparán sulfato, proteínas de choque térmico HSP70/HSP90, proteína reguladora de la glucosa (GRP78), el receptor de laminina y las proteínas TIM y TAM (45). También hay evidencias que el virus puede entrar a las células humanas a través de la interacción con otras moléculas como los receptores de vitronectina, los receptores *scavenger* y los receptores de células NK (KIR) (46).

Independientemente del tipo de interacción virus-célula, ocurre la internalización de este formándose el endosoma, compartimiento donde ocurre la fusión de la envoltura del virus con las membranas de la célula, lo cual parece ser dependiente del pH. Las condiciones ácidas activan la fusión de la proteína E tras sufrir determinados cambios conformacionales, lo cual permite la penetración de la nucleocápside al citoplasma (47).

La replicación empieza con la síntesis de una cadena ARN de polaridad negativa que sirve como molde para la síntesis de nuevos ARN progenie de polaridad positiva. La síntesis del RNA viral es asimétrica, con una acumulación de RNA(+) diez veces mayor que la cantidad de ARN(-) sintetizada (27). En las células infectadas por DENV pueden apreciarse cambios estructurales en membranas perinucleares (48). La traducción es dependiente de caperuza, y la metilación de la caperuza 5' ayuda a evadir las defensas antivirales innatas que inhiben la traducción en células infectadas. La traducción del único ORF produce una poliproteína larga que es co y postraduccionalmente escindida en 10 proteínas. Los cortes son llevados a cabo por proteasas celulares y virales. Para el ensamblaje de las nuevas partículas el extremo N-terminal de la proteína C actúa como una secuencia señal (49). Los viriones parcialmente ensamblados son transportados al RE de la célula hospedera, donde las nucleocápsides son envueltas con la

membrana del RE que ya contiene las proteínas virales E (envoltura) y prM (pre-membrana), formándose viriones inmaduros de unos 60 nm de diámetro. Finalmente, estas partículas son transportadas a través de la ruta secretora celular, mientras las proteínas prM son escindidas por la proteasa celular furina y se obtiene proteína M, lo cual desata una redistribución de las moléculas de M y E para formar los viriones maduros (50). Tras el ensamblaje los viriones y su transportación a través de la ruta secretora, son liberados en la superficie celular. Pasos adicionales de maduración ocurren durante la salida del virus, como la modificación de prM y E por adiciones y deleciones terminales (43). La liberación del virus puede ocurrir por fusión de las membranas de la vesícula exocítica que contiene al virus con la membrana citoplasmática o por efecto citopático, a través de rupturas puntuales en la membrana celular (51).

Papel de los lípidos en la replicación del virus dengue

En la última década se ha producido un aumento en los estudios que investigan el papel de los lípidos en la replicación de los virus +ARN, en particular de los esteroides, y observaron que los sitios de contacto de la membrana y las proteínas de transferencia de lípidos son secuestrados por los virus y juegan un papel fundamental en la formación de compartimientos de replicación viral (52).

Diversos estudios describen que los lípidos circulantes son importantes para varios pasos en el ciclo replicativo de DENV (51, 53-55). La mayoría de las moléculas descritas como receptores para el DENV están presentes en los complejos ricos en colesterol (balsas lipídicas) o se reubican en estas estructuras después de la interacción del receptor y la partícula viral (56). Puerta y colaboradores (57) describen que, durante una infección secundaria por un mecanismo dependiente de anticuerpos, el receptor Fc debe ser traslocado a balsas lipídicas para la internalización de las partículas virales del DENV y la infección posterior, todo esto sugiere que DENV modula el metabolismo de los lípidos celulares para establecer un entorno óptimo para su replicación (58). También se ha demostrado que las lipoproteínas de alta densidad (HDL) favorecen la entrada del DENV a la célula, mediada por uno de sus principales componentes, la ApoA-I, que se asocia con las

partículas virales promoviendo la infección al facilitar la entrada del virus a la célula diana (59).

Patogenia de la infección por dengue

Los mecanismos implicados en la patogénesis de la enfermedad no están totalmente esclarecidos. En este sentido se han planteado varias hipótesis que tratan de explicar la aparición de la forma severa de la enfermedad (44, 60)

La hipótesis sobre el fenómeno amplificación dependiente de anticuerpo (ADA), propuesta por Halstead en 1970 (23), expresa la respuesta inmune humoral a una infección primaria por un determinado serotipo que origina anticuerpos neutralizantes, capaces de proteger al individuo contra el virus homólogo y, en menor medida, contra serotipos heterólogos. Durante una infección secundaria se formarían entonces inmunocomplejos (IC) cuyos anticuerpos serían menos eficientes en la neutralización de la partícula viral. Estos IC, formados por anticuerpos de las subclases IgG1 e IgG3, serían internalizados por las células del sistema fagocítico mononuclear (monocitos y macrófagos), al interactuar con los receptores Fc γ tipo I y II en ellas presentes. Se favorecería, de esta manera, la diseminación viral, ya que estos IC entran a las células hospederas más rápido que los viriones no acomplexados. En estas condiciones, como resultado de la lisis de las células mononucleares de la sangre periférica infectadas, pueden ser liberados al medio extracelular metabolitos intracelulares, como IL-8 e interferón gamma (IFN- γ) (44).

Una segunda hipótesis de la patogenia del dengue es la marcada activación de linfocitos T y la inducción de reactividad cruzada a células T CD4+ y células T CD8+ citotóxicas, que reconocen a los antígenos virales del virus del dengue en monocitos infectados. El resultado de este proceso puede traer consecuencias patológicas en los pacientes, debido a la liberación de citoquinas con propiedades vasoactivas y procoagulantes, la activación del complemento y la liberación de interferón gamma (39).

Otra hipótesis se refiere a un cambio fenotípico rápido, la selección de mutantes de escape a la neutralización. En algunas ocasiones, las partículas virales escapan de la neutralización efectuada por los anticuerpos, pues en el proceso de síntesis de sus proteínas estructurales no son expresados aquellos determinantes comunes al serotipo causal de la primoinfección. Cuando estas son transmitidas, de forma mayoritaria se multiplican en otros individuos con igual historia primaria y son capaces de desarrollar el cuadro más severo de la enfermedad. Los anticuerpos predominantes en dichos individuos son, por tanto, contribuyentes con el fenómeno ADA, porque, al no poder neutralizar la infección por medio de su porción Fc, se unen a diferentes tipos celulares donde encuentran los receptores correspondientes (28).

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) han adquirido importancia en el contexto de la patogénesis del dengue, ya que se han reportado cambios en el perfil lipídico durante el curso de la infección por DENV, los cuales dependen de la severidad de la enfermedad (51). Se ha observado que los niveles de HDL y lipoproteínas de baja densidad (LDL) se encuentran disminuidas en pacientes con dengue grave comparado con individuos sanos y en pacientes con dengue sin signos de alarma. A pesar de estos hallazgos, aún se desconoce el papel que juegan las HDL en la patogénesis de la infección por DENV, y es poco lo que se conoce sobre la interacción del virus con estas lipoproteínas (61).

Por último, la hipótesis más acertada es la integral planteada por Kourí y colaboradores en 1987, la cual plantea que la presencia o ausencia de factores individuales en el contexto de los factores epidemiológicos y virales hacen posible o no la evolución a un cuadro clínico de dengue grave (31).

Respuesta inmune

La respuesta inmune innata, al parecer, tiene un importante papel protector durante la infección con el virus del dengue (62). Uno de los componentes fundamentales de este tipo de respuesta son los interferones α , β y γ (63). Entre las fuentes principales de estos mediadores, se encuentran las células asesinas (NK, -del

inglés- natural killers) las cuales son un componente crítico del sistema inmune innato y proporcionan una defensa temprana contra las infecciones virales, al ser rápidamente reclutadas en órganos y tejidos por factores quimioatrayentes producidos por células infectadas con virus y por los macrófagos residentes activados (64). Los estudios clínicos y experimentales han sugerido un papel protector de las células NK durante las primeras etapas de la infección por DENV. En pacientes adultos, se observó que el dengue leve se correlacionaba con un mayor número de células NK activadas circulantes que presentaban perfiles de moléculas citotóxicas y de adhesión (65). Las NK activadas pueden inhibir la infección viral mediante la muerte de las células infectadas y la secreción de IFN y (66). Las células NK también parecen desempeñar un papel clave en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) contra las células infectadas por DENV durante las infecciones secundarias cuando los anticuerpos anti-DENV están presentes. Por otra parte los macrófagos son una fuente importante de IFN α / β que inducen a su vez la proliferación de células NK, la citólisis de células infectadas con virus mediada por NK y la secreción de quimiocinas (67).

La información respecto a la adquisición de inmunidad después de una infección por el virus es limitada. En humanos y monos infectados natural o experimentalmente con el virus se detecta una rápida y potente respuesta de anticuerpos. La presencia de anticuerpos neutralizantes por más de cuatro décadas después de un episodio infeccioso sugiere el desarrollo de inmunidad de por vida al serotipo específico (68).

Estudios muestran que, al parecer, la respuesta CCDA (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) también está involucrada en la protección frente a infecciones virales (69, 70) .

Se ha reportado que las células T tienen una función tanto patológica como protectora durante la infección por dengue, definiendo en gran medida la evolución de la infección. Las células dendríticas infectadas con dengue presentan el antígeno a las células T CD8 + y CD4 + en las zonas de células T de los linfonodos que drenan, donde comienza la respuesta inmune adaptativa. Las células T CD4 +

activadas proporcionarán ayuda a las células T CD8 + que luego pueden eliminar directamente las células infectadas por dengue mediante el reconocimiento de una variedad de proteínas del dengue, incluidas las proteínas NS3 y NS1.2a no estructurales (71). En casos asintomáticos, se ha observado un elevado número de células T CD4 + activadas en el control de la infección por dengue, demostrando su papel. Las células T CD8 + se dirigen principalmente contra proteínas mientras que las células T CD4 + están sesgadas hacia la envoltura, cápside y epítomos NS1(72). Se ha informado que en la respuesta inmune de memoria frente a la infección secundaria por DENV, la presencia de memoria heteróloga y reactividad cruzada de células T CD4 + específica para un serotipo de VDENV primario exacerbará la patología inmunitaria (73).

El papel de los linfocitos T ha demostrado ser importante en la respuesta inmune celular frente al virus dengue y definen en gran medida la evolución de la infección. Tras la infección natural o inmunizaciones con vacunas vivas atenuadas, el análisis de las células mononucleares de sangre periféricas reveló la activación de clones de linfocitos T CD4+ y CD8+, los que, en su mayoría fueron serotipo-específicos. En un estudio longitudinal en individuos vacunados contra fiebre amarilla, se han observado patrones de citoquinas oscilantes e independientes en células T CD4+, con bajo porcentaje de IL-12+, IL-4+ e IL-10+ en el día 7 y frecuencia aumentada de células TNF α en el día 15, junto con el aumento de células positivas a IFN γ e IL-5 en el día 15 y 30, en este último día, también se observaron cambios tardíos en las células T CD8+ IL-12+ e IL-5+ (74). En la inmunidad dependiente de estos clones, al igual que en la respuesta de anticuerpos, la infección secuencial conduce al desarrollo de respuestas de reactividad cruzada, capaces de reconocer otros serotipos del complejo dengue (75, 76).

Estudios realizados *ex vivo* mostraron que, en los días de la defervescencia, durante el curso de una infección aguda, la apoptosis podría ser un potencial inmunomodulador en la respuesta inmune adaptativa al virus (77). Otras evidencias sugieren que la apoptosis de las células T CD8+ durante la infección aguda por el virus del dengue podría estar asociada a bajos niveles intracelulares de la proteína

anti-apoptótica Bcl-2 (del inglés B cell lymphoma) (78). Sin embargo, otros estudios sustentan evidencias que involucran los mecanismos apoptóticos asociados al desarrollo de la patogenia de la enfermedad (79) . Se plantea que, para el caso del virus del dengue la producción intracelular de las proteínas virales es esencial en la producción de apoptosis. De esta manera, las proteínas M y NS3 han mostrado actividad pro-apoptótica (80).

Otros estudios ex vivo realizados durante una infección secundaria que mostraron la apoptosis de linfocitos T CD8+ específicos a péptidos de la NS3 sugirieron que esta podría estar involucrada en la explicación del fenómeno del pecado original antigénico. De esta forma, podría ocurrir apoptosis de las células T de alta afinidad y expansión de células T de reactividad cruzada de baja afinidad, lo cual disminuiría el aclaramiento viral, llevando a un incremento de la carga viral y a las formas más severas de la enfermedad (81).

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular (por lo general menos de 30 kDa) organizadas en familias estructuralmente diversas que actúan mediando interacciones complejas entre células principalmente del sistema inmunitario de origen linfóide, células inflamatorias y células hematopoyéticas. Las citoquinas “controlan” el sistema inmune y sus funciones son muy variadas: activación, proliferación, diferenciación y maduración de células, comunicación entre células del sistema inmunitario y en algunos casos, ejercen funciones efectoras directas como la apoptosis. Aunque su fuente primaria son los leucocitos, pueden ser producidas por otras muchas células. La mayoría de las respuestas celulares a estas moléculas son lentas, ocurriendo en período de horas y requieren síntesis *de novo* de ARNm y proteínas (82).

Las citoquinas se producen durante las fases efectoras de la inmunidad innata y específica y sirven para regular las respuestas inmunitarias. Su producción y secreción es un hecho breve y autolimitado y sus actividades funcionales son redundantes, pues distintas citoquinas pueden producir el mismo efecto. Algunas citoquinas inducen la síntesis de otras, lo que conlleva a la producción de cascadas

en la que la segunda o tercera citoquina puede mediar el pretendido efecto de la primera (83).

Las citoquinas pueden influir sobre el efecto de otras a través de un efecto antagonista o sinérgico y pueden clasificarse funcionalmente como (84, 85):

Citoquinas Pro-inflamatorias

IFN γ , también llamado IFN tipo II o inmunoregulador, es secretado por las células CD8, CD4, TH1, y NK, que la producen solo si están activadas en respuesta a antígenos o en respuesta a IL-2 y su producción se inhibe por la IL-10, TGF β , IL-4 y glucocorticoides. (86, 87). Casi todos los tipos de células poseen receptor para IFN γ y responden a su unión a esta citoquina aumentando su expresión de MHC I (88). Por esto las células en la vecindad de un linfocito activado que libera IFN γ se tornan eficaces presentadoras de antígenos endógenos y constituye un eficiente blanco para los linfocitos CD8+. El IFN γ también aumenta la expresión de MHC II en las células presentadoras de antígenos especializadas, potenciando también la presentación a los linfocitos CD4+. También induce la expresión de MHC II “*de novo*” en células endoteliales, epiteliales, y del tejido conjuntivo, reclutándolas como células presentadoras de antígenos a linfocitos CD4 en sitios de reacción inmunitaria intensa (88, 89). Es un potente activador de macrófagos. Aumenta su actividad microbicida considerablemente, y le induce a liberar IL-1, IL-6, IL-8, y TNF α . También activa neutrófilos, células NK y células endoteliales vasculares (90). Estas últimas en su presencia se diferencian a vénulas endoteliales altas y se vuelven más adhesivas para neutrófilos y linfocitos (91). Esta citoquina también promueve la diferenciación de células B y CD8+ a efectoras activas, pero no su proliferación. Potencia la actividad TH1, y disminuye la producción de IL-4 por TH2, inhibe los efectos de la IL-4 sobre la célula B, evitando el cambio a IgE e induciendo IgG1 (92).

TNF α : Es una citoquina pro-inflamatoria multifuncional, aislado en 1984, y nombrado por su acción citotóxica sobre las células tumorales de ratón induciendo regresión del tumor. Es producida por monocitos, macrófagos, células dendríticas,

linfocitos TH1 y otras. Esta citoquina interviene en la hematopoyesis y la morfogénesis, y está involucrada en enfermedades como la artritis reumatoide, la diabetes, el infarto del miocardio, el rechazo a injertos y el Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Estimula al hígado a producir proteínas de fase aguda, e induce el catabolismo de músculos y grasa para la obtención de energía, y actúa a nivel del hipotálamo causando fiebre y somnolencia (93). En cantidades excesivas activa las vías de la coagulación y causa inflamación, siendo la causa principal de complicaciones sistémicas como la cascada que conduce al choque hipovolémico (94, 95).

El TNF α es la principal citoquina que regula la inmunidad innata y media la inflamación aguda. Su acción sobre las células endoteliales resulta en la producción de selectinas y ligandos de las integrinas leucocitarias que median la diapédesis, y en la inducción de la producción de quimoquinas que intervienen en la quimiotaxis y reclutamiento de leucocitos. El TNF α activa neutrófilos y macrófagos, induce la producción de reactivos intermediarios del oxígeno y la secreción de IL-1 (96). Esta citoquina forma un lazo autoregulatorio con la IL-10, en el cual el TNF es un potente inductor de IL-10, y la IL-10 es una reguladora represora del TNF (97). Actúa sobre las células a través de varios receptores, promoviendo diferentes efectos. Su unión al TNFR1 promueve respuesta inmune sistémica e inflamación. Su unión al TNFR2, solo presente en tejido renal, induce daño tisular mediado por complemento. El TNFR3 es esencial para la inducción de interferones y de IL-10 (98).

Citoquinas Inmuno-regulatorias

TGF β : Es una molécula altamente conservada, que constituye una adaptación evolutiva para proteger al hospedero de los eventos inflamatorios destructivos (99). Fue descubierto inicialmente como un factor de crecimiento de fibroblastos que promovía la reparación de heridas. Tiene también una actividad anti-proliferativa considerable y actúa como un regulador negativo de la inmunidad y la hematopoyesis (100). El TGF β se produce por muchos tipos celulares que incluyen macrófagos activados y linfocitos T. Los humanos expresan cuando menos 3 variantes de esta citoquina, llamados TGF beta 1, 2 y 3. Son productos de genes

separados, pero todos ellos se enlazan por los mismos 5 tipos de receptores celulares superficiales de gran afinidad. Los receptores de tipo I son transmisores de señales intracelularmente, en tanto que la función de los receptores III, IV y V no es muy clara (101, 102). El TGF beta tiene efectos anti-linfoproliferativos en una amplia variedad de células que incluyen macrófagos, células endoteliales y linfocitos T y B. También suprime la producción de la mayor parte de las linfoquinas y monoquinas y reduce la expresión celular de las proteínas MHC II y de los receptores de IL-1. Bloquea también los efectos linfoproliferativos sobre linfocitos T y B, y activadores de células NK de la IL-2 y los de la IL-1 sobre los timocitos. Inhibe la generación de células T citotóxicas. Por tanto el TGF beta es singular en lo que se refiere a que puede actuar como un regulador de retroalimentación negativa que abate las reacciones mediadas inmunitariamente (99, 103).

Esta citoquina ha ganado gran interés en los últimos años (104). TGF β es producida por la subserie de células T reguladoras TR1, junto a la IL-10, y por las TH3. El TGF β más la IL-2 inducen la expresión de novo de FoxP3 en linfocitos vírgenes, los cuales ganan así funciones regulatorias, transformándose en TR1-like, productoras de IL-10. Sin embargo en unión a la IL-6 y ausencia de IL-2 induce la diferenciación a la TH17, las cuales tienen un papel importante en la autoinmunidad (105). El TGF tiene, por tanto, un papel dual en la inmunidad, que contribuye a la regulación de la tolerancia periférica (106). (107) (Ming y Cols. 2007).

IL-10: La IL-10 es una citoquina pleiotrópica que actúa en diferentes tipos de células. Inicialmente fue identificada como una citoquina pro-inflamatoria (108) pero estudios más recientes plantean que representa una de las más importantes citoquinas inmunorregulatorias que actúa en la fase de resolución. La familia de la IL-10, a la cual pertenecen la IL-10, la IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, la IL-26 y más recientemente la IL-28A, la IL-28B y la IL-29 comparten características similares como que: sus genes codificantes se encuentran agrupados, poseen similar estructura genómica, similar estructura proteica primaria y secundaria y usan complejos de receptores similares. A pesar de esta familia compartir características similares poseen funciones biológicas diferentes (109) .

Estudios en una amplia variedad de patógenos muestran que la resolución de una infección requiere de una respuesta coordinada, en la cual los mecanismos inflamatorios iniciales eliminan al patógeno, y luego ocurra un inmediato control por la IL-10 que evite los daños inmunopatológicos (110).

Entonces, el momento en que se liberan, las cantidades relativas y la duración de la liberación de las citoquinas pro y anti inflamatorias, son puntos críticos en el control justo de la infección sin daños colaterales(111). La IL-10 también es importante en el contexto de las células T reguladoras. Es producida por la subserie de Treg TR1, junto al TGF β , también por las “TR1-like”, las cuales se generan en periferia a partir de linfocitos vírgenes, tras la inducción de IL-2 y TGF β . Es particularmente importante en la respuesta a antígenos en las interfases con el medio ambiente, como el intestino, los pulmones y la piel (112).

Mediadores de citotoxicidad

Perforina y granzima: Son moléculas mediadoras de citotoxicidad producidas por células con capacidad citotóxica, tanto de la inmunidad innata, células NK, como de la inmunidad adaptativa, linfocitos T, mayormente CD8+ (113, 114) Las células NK poseen gránulos preformados durante su desarrollo y su respuesta efectora de liberación de los mismos es rápida, en respuesta al balance entre señales activadoras o inhibitorias. La perforina es crítica para la citotoxicidad mediada por gránulos presentes en las células NK y los linfocitos citotóxicos (115, 116).

La granzima B es el miembro más estudiado de las familias de las granzimas, y es un potente activador de la apoptosis de forma tanto dependiente como independiente de las caspasas (117). Es una aspasa, que escinde detrás de los residuos de ácido aspártico, aunque la hidrólisis es dependiente de la interacción con una secuencia optima de sustratos (118).

FasL: Es uno de los llamados “receptores de muerte”, otro de los mecanismos citotóxicos utilizados por los linfocitos Tc (119-121). Estos receptores son activados por miembros de la superfamilia del TNF conduciendo a una cascada de eventos intracelulares que conducen a la muerte celular, proceso regulado por un grupo de

proteínas citoplasmáticas miembros de la familia Bcl-2, que tienen funciones anti y proapoptóticas (122, 123). Se considera que la activación del programa de muerte celular en respuesta a las infecciones virales es un mecanismo de defensa temprano para prevenir la diseminación de la infección seguido de la acción de las células NK y los linfocitos Tc (124).

Quimoquinas:

Las quimoquinas forman una familia de pequeñas proteínas con actividad quimioatrayente, que se clasifican en 4 grupos dependiendo de la presencia de determinados aminoácidos entre las dos primeras cisternas conservadas de su extremo N Terminal. Se unen a los receptores para quimoquinas C-C, que pertenecen la superfamilia de receptores acoplados a proteína G. Su unión induce una cascada de eventos intracelulares que rápidamente llevan a un amplio rango de funciones celulares incluyendo quimiotaxis, desgranulación, fagocitosis y síntesis de mediadores pro-inflamatorios (125), a través de las cuales participan en una gran cantidad de eventos en el organismo tales como desarrollo de órganos linfocitarios, metástasis, cicatrización, angiogénesis, y en otros directamente relacionados con la respuesta inmune como diferenciación de las células T, reclutamiento de células, tráfico linfocitario e inflamación.

IL-6: La cual inicialmente identificada como un factor de diferenciación de las células B es una citoquina multifuncional que regula la respuesta inmune, la fase aguda de la respuesta, la hematopoyesis y la inflamación. La IL-6 es producida por varios tipos de células, influye sobre varios tipos de células y tiene múltiples actividades biológicas a través de su único sistema de receptores (126)

MCP-1: Es la proteína quimioatrayente de monocitos 1, es el prototipo de quimoquina C-C y exhibe la más potente actividad quimioatrayente para monocitos y linfocitos. Se expresa en una amplia variedad de células en respuesta a estímulos pro-inflamatorios, incluyendo TNF α , IL-1 α e IL-1 β , y a su vez induce a los monocitos y macrófagos a secretar TNF α , IL-1 α y β (127) Las células endoteliales son importantes fuentes de MCP-1, y pueden elevar significativamente los niveles

de esta quimioquina durante las infecciones. La MCP-1 actúa de forma autocrina induciendo apertura de las uniones inter-endoteliales (128). La proteína C reactiva induce la liberación de MCP-1 por las células endoteliales (129). MCP-1 es crítica en dirigir la extravasación de CMSP hacia sitios de inflamación, infección y traumas (130). Existen reportes que refieren sobreexpresión de MCP-1 en monocitos y macrófagos en respuesta a la infección por dengue (131, 132), así como en células endoteliales (129, 133).

MIP-1 α : Es una quimioquina crucial en la quimotaxis de células T a los tejidos inflamados, y en la regulación del tránsito trans-endotelial de monocitos, células dendríticas y células NK (134-136). Tiene un papel también importante en la patogenia de muchas enfermedades con condiciones inflamatorias como las enterocolitis y la colitis ulcerativa, la artritis, la psoriasis, la formación de granulomas, la esclerosis múltiple, la sarcoidosis pulmonar y el asma (137-140). En este sentido es quimotrayente de forma particular para los basófilos en la respuesta a alérgenos, induciendo la liberación de histamina y el desarrollo de eosinofilia y puede ser producida por líneas celulares de basófilos y eosinófilos, actuando sobre ellos de forma autocrina (141).

IP-10: Proteína de 10 kDa inducida por IFN- γ y TNF- α en monocitos, neutrófilos, células endoteliales, queratinocitos, linfocitos y fibroblastos (142). El IFN- γ no es capaz de inducir la producción de IP-10 en los neutrófilos por sí mismo o asociado a agonistas como FMLP, IL-8, G-CSF y GM-CSF. Sin embargo, en combinación con TNF- α , lipopolisacáridos bacterianos (LPS) o IL-1-beta resulta en una considerable expresión y liberación. La respuesta de inducción de IP-10 es bloqueada por las citoquinas IL-10 e IL-4 (143). Se ha sugerido que la IP-10 puede jugar un importante papel en las reacciones de hipersensibilidad retardada. Entre otras de las funciones descritas para la IP-10 se propone que la misma interviene en la regulación del crecimiento de células hematopoyéticas progenitoras inmaduras de la inmunidad antitumoral, actuando en algunos casos como potente inhibidor endógeno de la angiogénesis (144).

RANTES: Es una quimioquina inductora de activación de leucocitos y células NK, quimiotaxis, adhesión y migración transendotelial (145). Su secreción temprana forma un gradiente local y recluta varios subgrupos de leucocitos circulantes al sitio de infección, además de actuar sobre las células del endotelio, facilitando la expresión de moléculas de adhesión y por ende la diapédesis (146). RANTES se une a varios receptores, CCR1, CCR3 y CCR5 entre ellos. Se ha demostrado que esta quimioquina atrae monocitos y linfocitos T vía CCR1, y eosinófilos y basófilos vía CCR3, y actúa sobre los linfocitos T también a través de CCR5, a través del cual recluta preferencialmente linfocitos con fenotipo de memoria, resultando entonces de importancia en las respuestas inmunes secundarias (147). La producción de esta quimioquina se ha observado en células basófilos y mastocitos infectados por dengue y hepatocitos humanos (139, 141). Avirutnan y colaboradores han reportado inducción de regulación transcripcional CCL5/RANTES en células endoteliales infectadas por dengue (148). Esta quimioquina también ha sido estudiada en pacientes con enfermedad aguda por dengue, donde este mediador mostró diferencias entre pacientes de FHD y FD, siendo menores en los casos de FHD (149).

IL-8: La IL-8 es una pequeña molécula con funciones quimiotácticas que contiene cuatro cisteínas características, con una organización CXC. Se secreta por una variedad de células, y tiene numerosos roles incluyendo el reclutamiento de eosinófilos, neutrófilos y células T a la superficie del endotelio, y la inducción de expresión de moléculas de adhesión, lo cual conduce a la unión y extravasación de estas células y al aumento de la permeabilidad celular. En las células endoteliales la IL-8 puede actuar de forma autocrina e inducir reorganización del esqueleto celular, apertura de las uniones inter-endoteliales, y aumento de la permeabilidad, así como expresión de moléculas de adhesión por su posible correlación directa con la extravasación de plasma (133, 137, 148, 150-152). Acorde a esto niveles elevados de esta quimioquina se han asociado a las formas clínicas más severas de la enfermedad por dengue, considerándose incluso por algunos como un marcador de severidad y mal pronóstico (153). Un grupo numeroso de trabajos se refieren a la producción de IL-8 por diferentes tipos de células tras la infección por dengue,

como monocitos y macrófagos (154), hepatocitos (78), células epiteliales (151), neutrofilos, sobre los cuales ejerce una particular quimioatracción, además de inducir su degranulación y la liberación de elastasa (155).

Cuadro clínico de la enfermedad

Cada uno de los cuatro serotipos del DENV puede causar un espectro de enfermedad que puede ir desde una forma clínica inaparente hasta una enfermedad potencialmente mortal. A mediados de los años 70 del siglo pasado la OMS propuso una clasificación de la gravedad de dengue con el fin de ayudar al diagnóstico, al abordaje de los pacientes y al monitoreo de la enfermedad. Se definieron entonces los conceptos: fiebre del dengue o dengue clásico (FD), dengue hemorrágico y síndrome de choque por dengue (156).

Esta enfermedad se clasifica actualmente con niveles de gravedad: dengue con o sin presencia de señales de alarma y dengue grave, sobre la base de datos clínicos y de laboratorio, lo que permite la identificación de los signos de alarma como indicadores precoces de choque para la administración rápida y enérgica de fluidos parenterales (157).

El grupo de dengue sin signos de alarma está representado por individuos que muestran fiebre y dos o más de las siguientes manifestaciones: náuseas, vómito, exantema, cefalea y dolor retro-ocular, mialgias y artralgias, erupción leve maculopapular, petequias y leucopenia (158) . Los pacientes de dengue con signos de alarma se caracterizan por presentar, además de los anteriores, dolor abdominal intenso y continuo, vómitos persistentes, acúmulo de líquidos en cavidades serosas, sangrado de mucosas, letargia, irritabilidad, depresión, hepatomegalia y aumento del hematocrito asociado a rápida disminución del recuento de plaquetas. En relación con el dengue grave, se presentan tres características fundamentales que demarcan esta fase de la enfermedad: la extravasación de plasma, hemorragia grave y compromiso grave de órganos como el hígado. Los pacientes que evolucionan a un desenlace fatal desarrollan un estado de shock hipovolémico, con

insuficiencia respiratoria, sangrado intenso y un compromiso orgánico importante, afectación del sistema nervioso central, del miocardio y otros órganos (2).

Oxidantes como moléculas de actividad virucida y citotóxica generadas en la respuesta inmunitaria innata.

En los últimos años, varios estudios se han centrado en el papel de los agentes moduladores del redox en el tratamiento de infecciones virales. El objetivo de esta área de investigación es identificar nuevas moléculas capaces de dirigirse a las vías hospedadoras que los virus explotan para su replicación y/o mejorar la respuesta inmune a las infecciones virales (159). De hecho, los virus utilizan varias estrategias para manipular la maquinaria celular hospedadora en su beneficio, incluida la modulación del estado redox intracelular. Un desequilibrio del estado redox hacia condiciones oxidantes es un evento clave durante las infecciones virales. Por ejemplo, nuestro grupo demostró que los virus de la influenza inducen estrés oxidativo mediado por una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y una disminución del glutatión reducido (GSH), el principal antioxidante intracelular, y que tales condiciones favorecen la replicación viral (160). La producción de ROS está mediada por la actividad de la familia de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasas (NOX), que consta de siete miembros: NOX1 a NOX5 y las dos oxidasas duales, Duox1 y Duox2, expresadas en la mayoría de los tipos celulares. Aunque NOX2 desempeña un papel crucial en la eliminación de bacterias y hongos, no actúa de la misma manera contra los virus (161). Por ejemplo, NOX2 es producido por las células inflamatorias en respuesta a infecciones virales y potencia la patología causada por virus de baja y alta patogenicidad, incluyendo los virus de la influenza A. De hecho, se ha demostrado que en ausencia de NOX2, el virus de la influenza causa menos inflamación de lesiones pulmonares, lo que sugiere un papel crítico de esta enzima en el control de la infección. NOX2 se expresa en endosomas tras diferentes tipos de infección y su expresión depende del Receptor Toll-like-7 (TLR-7), que se liga al ARN de doble cadena (dsRNA), un intermediario transitorio formado durante la replicación de muchos virus de ARN, y TLR-9, que reconoce los motivos CpG no metilados dentro

del genoma viral de los virus de ADN (162). Además, la actividad de NOX2 suprime la señalización antiviral mediante la modificación de un residuo de cisteína conservado (Cys98) de TLR-7. En células no fagocíticas, NOX2 genera ROS responsables de la activación del NF- κ B durante las infecciones por el virus sincitial respiratorio (VSR) y el virus parainfluenza (Sendai) (163). Otro miembro de la familia NOX, NOX4, se ha descrito como implicado en el control de la replicación del virus de la influenza. De hecho, esta isoforma se regula al alza tras la infección viral en células epiteliales pulmonares y es responsable de la generación de ROS (160). Los ROS derivados de NOX4 activan las cinasas de proteínas Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK) p38 y ERK1-2 que, a su vez, promueven la exportación nuclear de ribonucleoproteínas virales favoreciendo la replicación viral (164).

Tratamientos disponibles

No existe, hasta la fecha, un tratamiento antiviral específico para humanos, a pesar de que se han realizado grandes esfuerzos en este sentido. El control de los síntomas de la enfermedad se limita a la atención de apoyo (7, 165) con analgésicos, reposición de líquidos y reposo en cama. Se debe prestar especial atención a los casos graves de dengue en cuanto a la administración de líquidos y el tratamiento de la hemorragia (166).

Otra estrategia importante es la implementación de métodos preventivos contra el dengue. La vigilancia y detección temprana de casos de dengue son acciones de primera línea de defensa contra una posible epidemia. La búsqueda de antivirales que interfieran con diferentes pasos del ciclo replicativo del virus o con los mecanismos de generación del evento inflamatorio es otra estrategia aplicada por los investigadores.

Estudio de posibles antivirales

Debido a la falta de eficacia y seguridad de la vacuna Dengvaxia y la ausencia de antivirales, el desarrollo de nuevos antivirales contra el DENV está altamente justificado. Se han investigado varios agentes antivirales por sus actividades anti-DENV y cada antiviral empleó un modo diferente de inhibición del DENV. Estos

antivirales podrían funcionar inhibiendo los receptores o factores de unión de la célula hospedera o inactivando directamente el virus al atacar las proteínas virales estructurales o no estructurales (167). Además, los antivirales también podrían apuntar a diferentes etapas durante la postinfección, como la replicación viral al reducir la producción de copias de ARN, la traducción viral al reducir la expresión de las proteínas virales del DENV o el ensamblaje, maduración y liberación viral (168). Una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares de inhibición del ciclo replicativo del DENV por parte de diversos compuestos es vital para explotar su potencial como candidatos antivirales. Se podrían evaluar combinaciones de antivirales con diferentes mecanismos de acción para desarrollar combinaciones de fármacos sinérgicas para el tratamiento del dengue en cualquier etapa de la infección (169). En la actualidad el aprovechamiento de productos naturales como potenciales fuentes antivirales ha conllevado a la investigación de sus propiedades contra los diferentes serotipos del virus del dengue, utilizándose no solo extractos totales sino también productos derivados como flavonoides, alcaloides, polisacáridos, fenoles, entre otros.

Antivirales naturales contra DENV

Durante las últimas décadas los investigadores han vuelto su atención a los compuestos naturales, tratando de identificar compuestos con posible actividad antiviral contra el dengue. La naturaleza es un vasto reservorio de sustancias que pueden ser empleadas por sus efectos farmacológicos o pueden servir como guía para ser optimizadas y lograr el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos con estructuras moleculares novedosas. Se conoce que numerosas plantas, distribuidas en todo el mundo, pueden presentar potencial actividad antiviral contra dengue (170). Es importante señalar que, según la OMS, el 80% de la población en muchos países de África y Asia dependen de la medicina tradicional como su sistema de salud primario debido a limitantes económicas y geográficas (171).

Dado que el desarrollo de antivirales a partir de moléculas sintéticas requiere una gran cantidad de tiempo y esfuerzo para diseñar y validar desde cero; el descubrimiento de compuestos antivirales a partir de productos naturales ofrece una

alternativa más económica y sencilla, ya que son fácilmente accesibles de la naturaleza y también utilizando resultados de la etnomedicina (172). Aunque un número de plantas se conocen por su actividad anti-dengue, aún son pocas las investigaciones que se han publicado con relación al aislamiento e identificación de compuestos de plantas y su evaluación en busca de actividad antiviral frente a dengue (173).

Polifenoles y flavonoides

A lo largo de los años, los polifenoles, que son compuestos naturales que se encuentran en frutas, verduras, vino y té, han ganado cada vez más interés científico, ya que se ha informado que exhiben una amplia gama de actividades farmacológicas como antiviral, antibacteriano, antioxidante, efectos antiinflamatorios y anticancerígenos (174-176). Son metabolitos secundarios de las plantas que participan en la protección de la planta de la radiación ultravioleta (UV), la infección microbiana y la defensa contra los insectos (176). En los alimentos, los polifenoles pueden contribuir al color, el sabor, el olor, el amargor, la astringencia y la estabilidad oxidativa. Además, se espera que tengan efectos secundarios mínimos, ya que forman parte integral de la dieta humana (177).

Los flavonoides son una clase importante de polifenoles con más de 4000 variedades identificadas en varias especies de plantas y se pueden dividir en seis subclases: flavonoles, flavonas, flavanonas, antocianinas e isoflavonas. Independientemente del tipo de flavonoide, siempre se caracterizan por un anillo de cromano que lleva un anillo de 2 o 3 fenilo que los clasifica como flavonoide o isoflavonoide, respectivamente (178). La complejidad de las estructuras químicas que ofrecen los flavonoides puede presentar posibles actividades antivirales de amplio espectro que pueden dirigirse a varias enzimas para interrumpir el ciclo de replicación viral (179). Además, no todos los flavonoides se absorben con la misma eficiencia ya que su variación estructural influye en la tasa de absorción, el metabolismo y la biodisponibilidad en el cuerpo (180). Por lo tanto, los efectos antivirales de los flavonoides dependen de su biodisponibilidad: la proporción del

ingrediente activo que se digiere, absorbe y metaboliza a través de las vías normales y queda disponible en el sitio de acción (181).

Se han informado numerosos flavonoides, entre ellos los curcuminoides, por sus actividades antivirales contra los virus de ARN envueltos, incluidos los flavivirus y los alfavirus. De ahí que se hayan estudiado en búsqueda de actividad antiviral frente a DENV-2 (182, 183)

Cúrcuma, curcuminoides

La *Curcuma longa* es una planta herbácea de la familia *Zingiberaceae* originaria del sudeste asiático conocida comúnmente por sus propiedades medicinales en la medicina tradicional india(184). Son muchas las propiedades atribuidas a los extractos de *C. longa* y a su principal componente la curcumina. Esta planta es utilizada como aromatizante de alimentos, posee propiedades cosméticas, también ha sido utilizada en la protección y tratamiento de afecciones cutáneas, hepáticas, digestivas y contra parásitos intestinales, como remedio de venenos y de picaduras de serpientes (185). El rizoma de *C. longa* ha sido objeto de muchas investigaciones, se ha intentado encontrar sus principios activos con el fin de optimizar su actividad y de explicar su mecanismo de acción; se han preparado numerosos extractos, etanólicos, metanólicos y con distintos solventes para analizar sus actividades biológicas (16).

La curcumina (diferuloilmetano) es el flavonoide causante del color amarillo característico de los rizomas de esta planta, y es uno de los ingredientes activos responsable de su actividad biológica. La síntesis de este compuesto es conocida y su estructura fue determinada en 1910 (186). Los reportes afirman que desde 1974 se conoce la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto alcohólico de *C. longa*, de la curcumina y de sus aceites esenciales contra las bacterias Gram positivas. Asimismo, en 1987, se comprobó que la curcumina era bastante tóxica para *Salmonella typhimurium*, aunque no para *Escherichia coli*, y que tenía capacidad para alterar el ADN en presencia de luz visible. En 1978 se demostró la actividad antifúngica de la curcumina, así como del uso tópico del aceite de *C. longa*, en un

experimento realizado en cobayas y en condiciones *in vitro* sobre varios aislados patológicos (187).

Actividad biológica de los curcuminoides

Algunos de los efectos biológicos de los curcuminoides que pudiesen influir en el mejor manejo por el organismo de una infección viral incluyen:

- **Acción Antiviral:** Se observó que la curcumina ~~presente en la cúrcuma~~ puede tener actividad contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), pues en condiciones *in vitro* moduló la activación de la expresión del gen HIV-LTR, al inhibir principalmente la activación del factor nuclear NF- κ B(6,8). Investigadores han manifestado que la cúrcuma posee un resultado antiinflamatorio y reduce los grados de interleucina-6, que promueve la diferenciación y maduración de los linfocitos T y B, estimula la producción de inmunoglobulinas por parte de las células B, inhibe la secreción de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-1 (187).

Hasta la fecha se conocen reportes en los cuales extractos de la familia de las *Zingiberaceas* han presentado efecto sobre la actividad proteasa del DENV-2 (188), así como la inhibición del proteosoma de células de cáncer de colon por acción de la curcumina (186). Además, ha sido reportado que la curcumina afecta la replicación de diferentes virus como Cocksackie, VIH, Herpes y Epstein-Barr (189). En estudios recientes se ha encontrado que la curcumina provoca varios efectos inhibitorios en células infectadas *in vitro* con DENV-2 (188, 190, 191).

- **Antiinflamatorio:** Análisis previos declaran que la curcumina tiene consecuencias antiinflamatorias y que se logran usar para enfermedades como artritis, inflamación ocasionada por contusiones y luxaciones, etc. Estas consecuencias se deben especialmente por inhibir de la fosfolipasa 2, la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa enzimas que originan el descenso de la respuesta inflamatoria y no perjudica el aparato digestivo puesto que también tiene función defensora en dicho órgano y sin ocasionar consecuencias al Sistema Nervioso Central (186). Se reportan datos en humanos que indican el posible beneficio de la curcumina como antiinflamatorio al graduar la señal de las citoquinas, una clase de moléculas proinflamatorias (192).

- Hipocolesterolémico: Produce una disminución importante en los triglicéridos plasmáticos y algo menos drástica del colesterol total (193).
- Inmunomodulador: Se demostró que los curcuminoides y polisacáridos presentes en *Curcuma longa*, producen efectos estimulantes sobre la proliferación de células mononucleares de sangre periférica y la producción de citoquinas. Tales efectos inmunoestimulantes pueden ser de gran importancia para utilizar esta planta como suplemento adyuvante en pacientes con cáncer, especialmente cuando la función inmune está deprimida como en caso de la quimioterapia (194).

Aunque la curcumina es segura y eficaz, no es un agente terapéutico aprobado debido a su baja biodisponibilidad, baja solubilidad acuosa y complicaciones con la administración compuesto, que son desafíos que aún deben superarse (195). Las modificaciones en la estructura química y el aumento de la biodisponibilidad utilizando vehículos de entrega como nanopartículas y emulsiones son algunas de las muchas estrategias que se pueden emplear para mejorar la biodisponibilidad de la curcumina (196).

Curmeric

En Cuba, la *Curcuma longa* se encuentra originalmente en las regiones montañosas de Pinar del Río y Santiago de Cuba, pero no existen reportes sobre el uso tradicional de esta planta (197). Actualmente el desarrollo de nutraceuticos con altas propiedades terapéuticas o preventivas es un tema importante en Cuba (198). Por definición, un nutraceutico es un suplemento dietético, presentado en una matriz no alimentaria (píldoras, cápsulas, polvo, etc.), de una sustancia bioactiva natural concentrada, habitualmente presente en los alimentos. Tomado en una dosis superior a la existente en los alimentos, se presume que tiene un efecto favorable sobre la salud (199).

Desde 2016, el desarrollo de un nutraceutico a partir de *C. longa* es un proyecto de investigación asociado al Programa Nacional de Medicina Natural y Tradicional del Ministerio de Salud Pública de Cuba. Recientemente se elaboró un nutraceutico cubano a partir de *C. longa* cosechada en la Provincia de Artemisa con el apoyo de

las autoridades sanitarias y del gobierno de La Habana y los Departamentos de Servicios Farmacéuticos y Medicina Natural y Tradicional del MINSAP. Según parámetros microbiológicos y fisicoquímicos, este nutraceutico (denominado Curmeric®) cumple con los requisitos de buenas prácticas de calidad farmacéutica en todos sus pasos y tiene un alto contenido en polifenoles y curcumina (21), lo que justifica su alta capacidad antioxidante in vitro, medida por la capacidad para secuestrar el radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH). La actividad antiinflamatoria del Curmeric también se demostró en el modelo de granuloma inducido por disco de algodón, lo que sugiere su propiedad para reducir la inflamación sistémica y la infiltración celular, y se demostraron efectos reductores de lípidos en ensayos con ratones knockout para APOE (192). Posteriormente, estudios clínicos y de laboratorio demostraron que el extracto era seguro y presentaba efectos antiinflamatorios y antivirales contra el coronavirus bovino, miembro del mismo subgénero que el SARS-COV-2 (192).

En 2021, el Comité de Innovación del Ministerio de Salud Pública autorizó el Curmeric para su uso en estudios de intervención controlados, según la Normativa Uniforme Cubana del Registro Público de Ensayos Clínicos de Cuba. La seguridad y efecto del nutraceutico contra el SARS-CoV-2 en humanos quedó demostrada durante una intervención sanitaria realizada en 2021 en las provincias de Ciego de Ávila y Granma, cuando ambos territorios cubanos reportaron picos de la variante delta del SARS- CoV-2. Este estudio demostró el efecto de Curmeric en COVID-19, ya que su uso temprano acortó el tiempo de resolución de los síntomas asociados al virus (22). En 2022 Cuba incorporó el producto Curmeric a la lista básica de productos naturales, y se administró a más de 100 000 pacientes con contactos sospechosos, positivos y convalecientes del virus respiratorio. Se observó que la población de las regiones donde se administró Curmeric reportaron una menor incidencia de casos graves de dengue (T. Valdes, comunicación personal, abril 2023)

3. Materiales y métodos

3.1. Líneas Celulares y Virus

Vero (CCL81): Línea celular de morfología epitelial y crecimiento adherente derivada de riñón normal de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) adulto.

Thp-1 (TIB-202): Línea celular de morfología monocítica y crecimiento en suspensión aislada de sangre periférica de un paciente humano (*Homo sapiens*) de 1 año de edad con leucemia monocítica aguda.

Virus Dengue 2 cepa A15 con 4 pases en cerebro de ratón lactante y 6 pases en C6/36HT.

3.2. Medios para cultivo celular

La línea celular Vero, fue cultivada con Medio Mínimo Esencial Eagle (MEM) completo. La línea celular Thp-1 será cultivada en medio RPMI-1640 completo suplementado con 0.5mM de 2-Mercaptoetanol.

Medio de crecimiento: Medio completo suplementado al 10% de STF inactivado.

Medio de mantenimiento: Medio completo suplementado al 2% de STF inactivado.

Medio Overlay: Consiste en 3% de carboximetilcelulosa en solución acuosa más medio MEM 2X suplementado al 10% de suero de ternera fetal (STF) inactivado por calor y 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 25µg/mL de anfotericina B.

3.3. Ensayo de citotoxicidad por reducción del compuesto MTT

Un volumen de 100 µL de una suspensión de la línea celular Vero a una concentración de 200 000 células/mL en medio de crecimiento fue sembrada en una placa de 96 pocillos e incubada en atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂ durante 24h. Transcurrido este tiempo se retiró el medio y se añadieron 100 µL de medio con diluciones seriadas del ingrediente farmacéutico activo (IFA) del Curmeric (36µg/mL, 18µg/mL, 7µg/mL, 3,5µg/mL, 1,75µg/mL, 0,35µg/mL). Como control se

utilizó medio con Dimetildulfoxido (DMSO) al 1%. Se incubó durante 72h en atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂. Para las células THP1 se utilizó un procedimiento similar, pero al tratarse de células en suspensión no se incubaron durante 24h posterior a ser sembradas, en cambio se sembraron a una concentración de 500 000 células/mL y se procedió con la técnica experimental previamente descrita.

Transcurrido el tiempo de incubación, el sobrenadante de ambas líneas celulares fue descartado y se añadieron 10 µL por pocillo de una solución de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolbromide (MTT) a una concentración final de 0.5 mg/mL y se incubó durante 4 horas para permitir la formación de las sales de formazán. El precipitado fue disuelto en 100 µL de DMSO y se determinó la DO a 570nm en espectrofotómetro lector de placas multipozos (QIAxpert, QIAGEN).

El ensayo previamente descrito se replicó en la línea celular Vero con un estándar de Curcumina. La Curcumina constituye el componente mayoritario del Curmeric, por lo que el investigador consideró que la comparación de los resultados sería útil para los efectos de la investigación.

Posteriormente se determinaron los valores de supervivencia celular expresados como: (DO de las células con el extracto/ DO de las células del grupo control) *100. Se construyó curvas dosis-viabilidad para obtener los valores de la concentración citotóxica media (CC₅₀).

3.4. Ensayo de actividad antiviral

El propósito de estos ensayos fue determinar la existencia de actividad antiviral tanto de Curmeric como del estándar de Curcumina en las líneas celulares Vero y THP-1. Para ello, un volumen de 1 mL de una suspensión de la línea celular Vero a una concentración de 200 000 células/mL fue sembrado en placas de 24 pocillos y se incubaron en ambiente húmedo a 37° C y 5% de CO₂ durante 24 h. Posteriormente se retiró el medio de crecimiento y se añadieron a las células 100 µL de medio de mantenimiento con diferentes concentraciones de Curmeric (3,5 µg/mL, 1,75 µg/mL, 0,35 µg/mL) y estándar de Curcumina (3,5 µg/mL, 1,75 µg/mL.

0,35 µg/mL). Se utilizaron controles de células sin infectar, células sin tratar y células tratadas con medio con DMSO al 1%. Se realizaron 3 réplicas por concentración y las células fueron incubadas durante 2 h. Transcurrido este tiempo se realizó una inoculación con DENV a una multiplicidad de infección (MOI) igual a 1. Posteriormente las células se incubaron en ambiente húmedo a 37° C y 5% de CO₂ durante 72 h. Transcurrido este tiempo se procedió a la recogida de los sobrenadantes que fueron conservados a -80° C para su posterior titulación viral.

Adicionalmente se determinó la actividad antiviral del Curmeric en la línea celular THP1. Para ello se utilizó una técnica experimental muy similar a la anteriormente descrita, con ligeras variaciones atendiendo a que la línea THP1 es una línea celular no adherente, la otra diferencia es que se utilizó una MOI=2.

3.5. Titulación viral mediante método de placa

La titulación se efectuó mediante inoculación en la línea celular Vero según el protocolo descrito por Morens y colaboradores (200) con ciertas modificaciones. Se preparó una suspensión celular con una concentración de 200 000 células/mL y se sembraron 500 µL de esta por pocillo, en placas de 24 pocillos. Después de una h de incubación a temperatura ambiente, se inocularon 50 µL (por triplicado) de diluciones seriadas (puro, sin diluir, y diluciones hasta 10⁻²) de los sobrenadantes obtenidos de las células del ensayo de actividad antiviral y se incubaron durante cuatro horas en ambiente húmedo a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo se añadió 500 µL/pocillo de medio overlay. Las placas fueron incubadas en las mismas condiciones durante siete días. La coloración de las células se realizó con una solución de naftol blue-black y ácido acético y el conteo de las placas virales se realizó al séptimo día post-inoculación.

El título viral se determinó según la relación:

$$P \times A \times 10^x = \text{UFP/mL}$$

Donde:

P: Promedio del número de placas obtenido para las réplicas.

A: Factor de corrección para expresar el título en UFP/mL (1000 μ L/Volumen de inóculo).

10x: Representa la dilución en que se contaron las placas (Factor de dilución).

La actividad inhibitoria se expresó como (título viral de las células con el extracto/ título de las células del grupo control) *100. Se construyeron curvas dosis-inhibición para obtener los valores de la concentración inhibitoria media (CI_{50}).

El índice de selectividad IS fue calculado con base a la relación de la concentración citotóxica al 50% y la concentración inhibitoria al 50% (CC_{50}/CI_{50}).

3.6. Cuantificación del título viral mediante biología molecular

3.6.1. Extracción de ARN viral

Para la extracción del ARN viral de los sobrenadantes celulares se empleó el estuche comercial High Pure Viral RNA Kit (Roche) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se partió de un volumen de 140 μ L del sobrenadante de cultivo de las líneas celulares THP-1. El ARN obtenido se almacenó a -80°C hasta su utilización.

3.6.2. Cuantificación de la carga viral por qRT-PCR

El procedimiento se realizó en el equipo en el equipo Rotor-Gene Q (QIAGEN, Alemania). Se usaron los cebadores diseñados por Santiago y colaboradores junto a su respectivo protocolo de qRT-PCR (201). Se utilizó el kit QuantiFast Multiplex RT-PCR + R siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la cuantificación se realizó una curva patrón a partir de ARN viral extraído de diluciones seriadas de un stock viral de título conocido.

3.7. Ensayo de cuantificación de la expresión de citoquinas y mediadores lipídicos en THP-1

Para la realización de este ensayo se utilizó la línea celular THP-1 al ser un tipo celular proveniente de monocitos y por el papel que estos desempeñan en el sistema inmune y al constituir dianas directas del DENV. Un volumen de 500 μ L a una concentración de 1 000 000 células/mL fueron sembradas en placas de 24 pocillos. Estas células fueron tratadas con 500 μ L de varias concentraciones de

Curmeric hasta alcanzar las siguientes concentraciones finales: 3,5 µg/mL, 1,75 µg/mL, 0,35 µg/mL y 0,035 µg/mL y se incubaron durante dos horas. Transcurrido este período, se procedió a inocularlas con DENV-2 a una MOI=3 y se incubó durante 24 horas en ambiente húmedo a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, las células se centrifugaron y se procedió a separar los sobrenadantes del pellet celular para posteriores determinaciones.

3.8 Extracción de ARNm

Para la extracción de ARN total del pellet celular obtenido de la línea THP1 se utilizó el kit comercial QIAamp RNA Mini Kit (250) (QIAGEN, Alemania) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. Posteriormente se evaluó su pureza y concentración utilizando el espectrofotómetro QIaxpert (QIAGEN, Alemania). El ARN obtenido se almacenó a -80°C hasta su utilización.

3.9. Determinación de los niveles de expresión de citoquinas

Las determinaciones por RT-PCR se realizaron en el equipo Rotor-Gene Q (QIAGEN, Alemania) empleando el kit comercial LigthCycler® FastStart Master SYBR® Green I (Roche), siguiendo las instrucciones del proveedor con una serie de pequeñas modificaciones.

Para la determinación de los niveles de expresión de *genes* se usó como control interno de la reacción el gen de expresión constitutiva hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (*HPRT*). Se cuantificó la expresión de los siguientes genes: Receptores activado por proliferadores peroxisómicos (PPAR), Proteína de unión al oxisterol tipo 10 (OSBPL10), Gen inducible por ácido retinoico (RIG-1), Beta-2 microglobulina (B2M), Receptor de ácido retinoico alfa (RARA), Factor de necrosis tumoral (TNF), Interleuquina-6 (IL-6), Interleuquina-10 (IL-10), Interleuquina-12 (IL-12) y Proteína inflamatoria de macrófagos (MIP). Las secuencias de los cebadores sentido y anti-sentido de los genes cuantificados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de cebadores empleados para el qRT-PCR de OSBPL10

Gen	Cebador sentido	Cebador anti-sentido
OSBPL10	5'-CTTCTGGGCCTGCTGTTCA-3'	5'-CCAGCCTACTCATTGGGATCA-3'
PPAR	5'-CGACCAAGTAACTCTCCTCA-3'	5'-GTTTCGTGACAATCTGTCTG-3'
RIG-1	5'-CTTGGCATGTTACACAGCTGAC-3'	5'-TTGGCTTGGGATGTGGTCTAC-3'
B2M	5'- CCACTGAAAAAGATGAGTATGCCT-3'	5'- CCAATCCAAATGCGGCATCTTCA-3'
RARA	5'- GTCTGTCAGGACAAGTCCTCAGG-3'	5'- GCTTTGCGCACCTTCTCAATGAG-3'
TNF	5'- CTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG-3'	5'- ATGGGCTACAGGCTTGTCA CTC -3'
IL-6	5'-AGACAGCCACTCACCTCTTCAG-3'	5'-TCTGCCAGTGCCTCTTTGCTG-3'
IL-10	5'-GTGATGCCCCAAGCTGAGA-3'	5'-CACGGCCTTGCTCTTGTTTT-3'
IL-12	5'-TGCCTTCACCACTCCCAAACC-3'	5'- CAATCTCTTCAGAAGTGCAAGGG-3'

MIP	5'-GCCTGCTGCTTTTCTTACACCG-3'	5'-GCAGACTTGCTTGCCTCTTTTGG-3'
HPRT	5'-GTGATGCCCAAGCTGAGA-3'	5'-CACGGCCTTGCTCTTGTTTT-3'

Para la reacción de qRT-PCR se aplicaron 24 µl de mezcla, cuya composición se muestra en la Tabla 2, y 1µl de ARN, posteriormente se colocaron en el equipo y se seleccionó el protocolo mostrado en la Tabla 3.

Tabla 2. Composición de la mezcla para el qRT-PCR

Mezcla de la reacción qRT-PCR	Volumen para 1 reacción (µL)
2x FastStart SYBR Green I Mix	12,5
Cebador sentido	0.5
Cebador antisentido	0.5
Mezcla de enzimas Quantinova RT-PCR	0.2
Agua libre de RNAsa para biología molecular	13

Tabla 3. Protocolo de qRT-PCR para la cuantificación de la expresión de los genes de interés.

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
RT			
Calentamiento	60	20 min	1

Activación de la Polimerasa			
Calentamiento	95	10 min	1
Amplificación			
Desnaturalización	95	10 seg	30
Alineamiento	60	50 seg	
Extensión	72	20 seg	
Curva de Fusión			
Fusión	60-95°C (Pendiente=0,1 Cº/s)	1 seg	1

Se utilizó el Método de Cuantificación Relativa, tomando los valores de ciclo umbral (Ct) para la aplicación de la fórmula de Nivel de expresión $2^{-\Delta CT}$, usada para calcular la expresión relativa, en la cual $-\Delta CT = [Ct(\text{gen de estudio}) - Ct(\text{gen de referencia})]$ (202). Los valores de Ct representan el número de ciclos en los cuales la fluorescencia generada dentro de la reacción cruza el valor umbral. La especificidad del ensayo se evaluó mediante el análisis de la curva de fusión.

3.10 Determinación de la actividad antioxidante del IFA del CURMERIC sobre el estado de oxidación-reducción en las líneas celulares Thp-1 ante la infección por dengue.

En este estudio se evaluó también la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT, la concentración de indicadores de daño a biomoléculas como el malonildialdehído (MDA), hidroperóxidos totales (ROOH) y productos avanzados de la oxidación de proteínas (PAOP). Adicionalmente, se determinaron indicadores del estado antioxidante total como el potencial de peroxidación (PP), así como antioxidantes de bajo peso molecular como el GSH. Estos parámetros se cuantificaron en sobrenadante de cultivo celular de la línea celular THP-1 mediante técnicas espectrofotométricas.

3.11. Análisis estadístico

Para el procesamiento de los resultados se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism v9. Para los resultados de citotoxicidad y actividad antiviral se realizaron ajustes de regresión no lineal sobre las curvas obtenidas, en el caso de la actividad antiviral adicionalmente se realizó un análisis no paramétrico tipo Kruskal-Wallis para explorar las diferencias entre las medias de los grupos estudiados. En cuanto a la expresión de genes, también se realizó un análisis Kruskal-Wallis con corrección de Dunn. Los valores de probabilidad (p) menores de 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos. Los niveles de significación estadística encontrados están expresados en los gráficos como * para una $p < 0,05$ y ** para una $p < 0,001$.

4. Resultados

Ensayos de citotoxicidad por reducción del compuesto MTT

Para identificar las concentraciones de trabajo del Curmeric y del estándar de Curcumina se realizó un ensayo de citotoxicidad celular por reducción del compuesto MTT. En estos ensayos se evaluó la supervivencia celular de las células Vero y THP-1 después de exponerse durante 72 horas a varias concentraciones de los compuestos en estudio. Transcurrido el tiempo experimental se determinaron los valores de supervivencia celular expresados como: $(DO \text{ de las células con el extracto} / DO \text{ de las células del grupo control}) * 100$ y se construyeron curvas dosis-viabilidad (*Ver Figura 1, 2 y 3*). Para obtener los valores de CC_{50} se realizó una regresión no lineal de la curva anteriormente obtenida. Este análisis arrojó una ecuación de una recta de la forma $y = mx + n$ con su correspondiente valor de R-cuadrado de ajuste al modelo lineal.

Al realizar este análisis en la línea celular Vero tratada con estándar de Curcumina, obtuvimos una recta con pendiente $m = -2,088$, intercepto $n = 92,01$ y un ajuste $R\text{-cuadrado} = 0,8416$. De esta ecuación se calculó la concentración citotóxica media $CC_{50} = 20,19 \mu\text{g/mL}$.

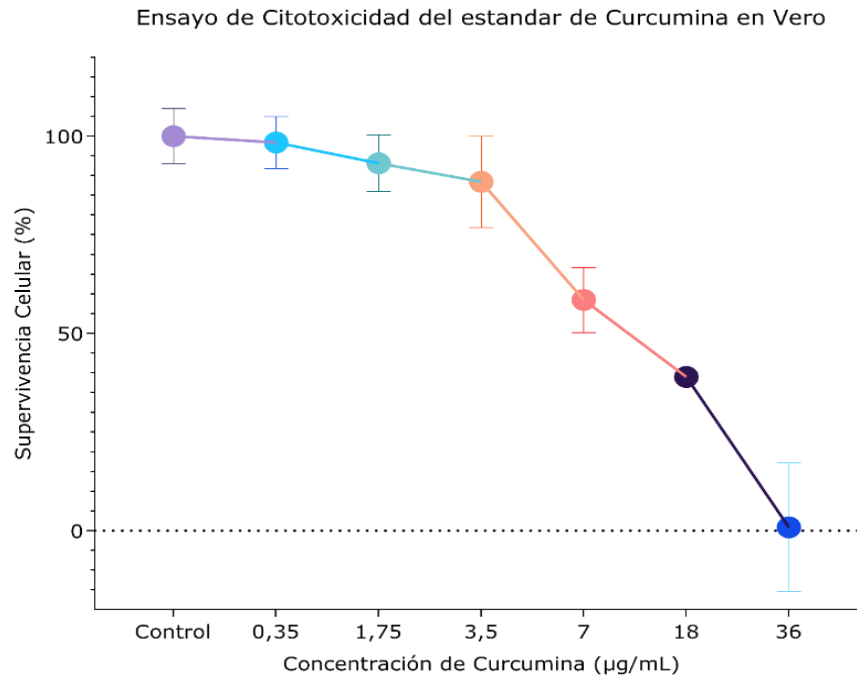


Figura 1: Supervivencia celular a las 72 horas, expresada en porcentaje respecto al control, de la línea celular Vero tratada con diferentes concentraciones de curcumina

En la misma línea celular tratada con Curmeric obtuvimos una recta con pendiente $m = -2,550$, intercepto $n = 85,65$ y un ajuste R-cuadrado = 0,8789. De esta ecuación se calculó la concentración citotóxica media $CC_{50} = 13,98 \mu\text{g/mL}$.

En el caso de la línea celular THP1, el análisis de la regresión no lineal arrojó una curva con pendiente $m = -2,713$, intercepto $n = 93,25$ y un ajuste R-cuadrado = 0,9520. De esta ecuación se calculó la concentración citotóxica media $CC_{50} = 15,94 \mu\text{g/mL}$

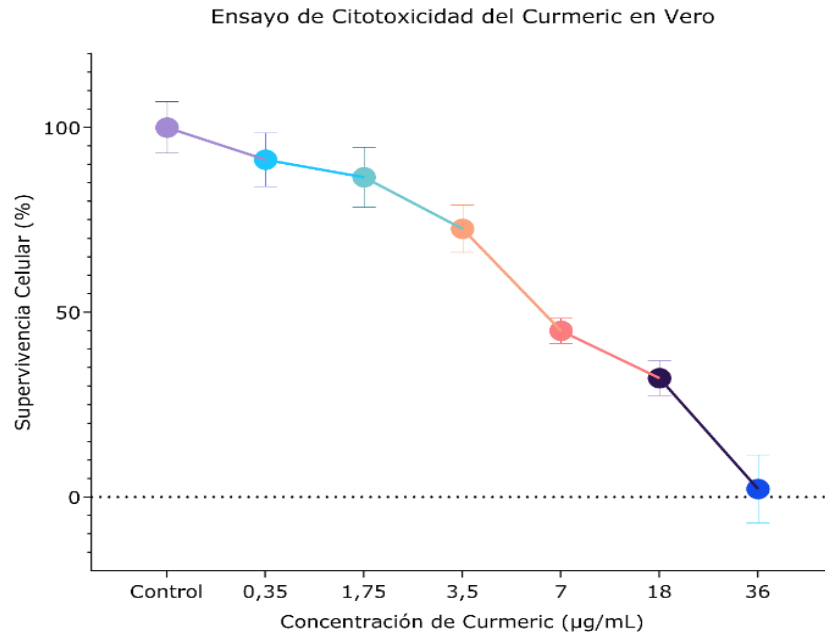


Figura 2: Supervivencia celular a las 72 horas, expresada en porcentaje respecto al control, de la línea celular Vero tratada con diferentes concentraciones de Curmeric

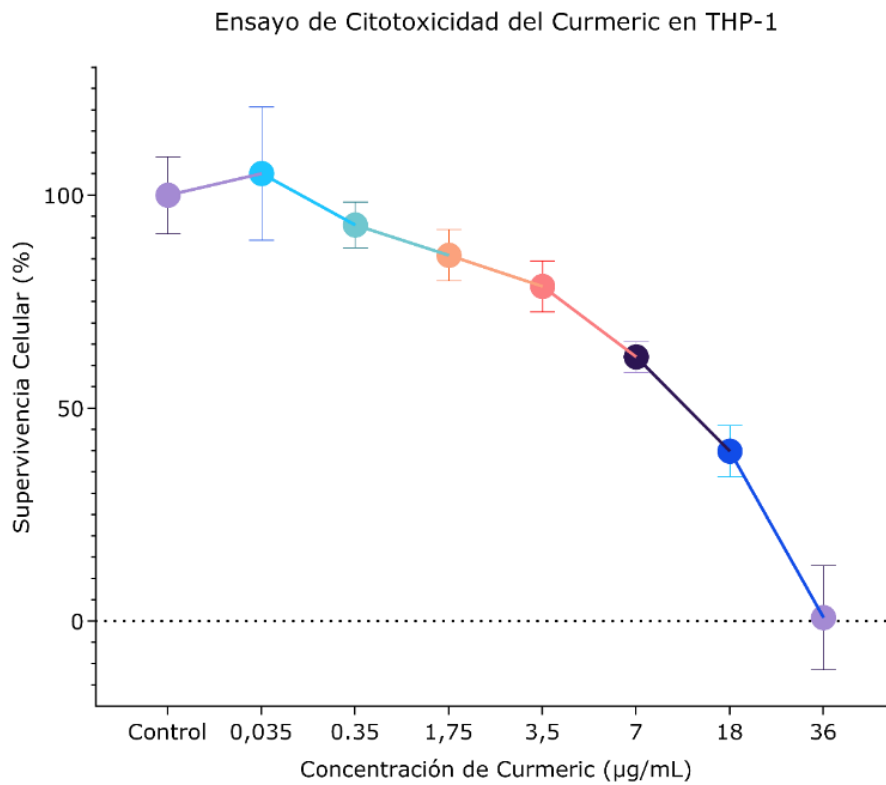


Figura 3: Supervivencia celular a las 72 horas, expresada en porcentaje respecto al control, de la línea celular THP-1 tratada con diferentes concentraciones de Curmeric.

Ensayo de actividad antiviral contra DENV-2 en la línea celular Vero y THP-1

Para el ensayo de actividad antiviral, una vez determinada la concentración viral expresada en PFU/mL, se procedió a realizar una transformación de los resultados, teniendo en cuenta que la actividad inhibitoria se expresa como (título viral de las células con el extracto/ título de las células del grupo control) *100. Posteriormente, se construyeron curvas dosis-inhibición (*Ver figura 4, 5 y 6*). Para calcular los valores de la concentración inhibitoria CI_{50} , se realizó un análisis de regresión no lineal sobre la curva dosis-inhibición. Este análisis arrojó una ecuación de una recta de la forma $y=mx+n$ con su correspondiente valor de R-cuadrado de ajuste al modelo lineal.

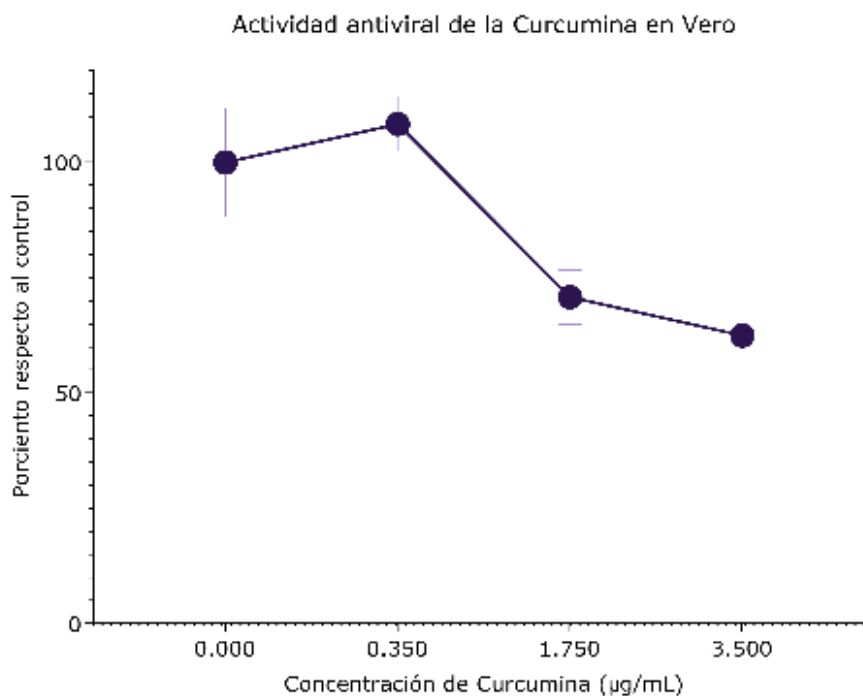


Figura 4: Concentración viral a las 72 horas post infección, expresada en porcentaje respecto al control, de la línea celular Vero tratada con diferentes concentraciones de Curcumina.

En la línea celular Vero se ensayaron el estándar de Curcumina y el Curmeric. Para las células tratadas con Curcumina se obtuvo una ecuación de la recta con pendiente = -12,86, intercepto = 97,48 y ajuste al modelo R-cuadrado = 0,9217.

Sobre la base de esta serie de valores se calculó la concentración inhibitoria y se obtuvo una $CI_{50} = 4.15 \mu\text{g/mL}$

En el caso de las células tratadas con Curmeric se obtuvo una ecuación de la recta con pendiente = -11,06, intercepto = 103,4 y ajuste al modelo R-cuadrado = 0,7871. Sobre la base de esta serie de valores se calculó la concentración inhibitoria y se obtuvo una $CI_{50} = 4,29 \mu\text{g/mL}$.

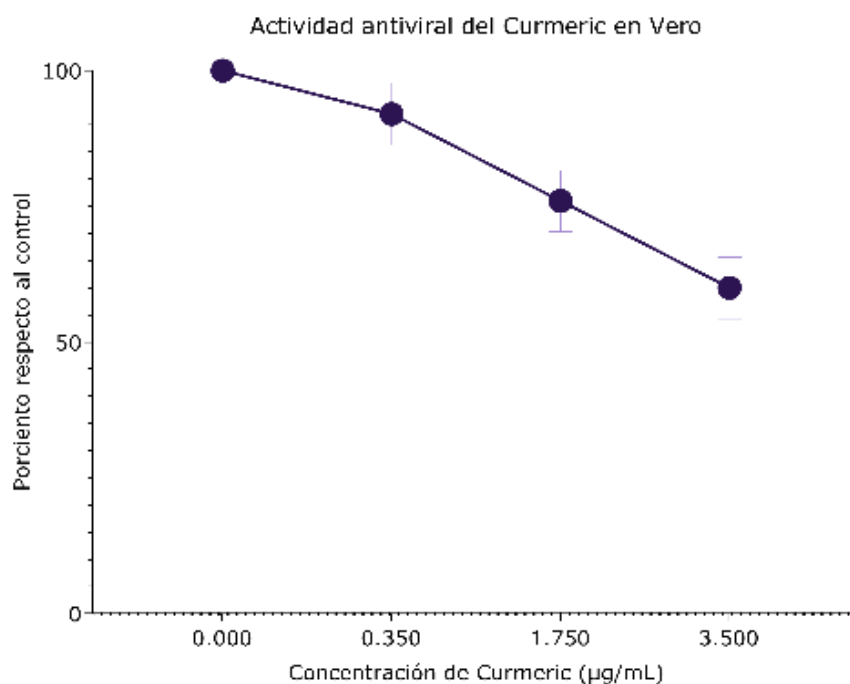


Figura 5: Concentración viral a las 72 horas post infección, expresada en porcentaje respecto al control, de la línea celular Vero tratada con diferentes concentraciones de Curmeric.

En la línea celular THP-1 solo se ensayó el efecto antiviral del Curmeric. Inicialmente se previó la determinación del efecto antiviral sobre esta línea celular mediante un método de placas como el realizado en Vero. Sin embargo, como resultado colateral de estos experimentos observamos que el sobrenadante de las células THP-1 inoculadas con DENV presentaron un efecto de destrucción sobre la monocapa de las células Vero. La ocurrencia de este efecto en el sistema celular en el que se basa la técnica hizo imposible la utilización de este método de titulación. En cambio,

se determinó la cara viral mediante qRT-PCR como queda descrito en el acápite 3.6 de la sección materiales y métodos. Después de procesar los resultados se obtuvo una ecuación de la recta con pendiente = -6,648, intercepto = 98,95 y ajuste al modelo R-cuadrado = 0,8676. Sobre la base de estos valores se calculó la concentración inhibitoria $CI_{50} = 7,31 \mu\text{g/mL}$.

Una vez obtenidos los valores de CC_{50} y CI_{50} se procedió al cálculo del índice de selectividad. Este se calculó atendiendo a la relación de la concentración citotóxica al 50% y la concentración inhibitoria al 50% (CC_{50}/CI_{50}). Para la línea celular Vero,

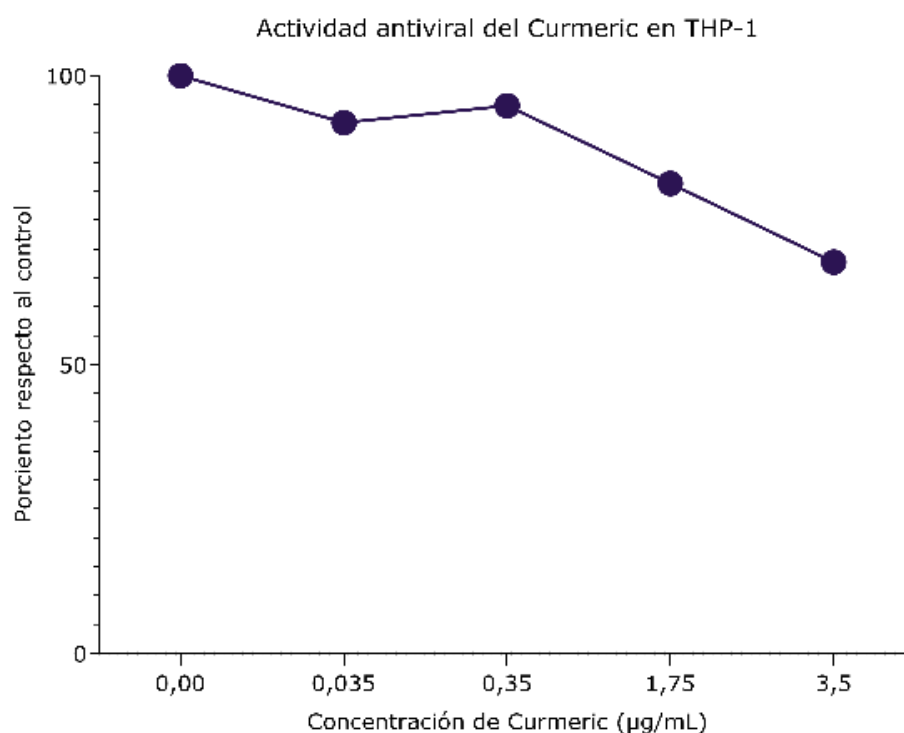


Figura 6: Concentración viral a las 72 horas post infección, expresada en porcentaje, respecto al control, de la línea celular THP-1 tratada con diferentes concentraciones de Curmeric.

tratadas con estándar de Curcumina, se obtuvo un $IS = 4,86$ y para las tratadas con Curmeric se obtuvo un $IS = 3,25$. Para la línea celular THP-1, tratada con Curmeric, se obtuvo un $IS = 2,18$. En la tabla 4 se resumen los parámetros encontrados para cada compuesto y cada línea celular.

Tabla 4: Resumen de los valores de citotoxicidad media, concentración inhibitoria e índice de selectividad en las líneas celulares Vero y THP-1 para el estándar de curcumina y el Curmeric.

Línea Celular	CC50 (µg/mL)	CI50 (µg/mL)	IS
Curcumina			
Vero	20.19	4.15	4.86
Curmeric			
Vero	13.98	4.29	3.25
THP-1	15.94	7.31	2.18

Respecto a los títulos virales, se realizó un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis en el cual se compararon entre sí las medias de concentración viral para cada concentración del compuesto utilizado en cada grupo de análisis. Se encontraron en todos los grupos diferencias estadísticamente significativas.

En la línea celular Vero, tratadas con estándar de Curcumina, se encontraron diferencias significativas en los niveles de concentración viral en las células tratadas con 3,5 µg/mL con respecto a las células tratadas con 0,35 µg/mL ($p= 0,0108$) y a las células control sin tratar ($p = 0,0221$). En este grupo también se encontraron diferencias entre las células tratadas con 1,75 µg/mL y 0,35 µg/mL ($p= 0,0221$) (Ver *Figura 7*).

Para la línea Vero, tratada con diferentes concentraciones de Curmeric, se encontraron diferencias significativas entre los niveles de concentración viral en el control de células sin tratar respecto a las células tratadas con 3,5 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,0073$) y a las células tratadas con 1,75 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,0437$). De igual manera se encontraron diferencias entre las células tratadas con 3,5 $\mu\text{g/mL}$ respecto a las tratadas con 0,35 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,0164$) (Ver Figura 8).

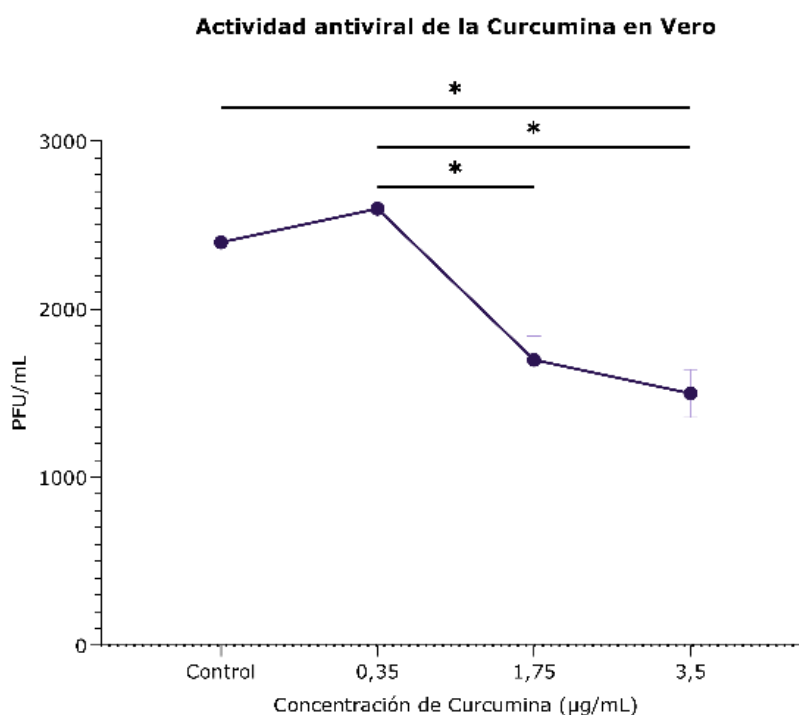


Figura 7: Concentración viral a las 72 horas post infección, expresada en PFU, de la línea celular Vero tratada con diferentes concentraciones de curcumina. Los * marcan una probabilidad estadística menor de 0,05

En el caso de la línea celular THP-1, tratadas con Curmeric, el análisis Kruskal-Wallis arrojó diferencias significativas entre la concentración viral en las células tratadas con 3,5 $\mu\text{g/mL}$ respecto a las células tratadas con 0,35 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,0145$), 0,035 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,0187$) y al control de células sin tratar ($p = 0,0089$) (Ver Figura 9)

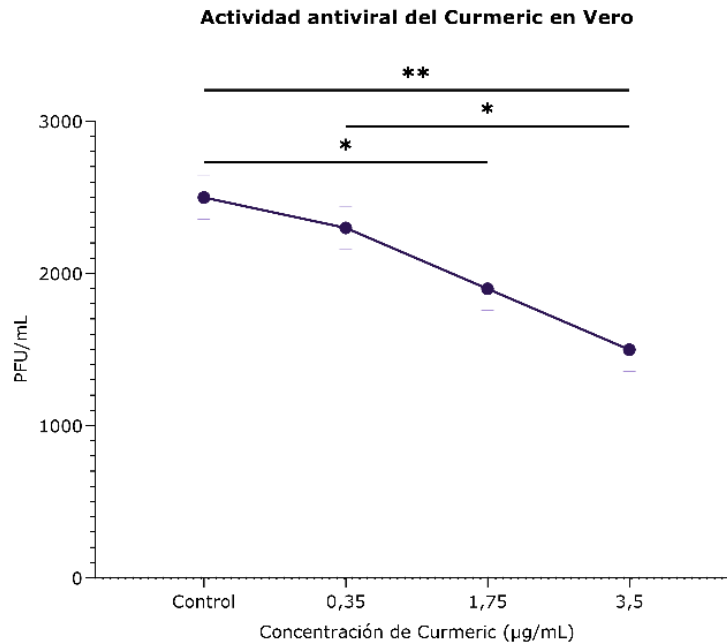


Figura 8: Concentración viral a las 72 horas post infección, expresada en PFU, de la línea celular Vero tratada con diferentes concentraciones de Curmeric. Los * marcan una probabilidad estadística menor de 0,05, ** marcan una probabilidad estadística menor de 0,01.

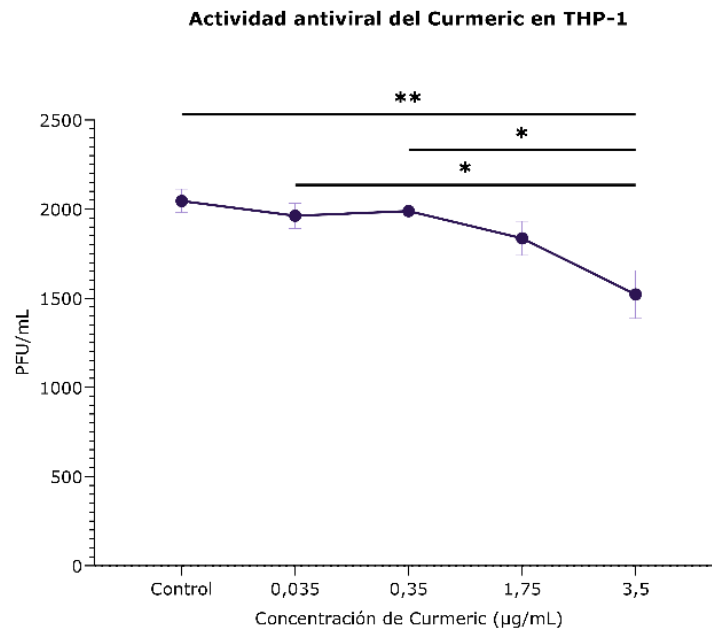


Figura 9: Concentración viral a las 72 horas post infección, expresada en PFU, de la línea celular THP-1 tratada con diferentes concentraciones de Curmeric. Los * marcan una probabilidad estadística menor de 0,05, ** marcan una probabilidad estadística menor de 0,01.

Cuantificación de la producción de ARNm de mediadores del metabolismo lipídico

Para la cuantificación de la producción de ARNm de mediadores del metabolismo lipídico se realizó una qRT-PCR. A los valores de Ct obtenidos de los genes estudiados para cada concentración de Curmeric se les aplicó una transformación de $2^{-\Delta Ct}$ para obtener su correspondiente valor de expresión relativa. Posteriormente, se verificó la distribución normal de los resultados obtenidos y se realizó para cada gen en estudio un análisis no paramétrico Kruskal-Wallis, en el cual se compararon entre sí las medias de expresión relativa de cada grupo de concentraciones utilizadas.

Como resultado de esta serie de procesamiento estadísticos no se encontraron diferencias significativas para los genes RARA y PPAR entre las células THP-1 infectadas con DENV y tratadas con Curmeric con respecto a las células infectadas con DENV y sin tratar con Curmeric (*Ver Figura 10*). Sin embargo, sí se encontraron

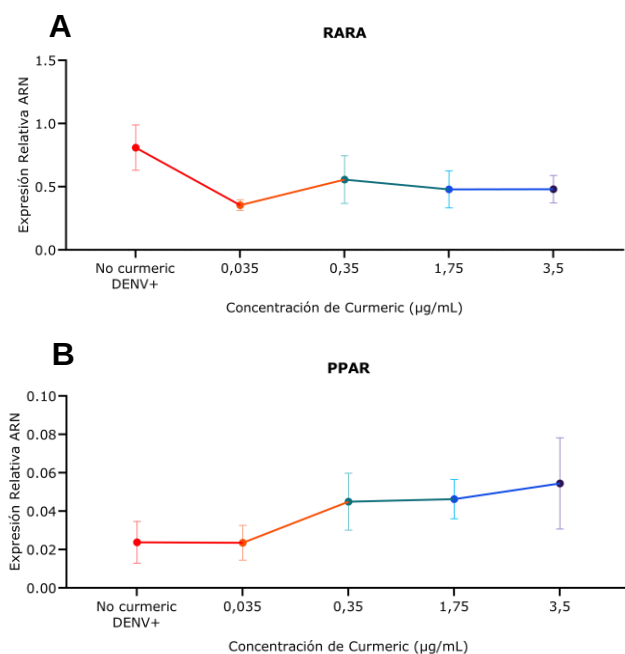


Figura 10: Expresión relativa de ARNm del gen RARA (A) y PPAR (B) a las 24 horas post infección, en la línea celular THP-1 tratada con diferentes concentraciones de Curmeric.

diferencias estadísticamente significativas en la expresión relativa del gen OSBPL10.

En el gen OSBPL10, el análisis de Kruskal-Wallis obtuvo una $p=0,0173$ y un ajuste $R\text{-cuadrado}=0,87$. Se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los niveles de expresión relativa de OSBPL10 en las células tratadas con la concentración de Curmeric 3,5 $\mu\text{g/mL}$ respecto al control de células sin tratar ($p=0,0168$) y a las células tratadas con 0,035 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0,0410$) (Ver Figura 11).

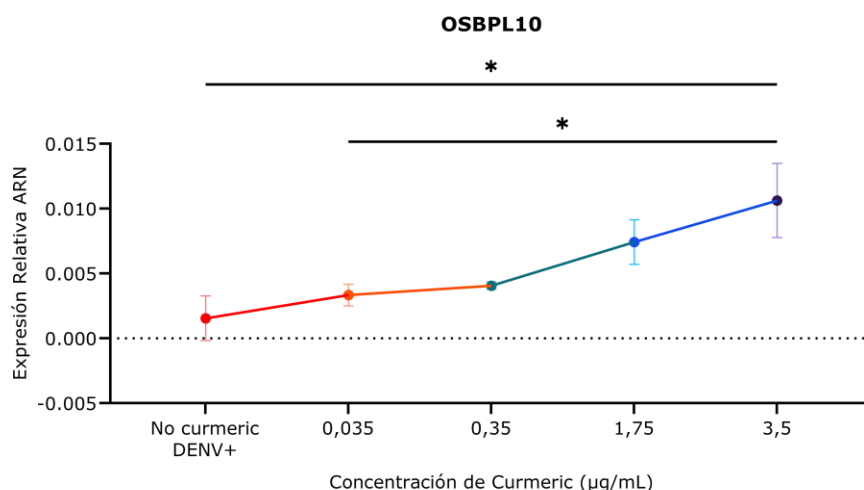


Figura 11: Expresión relativa de ARNm del gen OSBPL10 a las 24 horas post infección, en la línea celular THP-1 tratada con diferentes concentraciones de Curmeric. Los * marcan una probabilidad estadística menor de 0,05.

Cuantificación de la producción de ARNm de citoquinas

Para la cuantificación de la producción de ARNm de citoquinas se procedió como como descrito para los mediadores lipídicos. No se observaron diferencias significativas en la expresión de IL-12, TNF ni B2M entre las células tratadas con las concentraciones de Curmeric y las células sin tratar (*Ver Figura 12*). Sin

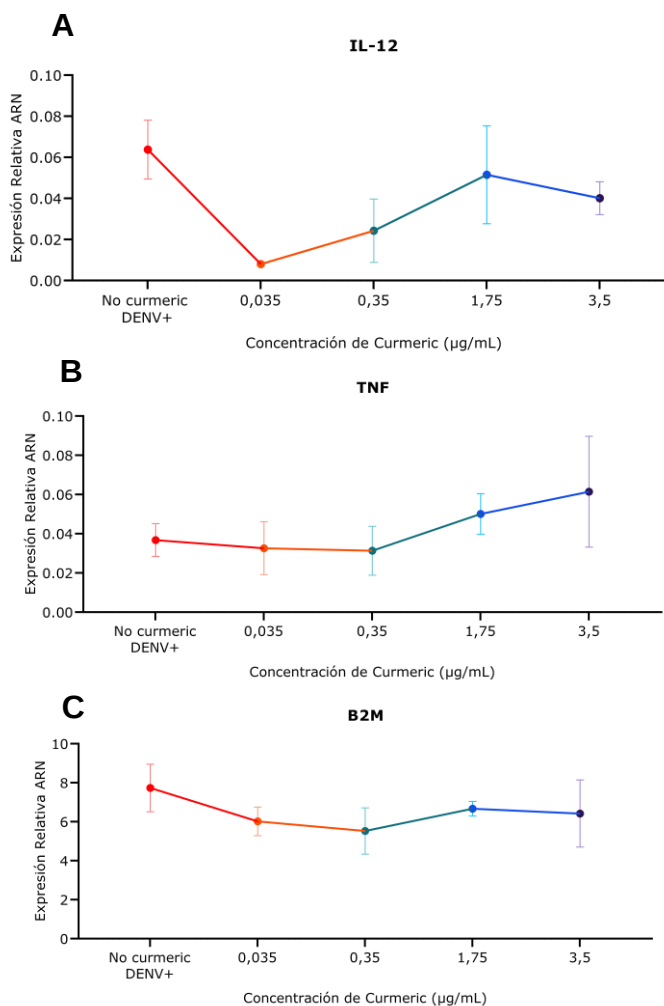


Figura 12: Expresión relativa de ARNm del gen IL-12 (A), TNF (B) y B2M (C) a las 24 horas post infección, en la línea celular THP-1 tratada con diferentes concentraciones de Curmeric.

embargo, sí se encontraron diferencias significativas en la expresión de IL-6, MIP, RIG-1 e IL-10.

En el caso del gen IL-6 el análisis de Kruskal-Wallis arrojó una $p=0.0014$ y un ajuste R-cuadrado = 0.95. Al comparar la expresión relativa de este gen en las células control sin tratar, se encontraron diferencias significativas respecto a las células con concentración 0,35 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0,0058$) y 0,035 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0,0144$). También se encontraron diferencias significativas entre los valores de expresión relativa cuando se compararon las células tratadas con 3,5 $\mu\text{g/mL}$ respecto a 0,35 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0,0038$) y a 0,035 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0,0087$). Asimismo, se encontraron diferencias al comparar las células tratadas con 1,75 $\mu\text{g/mL}$ respecto a las tratadas con 0,35 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0,0035$) y 0,035 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0,0081$) (Ver Figura 13).

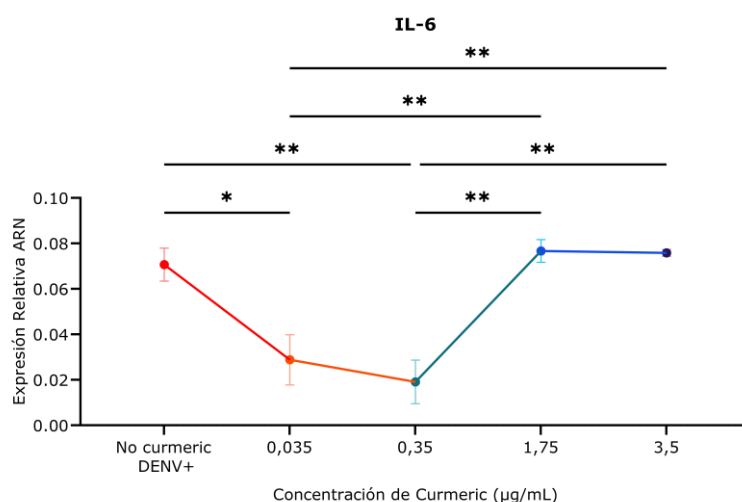


Figura 13: Expresión relativa de ARNm del gen IL-6 a las 24 horas post infección, en la línea celular THP-1 tratada con diferentes concentraciones de Curmeric. Los * marcan una probabilidad estadística menor de 0,05, ** marcan una probabilidad estadística menor de 0,01.

Para el gen MIP el análisis de Kruskal-Wallis arrojó una $p=0,0196$ y un ajuste R-cuadrado = 0,86. No se encontraron diferencias significativas entre la expresión relativa entre las concentraciones de Curmeric ensayadas y el control sin tratar. Sin embargo, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los

niveles de expresión con la concentración 0,035 $\mu\text{g/mL}$ respecto a 3,5 $\mu\text{g/mL}$ ($p =$

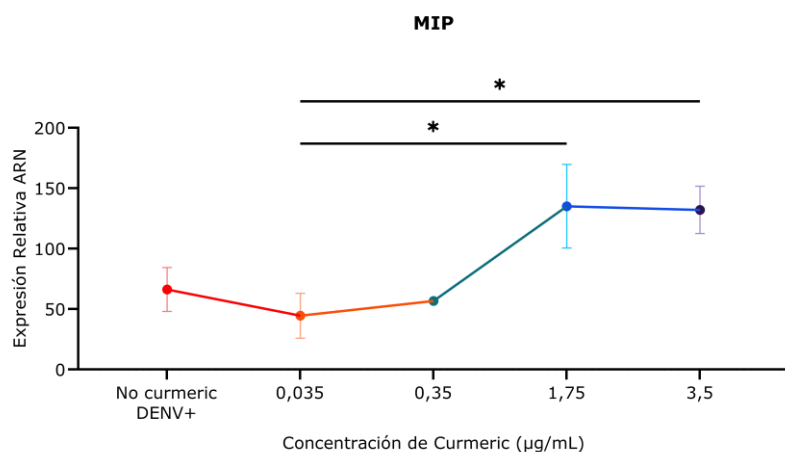


Figura 14: Expresión relativa de ARNm del gen MIP a las 24 horas post infección, en la línea celular THP-1 tratada con diferentes concentraciones de Curcuminic. Los * marcan una probabilidad estadística menor de 0,05, ** marcan una probabilidad estadística menor de 0,01.

0,0450) y a 1,75 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,0396$) (Ver Figura 14).

Para IL-10 el análisis de Kruskal-Wallis obtuvo una $p = 0,0096$ y un ajuste R-cuadrado= 0,90. Se encontraron diferencias significativas entre la expresión relativa

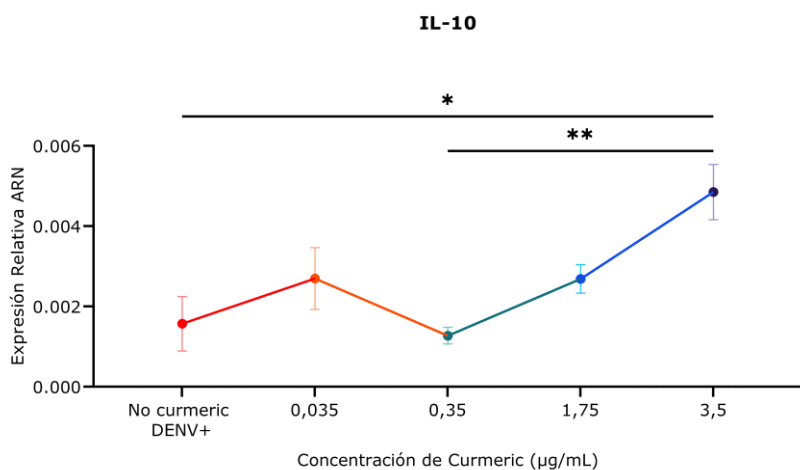


Figura 15: Expresión relativa de ARNm del gen IL-10 a las 24 horas post infección, en la línea celular THP-1 tratada con diferentes concentraciones de Curcuminic. Los * marcan una probabilidad estadística menor de 0,05, ** marcan una probabilidad estadística menor de 0,01.

de IL-10 en la mayor concentración de Curmeric, 3,5 $\mu\text{g/mL}$, respecto al control sin tratar ($p= 0,0128$). También se encontraron diferencias significativas al comparar la expresión relativa a las concentraciones 3,5 $\mu\text{g/mL}$ respecto a 0,35 $\mu\text{g/mL}$ ($p= 0,0088$) (Ver Figura 15).

En el caso de RIG-1, el análisis de Kruskal-Wallis obtuvo una $p= 0,0086$ y un ajuste R-cuadrado= 0.90. Se encontraron diferencias significativas entre la expresión relativa de RIG-1 en las células control sin tratar respecto a las células tratadas con Curmeric en las concentraciones 3,5 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,0113$), 1,75 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,0147$) y 0,35 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,0258$) (Ver Figura 16).

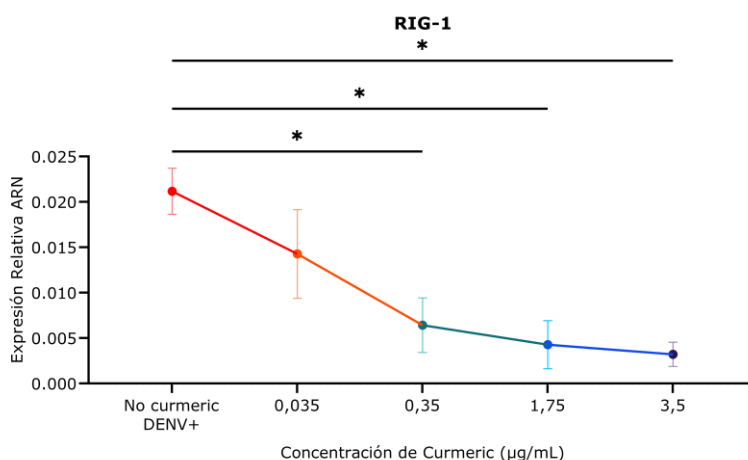


Figura 16: Expresión relativa de ARNm del gen RIG-1 a las 24 horas post infección, en la línea celular THP-1 tratada con diferentes concentraciones de Curmeric. Los * marcan una probabilidad estadística menor de 0,05.

Determinación de la actividad antioxidante del IFA del CURMERIC sobre el estado de oxidación-reducción en las líneas celulares Thp-1 ante la infección por dengue.

Durante el análisis de los resultados de los ensayos del potencial redox en nuestro sistema celular y bajo las condiciones ensayadas no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las especies reactivas estudiadas. Se realizó un análisis de Kruskal-Wallis entre los sobrenadantes de las células tratadas con 3,5 $\mu\text{g/mL}$,

1,75 µg/mL, 0,35 µg/mL, 0,035 µg/mL, no tratadas y antes del tratamiento. En ninguna de estas comparaciones se observó significancia estadística ni tendencias.

5. Discusión

A lo largo de los últimos 50 años, el dengue ha provocado innumerables brotes en todo el mundo, con una alta proporción de infecciones que ocurren en regiones tropicales y subtropicales (203). Siguen existiendo grandes lagunas en la protección contra este virus, ya que actualmente no hay antivirales disponibles y las vacunas solo están disponibles para algunos o presentan problemas de seguridad. En cambio, la elucidación de compuestos separados de plantas bioactivas ha mostrado resultados prometedores (173). Los productos orgánicos de muchas fuentes parecen poseer potencial actividad antiviral contra el dengue, ya sea evitando que el virus penetre en la células o bloqueando la producción de proteínas estructurales y no estructurales (10).

la replicación en una amplia gama de virus, incluido el virus del dengue (20).

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar la actividad antiviral contra el virus dengue en diferentes tipos celulares tanto de la curcumina como del extracto cubano Curmeric de la raíz de la *Curcuma longa* en diferentes tipos celulares. Para realizar este tipo de estudio se sigue una metodología que consiste en evaluar primeramente la citotoxicidad de la sustancia en estudio sobre el sistema celular que se empleará. Posteriormente se procede a evaluar la actividad antiviral de la sustancia a concentraciones preferiblemente sub-tóxicas o de toxicidad moderada. Una vez obtenidos estos valores es posible calcular el índice de selectividad, lo cual nos permite realizar un acercamiento sobre el verdadero potencial de la sustancia como agente antiviral (179).

El ensayo de citotoxicidad celular es una de las pruebas más usadas en la investigación de nuevos fármacos. Este es un paso preliminar y esencial para examinar las concentraciones de los compuestos que se utilizarán en los experimentos, y sirve como prueba esencial para determinar la eficacia y seguridad en diversos campos de investigación. La CC_{50} es una concentración de una

sustancia en la que puede reducir la viabilidad de una célula en un 50%. Por lo tanto, en teoría, una sustancia prometedora para el tratamiento debería tener un alto CC₅₀ (179).

En el caso de la línea celular Vero la citotoxicidad de la curcumina ha sido ampliamente reportada debido a la variedad de propiedades que posee esta molécula. El valor de CC₅₀ para la curcumina en esta línea celular observado en este trabajo se correlaciona con los encontrados por disímiles investigadores (204-210). Para el extracto natural Curmeric, hasta la fecha solo se ha publicado un estudio previo (192) en el cual se reporta una CC₅₀ mayor que la observada en nuestro estudio. Sin embargo, es importante destacar que en dicho trabajo los métodos utilizados para determinar la citotoxicidad, así como el tipo celular y el tiempo de determinación, difieren de los parámetros empleados en nuestros ensayos. Teniendo esto en consideración, la citotoxicidad reportada para el Curmeric en este trabajo coincide con la de varios estudios realizados para otros extractos similares de *Curcuma longa* en la línea Vero y THP-1 (211, 212).

Los resultados obtenidos en este apartado revelan que el producto Curmeric muestra una mayor citotoxicidad en la línea celular THP-1 en comparación con la línea Vero. En este sentido, es importante destacar que se ha observado que la curcumina tiene efectos citotóxicos más pronunciados en células tumorales que en células no tumorales (17), lo que podría respaldar las diferencias en la citotoxicidad observada. Estos hallazgos consolidan la idea de que el Curmeric puede tener propiedades citotóxicas selectivas, lo que lo convierte en un candidato prometedor para el desarrollo de terapias dirigidas contra células tumorales. Sin embargo, es importante considerar que la citotoxicidad observada en la línea THP-1 puede ser específica para este tipo de células y no reflejar necesariamente el comportamiento en otras líneas celulares o en tejidos sanos.

Uno de los factores cruciales evaluados en este estudio para determinar el potencial efecto antiviral de la curcumina y el Curmeric sobre la replicación del virus del dengue fue la concentración inhibitoria media. Este parámetro se define como la concentración de una sustancia requerida para inhibir la actividad viral en un 50% y

proporciona una estimación cuantitativa de la cantidad de sustancia necesaria para lograr una reducción significativa en la actividad. Es importante destacar que la determinación de la CI_{50} no solo permite evaluar el efecto de un compuesto en particular, sino que también proporciona información esencial sobre su potencia. Al comparar las CI_{50} de diferentes sustancias, es posible identificar aquellas que demuestran una mayor capacidad de inhibición viral a una menor concentración, lo cual es deseable en términos de eficacia y potencial aplicación clínica.

En este estudio se observó que las CI_{50} para la curcumina y el Curmeric son muy similares en la línea celular Vero. Sin embargo, en la línea celular THP-1, se registró para el Curmeric, una CI_{50} notablemente mayor que la observada en la línea Vero. Esto sugiere que el Curmeric puede tener una actividad antiviral más pronunciada en la línea Vero en comparación con la línea THP-1. Los resultados de la concentración inhibitoria encontrados en esta investigación están en concordancia con las concentraciones inhibitorias reportadas por Gao y colaboradores (206) quienes encontraron que la curcumina reducía significativamente la formación de placas de las cuatro cepas del virus dengue a una concentración muy similar que la observada en este trabajo.

A pesar de existir diferencias en las dosis de los compuestos estudiados, ambos provocaron una marcada disminución en la replicación viral al tratar las células con la más alta concentración ensayada. Sin embargo, es importante destacar que se observó un efecto más potente al analizar la actividad antiviral del extracto de Curmeric en comparación con la curcumina. El extracto Curmeric posee la ventaja de contener otros compuestos polifenólicos (213) que podrían tener acciones antivirales por sí solos (214). Los resultados de este estudio apoyan la idea de que el Curmeric tiene propiedades antivirales, y que la presencia de otros compuestos polifenólicos en el extracto puede potenciar esta actividad por un efecto sinérgico. Esto sugiere que el Curmeric podría ser una alternativa prometedora para la prevención y el manejo de infecciones virales, como las causadas por el virus del dengue. Estos resultados son consistentes con los de numerosos investigadores que han informado previamente sobre la reducción de la replicación del virus del

dengue al tratar las células en la que se replica con ciertas concentraciones de curcumina (188, 190, 191, 206, 214). Sin embargo, nuestro estudio constituye el primer informe de la actividad anti-dengue, del extracto natural Curmeric en las líneas celulares Vero y THP-1.

En cuanto al mecanismo mediante el cual, tanto la curcumina como el Curmeric, podrían estar ocasionando estos efectos antivirales, varios autores han explorado la actividad de la curcumina en la inhibición de la replicación de virus envueltos como el VIH, el virus de la influenza A, el virus del herpes simple, el virus de la hepatitis B, el virus de la encefalitis japonesa y el DENV (209, 215-217). Chen y colaboradores (209) observaron que la curcumina es un inhibidor del DENV2 con tratamiento previo o co-tratamiento con el virus. Otros autores informan que la curcumina altera el citoesqueleto de actina y provoca la desorganización de los microfilamentos de actina concomitante con la apoptosis de las células tratadas (190, 218). Se ha demostrado que los DENV tienen una estrecha interacción con los elementos del citoesqueleto en el ciclo de replicación (47). El filamento de actina contribuye en la entrada de DENV-2 mediante la interacción con la proteína E del virus. También se observó una reducción en la replicación viral de DENV al bloquear la función de actina (219). En el caso de la curcumina nativa, se ha demostrado que inhibe la polimerización de actina con una CI_{50} de 16 μM en células infectadas con DENV-2 (220).

Recientemente, se ha planteado que el efecto antiviral de la curcumina sobre el virus dengue también se alcanza mediante la inhibición de la proteasa viral (188, 214). La curcumina logra la inhibición alostérica de esta proteína al alterar/desestabilizar su conformación cerrada (activa) para modular el equilibrio conformacional (188). Estas observaciones otorgan a la curcumina una gran ventaja al ser utilizada inmediatamente para combatir las infecciones flavivirales, además de servir como un compuesto prometedor para un mayor diseño de potentes inhibidores alostéricos.

Utilizando los resultados de la concentración citotóxica e inhibitoria media obtenidos en este trabajo, se realizó el cálculo del índice de selectividad. El índice de

selectividad es una medida de relación entre los niveles citotóxicos y la capacidad inhibitoria de una sustancia (CC50/IC50). Esta medida puede ser útil para determinar qué sustancias son apropiadas para un mayor desarrollo o para evaluar la eficacia y seguridad de un producto. Varios autores consideran un IS mayor o igual que dos para indicar la presencia de actividad antiviral específica (221). Los resultados de este estudio indican un índice de selectividad mayor que dos tanto para la curcumina como el Curmeric, lo que sustenta su uso potencial como antivirales contra el dengue.

En 2013, Padilla y colaboradores estudiaron por primera vez el efecto antiviral de la curcumina contra el virus del dengue (190). El índice de selectividad que se reporta en dicho trabajo fue similar al encontrado para el extracto Curmeric en las células THP-1. Los índices de selectividad reportados en el presente trabajo también son similares al reportado por Narayanan y colaboradores en 2012, quienes determinaron el efecto de la curcumina en la línea celular Vero para herpes virus (205). A pesar de que no se trata del mismo virus, el Herpes virus es un virus envuelto al igual que el dengue y el mismo mecanismo de acción antiviral pudiese estar presente. Asimismo, coinciden con un estudio de Balasubramanian y colaboradores sobre el efecto de la curcumina y varios de sus análogos sobre el virus dengue (214). En este último, se plantea que la curcumina y sus análogos probablemente inhiben el DENV-2 indirectamente a través de su impacto en el metabolismo de los lípidos celulares, como la acetil-CoA carboxilasa, la ácido graso sintasa y la reducción de la formación de gotas de lípidos (214).

Estudios anteriores reportan que la curcumina se asocia con las membranas. Las propiedades hidrofóbicas de las membranas favorecen la intercalación de la curcumina en la bicapa lipídica, como en las membranas celulares, donde los anillos fenólicos de la curcumina son esenciales para la interacción con los sitios de enlace de hidrógeno (222). También se ha identificado a la curcumina como un agente que altera las membranas. El tratamiento con curcumina indujo alteraciones en las propiedades membranosas, incluidos cambios morfológicos y aumento de la permeabilidad y fluidez. Las interacciones entre las membranas celulares y la

curcumina podrían haber causado estos efectos (222). Jaruga y colaboradores (218) observaron que el tratamiento de eritrocitos con concentraciones de curcumina $>100\text{ }\mu\text{M}$ inducía cambios en la integridad de sus membranas celulares. De manera similar, a una concentración de tratamiento alta (5 mM), la curcumina aumentó la fuga de lactato deshidrogenasa (LDH) en hepatocitos de rata (25%) en comparación con la fuga de LDH observada en células no tratadas (15%) (223). La investigación utilizando un modelo de timocitos de rata demostró además que la curcumina es capaz de penetrar el citoplasma y acumularse en estructuras membranosas de orgánulos intracelulares y en la membrana nuclear. Además de inducir cambios morfológicos, el tratamiento con curcumina disminuyó los potenciales de membrana mitocondrial (223). En otro estudio, la curcumina influyó en la función de varias proteínas, como el receptor del factor de crecimiento epidérmico y la glicoproteína P (224). Estos resultados sugirieron que, además de los efectos de la curcumina sobre las estructuras de las membranas, las interacciones entre los grupos fenólicos de la curcumina y los sitios de enlace de hidrógeno en las membranas celulares podrían influir en las actividades de la membrana o en la función de las proteínas de la membrana.

La infección por flavivirus influye profundamente en los lípidos de la célula hospedera. Los resultados del análisis lipídico de las fracciones de membrana asociadas con la replicación del DENV revelaron que el 85 % de los lípidos se modificaron significativamente en comparación con el control no infectado (225). La infección por DENV es muy sensible al bloqueo de la síntesis de ácidos grasos mediante la inhibición de la enzima sintasa de ácidos grasos (FASN). La inhibición de enzimas clave en la vía de síntesis del colesterol mevalonato difosfo descarboxilasa, HMG-CoA sintasa y escualeno sintetasa interfirió con la replicación del DENV (226), lo que indica la importancia del colesterol en la infección por DENV. Se ha demostrado previamente que la cápside del DENV interactúa con las gotitas de lípidos. La infección por el virus DENV desencadena la autofagia que libera ácidos grasos libres necesarios para mantener un alto nivel de ATP intracelular y favorecer la replicación viral (227). Se ha descubierto que los lípidos de la célula hospedera regulan la entrada viral a la célula y su replicación (226).

Atendiendo a los efectos anteriormente mencionados de la curcumina sobre los lípidos celulares y la importancia de este en la replicación del virus dengue, en este estudio nos propusimos evaluar la modulación de la expresión de varios mediadores del metabolismo lipídico por parte del Curmeric en la línea celular THP-1. Como basamento previo para esta búsqueda tenemos que diversos autores han referido un efecto de acumulación de lípidos posterior al tratamiento con curcumina (193, 222, 228) en esta misma línea celular y en el intervalo de concentraciones evaluadas en este trabajo.

Uno de los mediadores lipídicos explorados fue el receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR). PPAR pertenecen a la superfamilia de receptores de hormonas nucleares. Los PPAR se activan mediante ácidos grasos y eicosanoides de la dieta, así como mediante fármacos, como fibratos para PPARalfa y glitazonas para PPARgamma. PPARalfa media la acción hipolipidémica de los fibratos en el tratamiento de la hipertrigliceridemia y la hipoalfalipoproteinemia. PPARalfa se considera un importante regulador del metabolismo de los lípidos intra y extracelulares (229). Los PPAR desempeñan un papel en el metabolismo de los lípidos intracelulares al regular positivamente la expresión de enzimas implicadas en la conversión de ácidos grasos en ésteres de acil-coenzima A, la entrada de ácidos grasos en las mitocondrias y el catabolismo de los ácidos grasos peroxisomales y mitocondriales (230).

Se ha reportado que la curcumina previene la inflamación al antagonizar la transducción de señales proinflamatorias y la expresión genética, principalmente mediante la supresión de los factores de transcripción proinflamatorios, incluido el factor nuclear kappa B (NF- κ B), el transductor de señales y los activadores de la transcripción-3 (ATF3) y Wnt/b-catenina, y activando las vías de señalización celular del receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR) y del factor nuclear eritroide-2 relacionado con el factor 2 (Nrf2) (193, 231, 232). Estas interacciones conducen a la regulación negativa de las adipocinas, incluido el factor de necrosis tumoral (TNF α), la interleucina-6 (IL-6), la leptina, la resistina y la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), y la regulación positiva de

adiponectina, que puede afectar la homeostasis de los lípidos en los adipocitos, las células pancreáticas, las células estrelladas hepáticas (HSC), los macrófagos y las células musculares (233-235).

A pesar de no existir reportes sobre el efecto de PPAR en la replicación del virus dengue, un estudio reciente demostró que las respuestas inflamatorias durante la infección por el virus Chikungunya (CHIKV) involucraban el sistema renina-angiotensina (RAS) y las vías PPAR γ (236). La supresión de la infección por CHIKV mediada por telmisartán está mediada, al menos en parte, por la activación de PPAR γ ; un antagonista de PPAR γ aumentó la carga viral de CHIKV [88]. Otro estudio reciente demostró que las respuestas celulares inducidas por el ZIKV de células progenitoras neurales derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) involucraban las vías de señalización de PPAR, lo que puede contribuir a la neurogénesis y la replicación viral (229).

A pesar de que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de PPAR en las células tratadas con Curmeric respecto al control sin tratar en el contexto de la infección por dengue, sí se observó una tendencia dosis-dependiente hacia el incremento de su transcripción. Las concentraciones de Curmeric en las que se observa un aumento de PPAR de aproximadamente tres veces respecto al control correlacionan con una menor replicación viral. Los resultados del presente trabajo sobre la tendencia a la elevación en la transcripción de este marcador y la consecuente disminución de la replicación viral por el Curmeric resultan llamativos. Por lo tanto, futuros ensayos deberían explorar los efectos protectores de PPAR y sus combinaciones con los antivirales actuales en el contexto de la infección por dengue.

En nuestros resultados también se observó, aunque no significativamente, una tendencia a la disminución en la transcripción de RARA. Esta reducción se observó incluso a las concentraciones más bajas utilizadas de Curmeric, sin embargo, no se observó una relación dosis-respuesta. Los receptores de ácido retinoico son proteínas que se encuentran en el núcleo o en el citoplasma que unen específicamente el ácido retinoico o al retinol (237). Al igual que ocurre con otros

receptores nucleares de tipo II, los RARs forman heterodímeros con el RXR en ausencia de ligando. El dímero RAR/RXR se une al elemento de respuesta a hormonas en el ADN, formando un complejo con una proteína co-represora. La unión de un ligando agonista a RAR da lugar a la disociación del co-represor y al reclutamiento de una proteína co-activadora que activan el promotor y así la transcripción de los genes diana (238).

Los RARs son receptores muy poco estudiados en el contexto de las infecciones virales. Existe un reporte que asocia el RARB con la replicación de los adenovirus humanos, considerándolo como una molécula clave en la infección de adenovirus y una diana potencial para el control de este virus (239). También se ha asociado el RARA a la replicación del virus de la hepatitis B considerándose este receptor como diana de agonistas para inhibir la replicación viral (240). Debido a la carencia de datos sobre la interacción de este receptor con la curcumina y la replicación del virus dengue consideramos que futuras investigaciones deberían desarrollarse para ahondar en este particular.

Interesantemente, se observó que el tratamiento con Curmeric eleva significativamente los niveles de expresión de OSBPL10 de una manera dosis-dependiente en las células THP-1. Existe hasta la fecha un único reporte de que la curcumina aumenta la expresión de OSBPL7, un miembro de la misma familia de proteínas, sin embargo se desconoce el mecanismo mediante el cual esto ocurre (241). El presente trabajo constituye, a nuestro saber, el primer reporte sobre la influencia de la curcumina sobre la transcripción de OSBPL10 en el contexto de la infección por dengue.

OSBPL10 pertenece a la familia de las proteínas de unión al oxisterol, las cuales están implicadas en muchos procesos celulares, incluyendo señalización, tráfico vesicular y metabolismo lipídico (242). Las OSBP están implicadas en los procesos de replicación de diferentes virus (243, 244). En particular se ha demostrado su importancia en los procesos de maduración, ensamblaje y secreción del virus de la hepatitis C, perteneciente a la familia *Flaviviridae* al igual que el virus dengue (239). Meutiawati y colaboradores (245), recientemente, demostraron que las OSBPs

están involucradas en la replicación del virus dengue al regular la homeostasis lipídica intracelular, particularmente la distribución del colesterol necesaria para la formación de los complejos de replicación del virus dengue.

La sobreexpresión de OSBP conduce a un aumento en los niveles de ARNm de varios genes regulados por esteroides (receptor de LDL, HMG-CoA reductasa y HMG-CoA sintasa), junto con una mayor biosíntesis de colesterol (246). Investigaciones anteriores han sugerido que ORP10, el producto del gen OSBPL10, influye en la producción de triglicéridos y colesterol, así como en la formación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), específicamente en entornos *in vitro* (247). Se ha documentado que las balsas lipídicas, microdominios de membrana ricos en colesterol y esfingolípidos, desempeñan un papel importante en la entrada del DENV en los macrófagos, ya sea en ausencia o en presencia de anticuerpos facilitadores (248-250). El oxisterol es capaz de inhibir la replicación de virus con envoltura al bloquear la fusión entre la envoltura viral y la membrana celular (251). En un estudio reciente Zheng y colaboradores (252) demostraron que una formulación de curcumina era capaz de reducir los niveles de colesterol total e inhibir la replicación del EMCV, posiblemente activando el oxisterol y reduciendo el colesterol total en las células del hospedero. Al considerar los hallazgos colectivos anteriores junto con los nuestros, es posible sugerir que un aumento en la expresión de OSBPL10 en las células THP-1 tratadas con Curmeric pudiese estar relacionado con una mayor acumulación y activación de oxisterol lo cual podría contribuir al efecto inhibitorio sobre la replicación del virus dengue.

En las últimas décadas se ha confirmado que el metabolismo del colesterol interactúa con el sistema inmunológico (253). El vínculo entre el metabolismo del colesterol, la respuesta inmunológica y la inflamación ha sido un “punto crítico” para la investigación desde los años 2000, dando lugar al concepto de “inmunometabolismo” (254). La curcumina también se ha demostrado que es un potente agente inmunomodulador que puede modificar la actividad de las células inmunitarias, incluidas las células T y B, los macrófagos, los neutrófilos, las células dendríticas (DC) y las células asesinas naturales (NK). La curcumina regula

negativamente las citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-2, IL-6, IL8, IFN- γ , así como la proteína quimiotáctica de monocitos 1-1 (MCP-1), iNOS y NO en muchas enfermedades patológicas (17, 216). La curcumina inhibe la proliferación de linfocitos y su capacidad para secretar IL-4, IL-5 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (187). Por otro lado, la curcumina puede inducir la expresión y producción de IL-10 para contrarrestar afecciones inflamatorias. Algunos de los efectos antiinflamatorios de esta molécula incluyen la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y una reducción de la actividad de TNF- α , IL-12 y la infiltración de macrófagos (255). También inhibe la señalización de TGF- β y NF- κ B, así como la expresión de α -actina del músculo liso y tenascina-C, una proteína antiadhesiva (17, 18, 256).

En este trabajo examinamos la expresión relativa de varios genes involucrados en la respuesta inmune en el contexto de la infección por dengue. Uno de ellos fue el gen inducible por ácido retinoico (RIG-1), para el cual se observaron diferencias significativas en su expresión relativa entre las células control sin tratar y las células tratadas con Curmeric a diferentes concentraciones. RIG-1 es una molécula intracelular que responde a los ácidos nucleicos virales y activa la señalización de miembros de la familia del interferón tipo I, que se consideran entre los más importantes efectores del sistema inmunológico innato. Aunque RIG-I se expresa de forma ubicua en el citoplasma, sus niveles están sujetos a regulación transcripcional y postranscripcional (237). RIG-I pertenece a la familia de genes estimulados por IFN (ISG), pero ciertas células regulan su expresión a través de mecanismos independientes de IFN. Otros estudios sugieren que RIG-I tiene funciones además de las directamente relacionadas con su papel en la detección de ARN y la defensa del huésped (257). Se ha descubierto que los receptores similares al gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I) (RLR) son capaces de reconocer el ARN viral para la acción antiviral en la inmunidad antiviral innata (258).

Ha sido demostrado la importancia de RIG-I en la respuesta antiviral en las infecciones por Flavivirus, en particular en el reconocimiento del ARN viral y la transmisión de señales que activan la respuesta inmune innata temprana (259). En

el caso del dengue en particular se ha demostrado su importancia en la inducción de una rápida expresión de los IFN tipo I mediante la activación de los factores de transcripción IRF3 e IRF7 (259, 260). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que tanto los ARN virales como los derivados del huésped pueden desencadenar la activación de los RLR; por lo tanto, la activación adecuada de los RLR puede ejercer eficazmente efectos antivirales. Por el contrario, si la activación de RIG-I no se controla, puede provocar una disfunción inmunitaria y la producción de una tormenta de citocinas, que puede provocar daños graves en el organismo (261).

Sprokholt y colaboradores (216) observaron que la vía de señalización RIG-1 y los niveles de proteína NF- κ B disminuyen significativamente después del tratamiento con curcumina, controlando así la respuesta inflamatoria. También se ha demostrado que la curcumina inhibe la expresión de RIG-1 y la activación de la vía NF- κ B inducida por IAV, HBV y el virus de la leucemia de células T humana tipo I (HTLV-I) (215, 216, 256). Es importante destacar que, a nuestro saber, no existe ningún reporte hasta la fecha en el que se analice la respuesta de RIG-1 ante concentraciones de Curcumina en el contexto de la infección por dengue. Nuestros resultados en este sentido son interesantes puesto que la disminución en la expresión de RIG-1 en las células tratadas con Curmeric podría debilitar la respuesta antiviral celular temprana. Sin embargo, también podría contribuir a controlar la respuesta inflamatoria producida por la infección viral. De manera similar a nuestros resultados, varios autores han sugerido que la disminución en la vía de señalización de RIG-1/STAT1/2 por la curcumina puede regular negativamente la producción de citoquinas proinflamatorias durante la infección por Influenza A (262) y Coronavirus bovino (263). Sería factible comprender a profundidad los mecanismos subyacentes y el impacto de estas diferencias en la capacidad de las células para combatir el virus del dengue y modular la tormenta de citoquinas propia de las formas graves de la enfermedad.

Otro de los marcadores inmunológicos estudiados fue la IL-6 debido a que existe un consenso de que la elevada presencia en el plasma de esta citoquina puede

constituir un marcador de severidad en la enfermedad por dengue (264-269). La IL-6 es una citoquina multifuncional producida por diferentes tipos celulares, incluyendo células del sistema inmune (células B, células T, macrófagos y células dendríticas), fibroblastos, células endoteliales, miocitos, tejido adiposo, y células β pancreáticas (78). Es una citocina pluripotencial ya que tiene acciones tanto proinflamatorias como antiinflamatorias. En la actualidad se la reconoce como el principal mediador de la respuesta de fase aguda; también posee efectos antiinflamatorios al ejercer un control parcial sobre la producción de IL-1 y TNF- α (6). Los efectos de la IL-6 en la inmunidad dependen del contexto y de su concentración local, así como de la presencia o ausencia de otras proteínas reguladoras que actúan en la vía de transducción de señales, o de la concentración de su receptor soluble (270).

En nuestro estudio encontramos un comportamiento interesante para la expresión de IL-6. Para las dos menores concentraciones de Curmeric ensayadas (0,035 $\mu\text{g/mL}$ y 0,035 $\mu\text{g/mL}$) se observa una disminución de la expresión de IL-6. Estos resultados se corresponden con lo reportado en la literatura internacional, donde varios autores reportan la disminución de este marcador inmunológico posterior al tratamiento con curcumina (270-273). Sin embargo, para las dos concentraciones más elevadas usadas en nuestro ensayo (1,75 $\mu\text{g/mL}$ y 3,5 $\mu\text{g/mL}$) se observa un aumento significativo de este marcador. Este aumento a las dos últimas concentraciones no se corresponde con lo previamente descrito en la literatura, y tampoco se correlaciona con otros resultados obtenidos en este mismo estudio donde se observa un aumento de IL-10 que debería contribuir a regular negativamente la expresión de IL-6. Estas observaciones nos hacen considerar que quizá la regulación de esta citoquina por parte del Curmeric sea sensible a la dosis y que la elevación de la expresión de la misma pudiese ser producto del estrés celular provocado por el tratamiento. Sin embargo, es necesario destacar que los resultados observados pueden ser producto de una dinámica molecular no contemplada en el diseño del estudio y que sea necesario evaluar cinéticamente la expresión de este marcador.

También evaluamos la expresión de la proteína 1 alfa inflamatoria de los macrófagos (MIP-1 α /CCL3) que es una quimiocina quimiotáctica secretada por los macrófagos (274). Esta molécula realiza diversas funciones biológicas, como el reclutamiento de células inflamatorias, la cicatrización de heridas, la inhibición de células madre y el mantenimiento de la respuesta inmune efectora.

MIP-1 α /CCL3 juega un papel importante en la patogénesis de diversas enfermedades (275) y es esencial para inducir la respuesta inflamatoria contra los virus. Por ejemplo, tras la exposición del tejido pulmonar al virus respiratorio sincitial (VSR), MIP-1 α /CCL3 induce el reclutamiento y la migración de eosinófilos y basófilos (276). Los macrófagos infectados con VIH exhiben niveles aumentados de expresión de MIP-1 α /CCL3, la cual se correlaciona con la replicación viral. Varias quimiocinas expresadas y secretadas tras la activación de las células T como RANTES/CCL5, MIP-1 α /CCL3 y MIP-1 β /CCL4, demuestran actividad supresora del VIH (277). En el caso del dengue varios autores han señalado el aumento de los niveles séricos de esta quimioquina post-infección (138, 275, 278, 279). También se ha sugerido que MIP-1 podría contribuir a las alteraciones hematopoyéticas ocurridas durante la infección por dengue (278).

Nuestros hallazgos revelan un incremento significativo en la expresión de la quimioquina MIP-1 de forma dosis-dependiente para las dos concentraciones más altas ensayadas de Curmeric. Este marcador parece exhibir un comportamiento sensible a la dosis similar al descrito para IL-6. A nuestro saber, hasta la fecha solo se ha publicado un estudio que investiga la influencia de la curcumina sobre la MIP-1. En 2020, Liang y su equipo (280) informaron sobre el papel de la curcumina en la inhibición de la migración de precursores de osteoclastos mediante su capacidad de bloquear la producción de MIP-1, que participa en la osteoclastogénesis regulada por la curcumina. Se necesita posterior investigación en el rol del Curmeric y la curcumina sobre la expresión de este mediador del sistema inmune y su papel en la patogenia de la enfermedad por virus dengue.

En este trabajo también estudiamos la expresión de la IL-10. Observamos que existe una relación dosis-dependiente entre el tratamiento con concentraciones

crecientes de Curmeric, el aumento de la expresión de IL-10 y la disminución de la replicación viral. La IL-10 es un miembro de una familia de citoquinas que incluyen la IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 y la IL-26. Esta es expresada por células del sistema inmune innato y adaptativo, incluyendo células T CD4+ y T CD8+, macrófagos, mastocitos, NK, eosinófilos y neutrófilos (281). Las células T reg CD4+ son sus principales productoras y a su vez esta citoquina es crítica para la generación y mantenimiento de estas células (282); acciones que llevan a cabo a través de un proceso autocrino (283). La principal acción biológica de la IL-10 son los efectos inmunosupresores con impacto sobre las células presentadoras de antígenos (CPA), sobre las cuales se ha visto una reducción de la expresión de MHC II (284), así como de moléculas co-estimuladoras (CD80/CD86 y CD28) (283). Adicionalmente causa la inhibición de la liberación de citoquinas proinflamatorias, como TNF- α e IL-6 (285, 286). Por todo lo anterior a esta citoquina se le considera como reguladora por excelencia de la respuesta inmune inflamatoria. Durante la infección, una vez que ocurre el control de los patógenos por la respuesta inmune inflamatoria, la IL-10 inhibe la actividad de la mayoría de las células efectoras del sistema inmune, permitiendo el regreso a la homeostasis y evitando el daño inmunopatológico.

Se ha demostrado que la curcumina aumenta los niveles séricos de IL-10 (255, 287). También se ha demostrado que la curcumina es capaz de regular positivamente las respuestas antiinflamatorias y la liberación de IL-10 e IL-4 a través de la modulación de la vía de señalización JAK/STAT/SOCS (288). Nuestros resultados encontraron una correlación entre la dosis de Curmeric, la transcripción de este mediador inmunológico y una menor replicación del virus dengue. Estos resultados refuerzan el papel antiinflamatorio del Curmeric y su posible utilización como tratamiento contra la enfermedad por dengue ya que al elevar los niveles de IL-10 puede contribuir al mejor manejo de la tormenta de citoquinas.

Discusión integrada

El dengue, considerado una de las diez mayores amenazas para la salud global, se ha convertido en la enfermedad viral transmitida por artrópodos de mayor

propagación en todo el mundo. Actualmente, no existen terapias antivirales efectivas ni vacunas seguras disponibles para combatir esta enfermedad. En 2022, Cuba experimentó una de las epidemias de dengue más severas de su historia. Esta se caracterizó no solo por la circulación de los cuatro serotipos del virus, sino también por la presencia de escaseces agravadas por la crisis económica existente y la pandemia de COVID-19. Para abordar esta urgente crisis de salud, el gobierno cubano llamó a tomar medidas prioritarias para combatir el dengue, enfatizando un enfoque integral y sostenible. El Ministerio de Salud Pública de Cuba y el grupo cubano de Industrias Biotecnológicas y Farmacéuticas propusieron de manera colaborativa desarrollar productos tradicionales y naturales que puedan contribuir significativamente a mejorar la atención médica de la población. La curcumina, extraída de los rizomas de *Curcuma longa*, posee conocidas propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y moduladoras de los niveles de lípidos. Recientemente, se desarrolló una formulación cubana derivada de la *C. longa* cosechada localmente, conocida como "Curmeric". Los efectos biológicos de esta formulación podrían influir en los mecanismos clave de la infección por dengue, ya sea mediante un efecto antiviral directo, modulando el colesterol y los lípidos que ejercen un papel en la replicación viral o mediando las respuestas sistémicas inmune-inflamatorias asociadas.

En nuestro trabajo se demostró el efecto antiviral contra el virus dengue del Curmeric en las líneas celulares Vero y THP-1. Este efecto puede ser debido tanto a modificaciones por parte de los curcuminoides en el citoesqueleto celular, la proteasa viral, la composición de las membranas celulares o la suma de los efectos anteriores. De la misma manera se demostró que existe un efecto potenciador del Curmeric sobre la expresión de genes del metabolismo lipídico como OSBPL10 y PPAR, lo que pudiese alterar la composición de las membranas de los orgánulos de replicación y disminuir la replicación viral. Las observaciones de la variación de OSBPL10 inducidas por el Curmeric constituyen un hallazgo interesante debido a que este mismo grupo de investigación ha señalado previamente el rol de este mediador como posible puente entre el metabolismo lipídico y la respuesta inmune. Asimismo, también se observó la actividad del extracto sobre la expresión de genes

de mediadores inmunológicos. El resultado de la actividad de estos mediadores sobre la respuesta inmune durante la infección por dengue podría tributar a un efecto antiviral indirecto importante a considerar y a una posible estabilización de la tormenta de citoquinas característica de las formas graves de la enfermedad. En particular, los cambios detectados en la expresión de RIG-1 e IL-10 después del tratamiento celular con Curmeric en el contexto de la infección por dengue resultan importantes para la regulación de una respuesta inmune pro-inflamatoria apropiada, lo cual podría tributar a un mejor manejo de la enfermedad

Interesantemente, se observó un comportamiento distinto para la transcripción de IL-6 y MIP-1. Estas dos citoquinas presentaron una tendencia a la disminución de su expresión a dosis bajas de Curmeric, sin embargo, se elevaron a dosis más altas. En este sentido, se hacen necesarios estudios posteriores para esclarecer el rol de las dosis de Curmeric y la curcumina sobre estos marcadores, debido al papel que estos desempeñan en la patogenia de la enfermedad por dengue.

A pesar de constituir un estudio inicial sobre la actividad anti-dengue del producto cubano Curmeric, consideramos que nuestros resultados poseen novedad científica y contribuyen a la información existente sobre este extracto. Esto redundará en un mejor conocimiento para el desarrollo de terapias efectivas y sostenibles para el tratamiento de la enfermedad por dengue y abre nuevas puertas para el estudio de efectos terapéuticos del Curmeric contra otras enfermedades virales.

6. Conclusiones

- La curcumina y el extracto natural cubano Curmeric inhiben la replicación del virus dengue *in vitro*, lo cual demuestra su efecto antiviral contra este virus, y lo convierte en un posible candidato para el tratamiento de la enfermedad
- El extracto Curmeric induce la expresión de varios genes del metabolismo lipídico como PPAR y OSBPL10 lo que puede contribuir a su efecto antiviral e inmunomodulatorio indirecto.
- El extracto Curmeric regula la expresión de diversos marcadores inmunológicos como RIG-1, IL-6, MIP-1 e IL-10 en una línea de monocitos humanos, lo cual sugiere un efecto inmunomodulador asociado.
- El extracto Curmeric no regula el estado redox *in vitro* a las concentraciones y condiciones utilizadas en este trabajo.

Recomendaciones

- Expandir los estudios de actividad antiviral del Curmeric al DENV-1, DENV-3 y DENV-4.
- Identificar los mecanismos moleculares involucrados en el efecto del Curmeric sobre los niveles de expresión de IL-6 y MIP1 en monocitos humanos en el contexto de la infección por virus dengue.
- Determinar los mecanismos moleculares involucrados en el efecto del Curmeric sobre el metabolismo lipídico y su influencia sobre la replicación del virus del dengue.
- Explorar los efectos del Curmeric sobre la infección por dengue en cultivo de células mononucleares humanas y en ensayo clínico in vivo.

Referencias Bibliográficas

1. Gubler DJ. The global pandemic of dengue/dengue haemorrhagic fever: current status and prospects for the future. *Ann Acad Med Singapore*. 1998;27(2):227-34.
2. OMS. Dengue Situation Updates 2021. Manila: WHO Regional Office for the Western Pacific; 2021.
3. Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB. Dengue infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16055.
4. Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res*. 2002;33(4):330-42.
5. Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis*. 2002;2(1):33-42.
6. Saavedra Ramírez PG, Vásquez Duque GM, González Naranjo LA. Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico. *Iatreia*. 2011;24(2):157-66.
7. Organization WH, Research SPf, Diseases TiT, Diseases WHODOCoNT, Epidemic WHO, Alert P. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: World Health Organization; 2009.
8. Lim SP, Wang QY, Noble CG, Chen YL, Dong H, Zou B, et al. Ten years of dengue drug discovery: progress and prospects. *Antiviral Res*. 2013;100(2):500-19.
9. Tomlinson SM, Malmstrom RD, Watowich SJ. New approaches to structure-based discovery of dengue protease inhibitors. *Infectious disorders drug targets*. 2009;9(3):327-43.
10. Phillipson JD. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*. 2001;56(3):237-43.
11. Butler MS. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of natural products*. 2004;67(12):2141-53.
12. Cordell GA, Colvard MD. Natural products and traditional medicine: turning on a paradigm. *Journal of natural products*. 2012;75(3):514-25.
13. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*. 2012;75(3):311-35.
14. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products*. 2007;70(3):461-77.
15. Teixeira RR, Pereira WL, Oliveira AF, da Silva AM, de Oliveira AS, da Silva ML, et al. Natural products as source of potential dengue antivirals. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2014;19(6):8151-76.
16. Noorafshan A, Ashkani-Esfahani S. A review of therapeutic effects of curcumin. *Current pharmaceutical design*. 2013;19(11):2032-46.
17. Kocaadam B, Sanlier N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2017;57(13):2889-95.
18. Kunnumakkara AB, Bordoloi D, Padmavathi G, Monisha J, Roy NK, Prasad S, et al. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *British journal of pharmacology*. 2017;174(11):1325-48.
19. Qin Y, Lin L, Chen Y, Wu S, Si X, Wu H, et al. Curcumin inhibits the replication of enterovirus 71 in vitro. *Acta Pharm Sin B*. 2014;4(4):284-94.
20. Praditya D, Kirchhoff L, Bruning J, Rachmawati H, Steinmann J, Steinmann E. Anti-infective Properties of the Golden Spice Curcumin. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:912.
21. González TV, Martínez MO, Manso SF, Herreiz AKG, Hernández EA, Cortés RG, et al. Desarrollo y caracterización de un nutraceutico de *Cúrcuma longa* cosechada en Cuba.
22. Gonzales TV. Safety and efficacy study of the natural product Curmeric in a quarantined community of primary care due to possible cases of COVID-19. 2022.

23. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* (New York, NY). 1988;239(4839):476-81.
24. Guzman M, Kouri G, Diaz M, Llop A, Vazquez S, Gonzalez D, et al. Dengue, one of the great emerging health challenges of the 21st century. *Expert Rev Vaccines*. 2004;3(5):511-20.
25. Hosseini S, Oliva-Ramirez J, Vazquez-Villegas P, Rodriguez-Garcia A, Munoz-Soto RB, Aghamohammadi N, et al. Dengue Fever: A Worldwide Threat An Overview of the Infection Process, Environmental Factors for a Global Outbreak, Diagnostic Platforms and Vaccine Developments. *Current topics in medicinal chemistry*. 2018;18(18):1531-49.
26. OMS. Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020. 2012.
27. Contreras M, Guillén AV, Rincón MA, Moreira R, Callejas DJQRdCdIS. Aspectos genéticos del virus del dengue. 2021;5(2):79-88.
28. Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet*. 2015;385(9966):453-65.
29. Cantelar de Francisco N, Fernandez A, Molina AJRcdmt. Survey of dengue in Cuba. 1978-1979. 1981;33(1):72-8.
30. Kouri GP, Más Lago P, Guzmán MG, Soler M, Goyenechea A, Morier LJBOTPAHO, et al. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: rapid diagnosis of the etiologic agent. 1983.
31. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987;81(5):821-3.
32. Kourí G, Guzmán MG, Valdés L, Carbonel I, del Rosario D, Vazquez S, et al. Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. 1998;4(1):89.
33. Peláez O, Guzmán MG, Kourí G, Pérez R, San Martín JL, Vázquez S, et al. Dengue 3 epidemic, Havana, 2001. 2004;10(4):719.
34. Laredo-Tiscareño SV, Guo X, Bocanegra-García VJC. Virus del Dengue: estructura de serotipos y epidemiología molecular. 2012;6(3):27-33.
35. López Santiso P, Robaina Castillo JI, Hernández García F, Santiso Ramos M. Comportamiento clínico-epidemiológico del dengue en Cuba. Una actualización necesaria. 2017. 2017;13(1):21 %J Universidad Médica Pinareña.
36. Tamayo Escobar OE, García Olivera TM, Escobar Yénder NV, González Rubio D, Castro Peraza OJM. La reemergencia del dengue: un gran desafío para el sistema sanitario latinoamericano y caribeño en pleno siglo XXI. 2019;23(2):308-24.
37. Base de Datos Laboratorio Nacional de Referencia de Arbovirus I. Resultados de la Vigilancia Molecular de Dengue. 2022.
38. Arias CF, Preugschat F, Strauss JHJV. Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. 1993;193(2):888-99.
39. Zonetti LFC, Coutinho MC, de Araujo AS. Molecular Aspects of the Dengue Virus Infection Process: A Review. *Protein Pept Lett*. 2018;25(8):712-9.
40. Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res*. 2003;59:23-61.
41. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 2002;108(5):717-25.
42. Mairuhu AT, Wagenaar J, Brandjes DP, van Gorp EC. Dengue: an arthropod-borne disease of global importance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23(6):425-33.
43. Junjhon J, Edwards TJ, Utaipat U, Bowman VD, Holdaway HA, Zhang W, et al. Influence of pr-M cleavage on the heterogeneity of extracellular dengue virus particles. *J Virol*. 2010;84(16):8353-8.
44. Diamond MS, Pierson TC. Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. *Cell*. 2015;162(3):488-92.
45. Apte-Sengupta S, Sirohi D, Kuhn RJ. Coupling of replication and assembly in flaviviruses. *Current opinion in virology*. 2014;9:134-42.

46. Cruz-Oliveira C, Freire JM, Conceição TM, Higa LM, Castanho MA, Da Poian ATJFmr. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. 2015;39(2):155-70.
47. Bartenschlager RyM, Sven. Molecular aspects of Dengue virus replication. 2008.
48. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P, et al. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell host & microbe*. 2009;5(4):365-75.
49. Kiermayr S, Kofler RM, Mandl CW, Messner P, Heinz FX. Isolation of capsid protein dimers from the tick-borne encephalitis flavivirus and in vitro assembly of capsid-like particles. *J Virol*. 2004;78(15):8078-84.
50. Li D-s, Liu W, Guigon A, Mostyn C, Grant R, Aaskov JJEid. Rapid displacement of dengue virus type 1 by type 4, Pacific region, 2007–2009. 2010;16(1):123.
51. Melo C, Delafiori J, Dabaja MZ, de Oliveira DN, Guerreiro TM, Colombo TE, et al. The role of lipids in the inception, maintenance and complications of dengue virus infection. *Scientific reports*. 2018;8(1):11826.
52. Strating JRPM, van Kuppeveld FJM. Viral rewiring of cellular lipid metabolism to create membranous replication compartments. *Current opinion in cell biology*. 2017;47:24-33.
53. Yu I-M, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, et al. Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. 2008;319(5871):1834-7.
54. Chotiwan N, Andre BG, Sanchez-Vargas I, Islam MN, Grabowski JM, Hopf-Jannasch A, et al. Dynamic remodeling of lipids coincides with dengue virus replication in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS Pathog*. 2018;14(2):e1006853.
55. Leier HC, Messer WB, Tafesse FGJpp. Lipids and pathogenic flaviviruses: An intimate union. 2018;14(5):e1006952.
56. Cambi A, de Lange F, van Maarseveen NM, Nijhuis M, Joosten B, van Dijk EMHP, et al. Microdomains of the C-type lectin DC-SIGN are portals for virus entry into dendritic cells. *Journal of Cell Biology*. 2004;164(1):145-55.
57. Puerta-Guardo H, Mosso C, Medina F, Liprandi F, Ludert JE, del Angel RMJJoGV. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in U937 cells requires cholesterol-rich membrane microdomains. 2010;91(2):394-403.
58. Acosta EG, Kumar A, Bartenschlager R. Chapter One - Revisiting Dengue Virus–Host Cell Interaction: New Insights into Molecular and Cellular Virology. In: Maramorosch K, Murphy FA, editors. *Advances in Virus Research*. 88: Academic Press; 2014. p. 1-109.
59. Barrientos-Arenas E, Henao-García V, Giraldo DM, Cardona MM, Urcuqui-Inchima S, Castaño JC, et al. Modulación de los niveles de lipoproteínas de alta densidad y las citoquinas IL-1 β e IL-6 en pacientes con dengue. 2018;35:15-24.
60. Whitehorn J, Simmons CP. The pathogenesis of dengue. *Vaccine*. 2011;29(42):7221-8.
61. Gupta S, Agarwal A, Biswas D. Host Genetic Polymorphisms Influencing Susceptibility to Dengue. *DNA and cell biology*. 2018;37(10):805-7.
62. Navarro-Sanchez E, Despres P, Cedillo-Barron L. Innate immune responses to dengue virus. *Archives of medical research*. 2005;36(5):425-35.
63. John ALS, Rathore AP. Adaptive immune responses to primary and secondary dengue virus infections. *Nature Reviews Immunology*. 2019;19(4):218-30.
64. Shresta S, Kyle JL, Robert Beatty P, Harris E. Early activation of natural killer and B cells in response to primary dengue virus infection in A/J mice. *Virology*. 2004;319(2):262-73.
65. Makhluif H, Shresta S. Innate antiviral immunity against dengue virus. *Critical Reviews™ in Immunology*. 2015;35(3).
66. Uno N, Ross TM. Dengue virus and the host innate immune response. *Emerging Microbes & Infections*. 2018;7(1):1-11.

67. King CA, Wegman AD, Endy TP. Mobilization and activation of the innate immune response to dengue virus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020;10.
68. Wahala WM, De Silva AM. The human antibody response to dengue virus infection. *Viruses*. 2011;3(12):2374-95.
69. Garcia G, Arango M, Perez AB, Fonte L, Sierra B, Rodriguez-Roche R, et al. Antibodies from patients with dengue viral infection mediate cellular cytotoxicity. *J Clin Virol*. 2006;37(1):53-7.
70. Laoprasopwattana K, Libraty DH, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Ennis FA, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by plasma obtained before secondary dengue virus infections: Potential involvement in early control of viral replication. *The Journal of infectious diseases*. 2007;195(8):1108-16.
71. Mathew A, Kurane I, Rothman AL, Zeng LL, Brinton MA, Ennis FA. Dominant recognition by human CD8+ cytotoxic T lymphocytes of dengue virus nonstructural proteins NS3 and NS1.2a. *The Journal of clinical investigation*. 1996;98(7):1684-91.
72. Simon-Lorière E, Duong V, Tawfik A, Ung S, Ly S, Casadémont I, et al. Increased adaptive immune responses and proper feedback regulation protect against clinical dengue. *Science translational medicine*. 2017;9(405).
73. Nikin-Beers R, Ciupe SM. Modelling original antigenic sin in dengue viral infection. *Mathematical medicine and biology: a journal of the IMA*. 2018;35(2):257-72.
74. Silva ML, Martins MA, Espírito-Santo LR, Campi-Azevedo AC, Silveira-Lemos D, Ribeiro JGL, et al. Characterization of main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults. *Vaccine*. 2011;29(3):583-92.
75. Green S, Kurane I, Edelman R, Tacket CO, Eckels KH, Vaughn DW, et al. Dengue virus-specific human CD4+ T-lymphocyte responses in a recipient of an experimental live-attenuated dengue virus type 1 vaccine: bulk culture proliferation, clonal analysis, and precursor frequency determination. *Journal of virology*. 1993;67(10):5962-7.
76. Tian Y, Grifoni A, Sette A, Weiskopf D. Human T cell response to dengue virus infection. *Frontiers in immunology*. 2019;10:2125.
77. Myint KS, Endy TP, Mongkolsirichaikul D, Manomuth C, Kalayanaroj S, Vaughn DW, et al. Cellular immune activation in children with acute dengue virus infections is modulated by apoptosis. *The Journal of infectious diseases*. 2006;194(5):600-7.
78. Suksanpaisan L, Cabrera-Hernandez A, Smith DR. Infection of human primary hepatocytes with dengue virus serotype 2. *J Med Virol*. 2007;79(3):300-7.
79. Courageot MP, Catteau A, Despres P. Mechanisms of dengue virus-induced cell death. *Advances in virus research*. 2003;60:157-86.
80. Catteau A, Kalinina O, Wagner MC, Deubel V, Courageot MP, Despres P. Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM. *The Journal of general virology*. 2003;84(Pt 10):2781-93.
81. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nature medicine*. 2003;9(7):921-7.
82. Detrick B, Nagineni C, Hook J. Cytokines: regulators of immune responses and key therapeutic targets. CRC Press. Taylor & Francis Group, New York, NY, USA; 2008.
83. Kany S, Vollrath JT, Relja B. Cytokines in inflammatory disease. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(23):6008.
84. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 2000;118(2):503-8.
85. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*. 2000;117(4):1162-72.
86. Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:571-611.

87. Billiau A, Matthys P. Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20(2):97-113.
88. Hobart M, Ramassar V, Goes N, Urmson J, Halloran PF. IFN regulatory factor-1 plays a central role in the regulation of the expression of class I and II MHC genes in vivo. *J Immunol.* 1997;158(9):4260-9.
89. Seliger B, Ruiz-Cabello F, Garrido F. IFN inducibility of major histocompatibility antigens in tumors. *Adv Cancer Res.* 2008;101:249-76.
90. Von Herrath M CB, Oldstone M. Low affinity lymphocytes require IFN-gamma to clear an acute viral infection. *Virology.* 1997;229:349-.
91. Eales LJ. The adaptive immune response In: Ltd JWS, editor. *Immunology for Life Scientists.* Guildford, UK2003
92. Oppenheim JJ, Ruscetti FW. Citocinas. In: Stites D.P. TAI, Parslow T.G, editor. *Inmunología Básica y Clínica. Capítulo 10.* DF, Mexico: Ed. El Manual Moderno; 1998. p. 165-92.
93. Vassali P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol.* 1992;10:411-52.
94. Dinarello CA. Cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. In: Rietschel ET, Wagner TH, editors. *Pathology of the Septic Shock.* Heidelberg, Germany: Springer-Verlag 1996. p. 134-65.
95. Egle A, Sinha B, Hartmann G, Endres S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol Today* 1997;18:487.
96. Aggarwal BB. Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-B. *Ann Rheum Dis.* 2000;59(Suppl. 1):i6.
97. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:745-56.
98. Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, Takada Y, Aggarwal BB. Redox regulation of apoptosis by members of the TNF superfamily. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7:482-96.
99. Taylor AW. Review of the activation of TGF-beta in immunity *J Leukoc Biol.* 2009;85(1):29-33.
100. Ebert EC. Inhibitory effects of transforming growth factor-beta (TGF-beta) on certain functions of intraepithelial lymphocytes. *Clin Exp Immunol.* 1999;115(3):415-20.
101. Pennison M, Pasche B. Targeting transforming growth factor- β signaling. *Curr Opin Oncol* 2007;19(6):579-85.
102. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:753-91.
103. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. . *Annu Rev Immunol.* 1998;16:137-61.
104. Yisong YW, Flavell RA. Regulatory T Cells, Transforming Growth Factor- β , and Immune Suppression. *Proc Am Thorac Soc.* 2007;4(3):271-6.
105. Li MO, Wan YY, Flavell RA. T Cell-Produced Transforming Growth Factor-b1 Controls T Cell Tolerance and Regulates Th1- and Th17-Cell Differentiation. *Immunity* 2007;26:579-91.
106. Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VFI, Berneman ZN. Regulatory T Cells and Human Disease. *Clin Dev Immunol.* 2007;2007:89195.
107. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:99-146.
108. Wei CC, Hsu YH, Li HH, Wang YC, Hsieh MY, Chen WY, et al. IL-20: biological functions and clinical implications. *J Biomed Sci.* 2006;13(5):601-12.
109. Sabat R. IL-10 family of cytokines. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2010;21 315-24.

110. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol.* 2008;180(9):5771-7.
111. O'Garra A, Vieira PL, Vieira P, Goldfeld AE. IL-10-producing and naturally occurring CD4⁺ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest* 2004;114:1372-78.
112. Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, Ye X, et al. Regulatory T Cell-Derived Interleukin-10 Limits Inflammation at Environmental Interfaces
Immunity 2008;28:546-58.
113. Raja SM, Metkar SS, Froelich CJ. Cytotoxic granule-mediated apoptosis: unraveling the complex mechanism. *Curr Opin Immunol.* 2003;15(5):528-32.
114. Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(5):361-70.
115. van den Broek ME, Kagi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz WK, et al. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med.* 1996;184(5):1781-90.
116. Kagi D, Ledermann B, Bürki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, et al. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature.* 1994;369(6475):31-7.
117. Brown GR, McGuire MJ, Thiele DL. Dipeptidyl peptidase I is enriched in granules of in vitro- and in vivo-activated cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol.* 1993;150(11):4733-42.
118. Sattar R, Ali SA, Abbasi A. Bioinformatics of granzymes: sequence comparison and structural studies on granzyme family by homology modeling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;308(4):726-35.
119. Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Bürki K, Depraetere V, Nagata S, et al. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science.* 1994;265(5171):528-30.
120. Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature.* 1994;370(6491):650-2.
121. Ju ST, Cui H, Panka DJ, Ettinger R, Marshak-Rothstein A. Participation of target Fas protein in apoptosis pathway induced by CD4⁺ Th1 and CD8⁺ cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91(10):4185-9.
122. Ware CF. The TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(3-4):181-4.
123. Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol.* 2007;19(5):488-96.
124. Chen YB, Fannjiang Y, Hardwick JM. Cell Death in Viral Infections. In: Lockshin RA, Zakeri Z, editors. *When Cells Die II: A Comprehensive Evaluation of Apoptosis and Programmed Cell Death.* New York: Wiley-Liss; 2004. p. 435-60.
125. Salazar-Mather TP, Hokeness KL. Cytokine and chemokine networks: pathways to antiviral defense. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;303:29-46.
126. Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science.* 2012;122:143-59.
127. Leonard EJ, Yoshimura T. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today* 1990;11:97-101.
128. Stamatovic SM, Keep RF, Kunkel SL, Andjelkovic AV. Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction
'opening': signaling via Rho and Rho kinase. *J Cell Sci.* 2003;116:4615-28.
129. Yamada M, Kim S, Egashira K, Takeya M, Ikeda T, Mimura O, et al. Molecular mechanism and role of endothelial
monocyte chemoattractant protein-1 induction by vascular endothelial

growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1996-2001.

130. Fahey TJ, Tracey KJ, Tekamp-Olson P, Cousens LS, Jones WG, Shires GT, et al. Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function. *J Immunol* 1992;148:2764-9.

131. Chen YC, Wang SY. Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide. *J Virol.* 2002;76(19):9877-87.

132. Moreno-Altamirano MM, Romano M, Legorreta-Herrera M, Sanchez-Garcia FJ, Colston MJ. Gene expression in human macrophages infected with dengue virus serotype-2. *Scand J Immunol.* 2004;60(6):631-8.

133. Lin CF, Chiu SC, Hsiao YL, Wan SW, Lei HY, Shiau AL, et al. Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. *J Immunol.* 2005;174(1):395-403.

134. Vitarana T, de Silva H, Withana N, Gunasekera C. Elevated tumour necrosis factor in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Ceylon Med J.* 1991;36(2):63-5.

135. Nguyen TH, Lei HY, Nguyen TL, Lin YS, Huang KJ, Le BL, et al. Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. *J Infect Dis.* 2004;189(2):221-32.

136. Yang KD, Yeh WT, Yang MY, Chen RF, Shaio MF. Antibody-dependent enhancement of heterotypic dengue infections involved in suppression of IFN γ production. *J Med Virol.* 2001;63(2):150-7.

137. Talavera D, Castillo AM, Dominguez MC, Gutierrez AE, Meza I. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *J Gen Virol.* 2004;85(Pt 7):1801-13.

138. Spain Santana TA, Marglin S, Ennis FA, Rothman AL. MIP-1 α and MIP-1 β induction by dengue virus. *J Med Virol.* 2001;65(2):324-30.

139. Lin YL, Liu CC, Chuang JI, Lei HY, Yeh TM, Lin YS, et al. Involvement of oxidative stress, NF-IL-6, and RANTES expression in dengue-2-virus-infected human liver cells. *Virology.* 2000;276(1):114-26.

140. Scala E, G. D'Offizi, R. Rosso, O. Turriziani, R. Ferrara, A.M. Mazzone, G. Antonelli, F. Aiuti, and R. Paganelli. C-C chemokines, IL-16, and soluble antiviral factor activity are increased in cloned T cells from subjects with long-term nonprogressive HIV infection. *J Immunol.* 1997;158:4485-92.

141. King CA, Anderson R, Marshall JS. Dengue virus selectively induces human mast cell chemokine production. *J Virol.* 2002;76(16):8408-19.

142. Neville LF, Mathiak G, Bagasra O. The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kD (IP-10): A novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 1997;8(3):207-19.

143. Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, Jones SA, Piali L, Clark-Lewis I, et al. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med.* 1996;184:963-9

144. Lahrtz F, Piali L, Nadal D, Pfister HW, Spanaus KS, Baggiolini M, et al. Chemotactic activity on mononuclear cells in the cerebrospinal fluid of patients with viral meningitis is mediated by interferon- γ inducible protein-10 and monocyte chemotactic protein-1. *Eur J Immunol.* 1997;27:2484-9.

145. Christine A. King RA, and Jean S. Marshall. Dengue Virus Selectively Induces Human Mast Cell Chemokine Production. *Journal of Virology.* 2002; Vol. 76(16): 8408-19.

146. Furie M, Randolph GJ. Chemokines and tissue injury. *Am J Pathol.* 1995;146:1287-301.

147. Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature.* 1990;347:669-71.

148. Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J Immunol.* 1998;161(11):6338-46.
149. Perez AB, Garcia G, Sierra B, Alvarez M, Vazquez S, Cabrera MV, et al. IL-10 levels in Dengue patients: some findings from the exceptional epidemiological conditions in Cuba. *J Med Virol.* 2004;73(2):230-4.
150. Huang YH, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Liu CC, Yeh TM. Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;63(1-2):71-5.
151. Bosch I, Xhaja K, Estevez L, Raines G, Melichar H, Warke RV, et al. Increased production of interleukin-8 in primary human monocytes and in human epithelial and endothelial cell lines after dengue virus challenge. *J Virol.* 2002;76(11):5588-97.
152. Huerta-Zepeda A, Cabello-Gutierrez C, Cime-Castillo J, Monroy-Martinez V, Manjarrez-Zavala ME, Gutierrez-Rodriguez M, et al. Crosstalk between coagulation and inflammation during Dengue virus infection. *Thromb Haemost.* 2008;99(5):936-43.
153. Sharma R, Lall N, Kishore N. Role of Protein Interleukin 8 (IL-8) in Human Life. In: Kumar D, R. Kundapur R, editors. *Biomedical Applications of Natural Proteins: An Emerging Era in Biomedical Sciences.* New Delhi: Springer India; 2015. p. 89-100.
154. Singh A, Bisht P, Bhattacharya S, Guchhait P. Role of Platelet Cytokines in Dengue Virus Infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology.* 2020;10:561366.
155. Juffrie M, Meer GM, Hack CE, Haasnoot K, Sutaryo, Veerman AJ, et al. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65(1):70-5.
156. OMS. W. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control: Organización Mundial de la Salud; 1997.
157. OMS. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. OMS Ginebra; 2013.
158. Muller DA, Depelsenaire AC, Young PR. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. *The Journal of infectious diseases.* 2017;215(suppl_2):S89-s95.
159. König R, Stertz S, Zhou Y, Inoue A, Hoffmann H-H, Bhattacharyya S, et al. Human host factors required for influenza virus replication. 2010;463(7282):813-7.
160. Amatore D, Sgarbanti R, Aquilano K, Baldelli S, Limongi D, Civitelli L, et al. Influenza virus replication in lung epithelial cells depends on redox-sensitive pathways activated by NOX4-derived ROS. 2015;17(1):131-45.
161. To EE, Vlahos R, Luong R, Halls ML, Reading PC, King PT, et al. Endosomal NOX2 oxidase exacerbates virus pathogenicity and is a target for antiviral therapy. 2017;8(1):69.
162. To E, Broughton BR, Hendricks KS, Vlahos R, Selemidis SJFr. Influenza A virus and TLR7 activation potentiate NOX2 oxidase-dependent ROS production in macrophages. 2014;48(8):940-7.
163. Fink K, Duval A, Martel A, Soucy-Faulkner A, Grandvaux NJTJol. Dual role of NOX2 in respiratory syncytial virus-and sendai virus-induced activation of NF- κ B in airway epithelial cells. 2008;180(10):6911-22.
164. Nencioni L, De Chiara G, Sgarbanti R, Amatore D, Aquilano K, Marcocci ME, et al. Bcl-2 expression and p38MAPK activity in cells infected with influenza A virus. 2009;284(23):16004-15.
165. Simmons CP, Farrar JJ, van Vinh Chau N, Wills BJNEJoM. Dengue. 2012;366(15):1423-32.
166. Maves RC, Oré RMC, Porter KR, Kochel TJJV. Immunogenicity and protective efficacy of a psoralen-inactivated dengue-1 virus vaccine candidate in Aotus nancymae monkeys. 2011;29(15):2691-6.
167. Low JG, Gatsinga R, Vasudevan SG, Sampath A. Dengue Antiviral Development: A Continuing Journey. *Advances in experimental medicine and biology.* 2018;1062:319-32.

168. Lee MF, Wu YS, Poh CL. Molecular Mechanisms of Antiviral Agents against Dengue Virus. *Viruses*. 2023;15(3).
169. Norshidah H, Vignesh R, Lai NS. Updates on Dengue Vaccine and Antiviral: Where Are We Heading? *Molecules* (Basel, Switzerland). 2021;26(22).
170. Riwu AG, Nugraha J, Purwanto DA, Triyono EA. In silico anti-dengue *Sterculia quadrifida* stem bark compounds.
171. Newman DJ, Cragg GMJJonp. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. 2020;83(3):770-803.
172. Marinov R, Markova N, Krumova S, Yotovska K, Zaharieva MM, Genova-Kalou PJP. Antiviral properties of chalcones and their synthetic derivatives: a mini review. 2020;67(4):325-37.
173. Abd Kadir SL, Yaakob H, Mohamed Zulkifli R. Potential anti-dengue medicinal plants: a review. *J Nat Med*. 2013;67(4):677-89.
174. Paraiso IL, Revel JS, Stevens JF. Potential use of polyphenols in the battle against COVID-19. *Curr Opin Food Sci*. 2020;32:149-55.
175. Montenegro-Landívar MF, Tapia-Quirós P, Vecino X, Reig M, Valderrama C, Granados M, et al. Polyphenols and their potential role to fight viral diseases: An overview. 2021;801:149719.
176. Kamboj A, Saluja AK, Kumar M, Atri PJPR. Antiviral activity of plant polyphenols. 2012;5(5):2402-12.
177. Daglia MJCoib. Polyphenols as antimicrobial agents. 2012;23(2):174-81.
178. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci*. 2016;5:e47.
179. Badshah SL, Faisal S, Muhammad A, Poulson BG, Emwas AH, Jaremko M. Antiviral activities of flavonoids. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2021;140:111596.
180. Ninfali P, Antonelli A, Magnani M, Scarpa ES. Antiviral Properties of Flavonoids and Delivery Strategies. *Nutrients*. 2020;12(9):2534.
181. Kaul TN, Middleton E, Jr., Ogra PL. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *J Med Virol*. 1985;15(1):71-9.
182. Sanchez I, Gomez-Garibay F, Taboada J, Ruiz BH. Antiviral effect of flavonoids on the dengue virus. *Phytother Res*. 2000;14(2):89-92.
183. Ul Qamar MT, Mumtaz A, Naseem R, Ali A, Fatima T, Jabbar T, et al. Molecular docking based screening of plant flavonoids as dengue NS1 inhibitors. 2014;10(7):460.
184. Pérez-Urria Carril EJRSB. *Cúrcuma I (Cúrcuma longa L.)*. 2014;7(2):84-99.
185. Horna Saldaña JP, Loyola Carranza SI, Murillo Valverde DR, Saavedra Meza CE, Chávez Pérez MI. Elaboración y comercialización de barras nutritivas de Curcuma y Moringa. 2019.
186. Mesa M, Ramírez Tortosa MC, Aguilera García CM, Ramírez-Boscá A, Gil Hernández Á. Efectos farmacológicos y nutricionales de los extractos de *Curcuma longa* L. y de los cucuminoides. 2000.
187. Zorofchian Moghadamtousi S, Abdul Kadir H, Hassandarvish P, Tajik H, Abubakar S, Zandi KJBri. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. 2014;2014.
188. Lim L, Dang M, Roy A, Kang J, Song J. Curcumin Allosterically Inhibits the Dengue NS2B-NS3 Protease by Disrupting Its Active Conformation. *ACS Omega*. 2020;5(40):25677-86.
189. Si X, Wang Y, Wong J, Zhang J, McManus BM, Luo H. Dysregulation of the ubiquitin-proteasome system by curcumin suppresses coxsackievirus B3 replication. *J Virol*. 2007;81(7):3142-50.
190. Padilla SL, Rodriguez A, Gonzales MM, Gallego GJ, Castano OJ. Inhibitory effects of curcumin on dengue virus type 2-infected cells in vitro. *Arch Virol*. 2014;159(3):573-9.

191. Nabila N, Suada NK, Denis D, Yohan B, Adi AC, Veterini AS, et al. Antiviral Action of Curcumin Encapsulated in Nanoemulsion against Four Serotypes of Dengue Virus. *Pharm Nanotechnol.* 2020;8(1):54-62.
192. Valdés-González T, Infante-Burzac J, Arteche-García JPPIJ. Preclinical evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, cytotoxic and lipid-lowering properties of a nutraceutical from *Curcuma longa* cultivated in Cuba. 2019;7(6):319-25.
193. Zingg JM, Hasan ST, Meydani M. Molecular mechanisms of hypolipidemic effects of curcumin. *Biofactors.* 2013;39(1):101-21.
194. Shang W, Zhao LJ, Dong XL, Zhao ZM, Li J, Zhang BB, et al. Curcumin inhibits osteoclastogenic potential in PBMCs from rheumatoid arthritis patients via the suppression of MAPK/RANK/c-Fos/NFATc1 signaling pathways. *Mol Med Rep.* 2016;14(4):3620-6.
195. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm.* 2007;4(6):807-18.
196. Tabanelli R, Brogi S, Calderone VJP. Improving curcumin bioavailability: Current strategies and future perspectives. 2021;13(10):1715.
197. Clapé Laffita O, Alfonso Castillo AJM. Avances en la caracterización farmacotóxica de la planta medicinal *Curcuma longa* Linn. 2012;16(1):97-114.
198. Maury GL, Rodriguez DM, Hendrix S, Arranz JCE, Boix YF, Pacheco AO, et al. Antioxidants in Plants: A Valorization Potential Emphasizing the Need for the Conservation of Plant Biodiversity in Cuba. *Antioxidants (Basel, Switzerland).* 2020;9(11):1048.
199. Nasri H, Baradaran A, Shirzad H, Rafieian-Kopaei MJ. New concepts in nutraceuticals as alternative for pharmaceuticals. 2014;5(12):1487.
200. Morens DM, Halstead SB, Repik PM, Putvatana R, Raybourne N. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *Journal of clinical microbiology.* 1985;22(2):250-4.
201. Santiago GA, Vergne E, Quiles Y, Cosme J, Vazquez J, Medina JF, et al. Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. *PLoS neglected tropical diseases.* 2013;7(7):e2311.
202. Abdalla AO, Kiai S, Hansson L, Rossmann ED, Jeddi-Tehrani M, Shokri F, et al. Kinetics of cytokine gene expression in human CD4+ and CD8+ T-lymphocyte subsets using quantitative realtime PCR. *Scandinavian journal of immunology.* 2003;58, :601-6.
203. Kulkarni MA, Duguay C, Ost K. Charting the evidence for climate change impacts on the global spread of malaria and dengue and adaptive responses: a scoping review of reviews. *Global Health.* 2022;18(1):1.
204. Kutluay SB, Doroghazi J, Roemer ME, Triezenberg SJ. Curcumin inhibits herpes simplex virus immediate-early gene expression by a mechanism independent of p300/CBP histone acetyltransferase activity. *Virology.* 2008;373(2):239-47.
205. Narayanan A, Kehn-Hall K, Senina S, Lundberg L, Van Duyne R, Guendel I, et al. Curcumin inhibits Rift Valley fever virus replication in human cells. *J Biol Chem.* 2012;287(40):33198-214.
206. Mounce BC, Cesaro T, Carrau L, Vallet T, Vignuzzi M. Curcumin inhibits Zika and chikungunya virus infection by inhibiting cell binding. *Antiviral Res.* 2017;142:148-57.
207. Hariyanti Hariyanti AY, Kusmardi Kusmardi, Hayun Hayun. Synthesis and in vitro cytotoxic activity of novel indazole analogues of curcumin against MCF-7, HeLa, WiDr, and vero cell lines %J *Journal of Applied Pharmaceutical Science: Issue: 4; 2022.* 179-84 p.
208. Bayomi SM, El-Kashef HA, El-Ashmawy MB, Nasr MNA, El-Sherbeny MA, Badria FA, et al. Synthesis and biological evaluation of new curcumin derivatives as antioxidant and antitumor agents. *Medicinal Chemistry Research.* 2012;22(3):1147-62.

209. Chen TY, Chen DY, Wen HW, Ou JL, Chiou SS, Chen JM, et al. Inhibition of enveloped viruses infectivity by curcumin. *PLoS One*. 2013;8(5):e62482.
210. Kong Y, Ma W, Liu X, Zu Y, Fu Y, Wu N, et al. Cytotoxic activity of curcumin towards CCRF-CEM leukemia cells and its effect on DNA damage. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2009;14(12):5328-38.
211. Ma F, Liu F, Ding L, You M, Yue H, Zhou Y, et al. Anti-inflammatory effects of curcumin are associated with down regulating microRNA-155 in LPS-treated macrophages and mice. *Pharm Biol*. 2017;55(1):1263-73.
212. Shi D, Xu Y, Du X, Chen X, Zhang X, Lou J, et al. Co-treatment of THP-1 cells with naringenin and curcumin induces cell cycle arrest and apoptosis via numerous pathways. *Mol Med Rep*. 2015;12(6):8223-8.
213. Valdés González T, Ochoa Martínez M, Falco Manso S, Garcia Herreiz AK, Almora Hernández E, García Cortés R, et al. Desarrollo y caracterización de un nutracéutico de Cúrcuma longa cosechada en Cuba. 2019. 2019;7(1):15 %J Archivos del Hospital Universitario "General Calixto García";.
214. Balasubramanian A, Pilankatta R, Teramoto T, Sajith AM, Nwulia E, Kulkarni A, et al. Inhibition of dengue virus by curcuminoids. *Antiviral Res*. 2019;162:71-8.
215. Dai J, Gu L, Su Y, Wang Q, Zhao Y, Chen X, et al. Inhibition of curcumin on influenza A virus infection and influenzal pneumonia via oxidative stress, TLR2/4, p38/JNK MAPK and NF-kappaB pathways. *International immunopharmacology*. 2018;54:177-87.
216. Hesari A, Ghasemi F, Salarinia R, Biglari H, Tabar Molla Hassan A, Abdoli V, et al. Effects of curcumin on NF-kappaB, AP-1, and Wnt/beta-catenin signaling pathway in hepatitis B virus infection. *Journal of cellular biochemistry*. 2018;119(10):7898-904.
217. Pommier Y, Johnson AA, Marchand C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(3):236-48.
218. Jaruga E, Sokal A, Chrul S, Bartosz G. Apoptosis-independent alterations in membrane dynamics induced by curcumin. *Experimental cell research*. 1998;245(2):303-12.
219. Bartenschlager R, Miller S. Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future Microbiol*. 2008;3(2):155-65.
220. Bhatt P, Sabeena SP, Varma M, Arunkumar G. Current Understanding of the Pathogenesis of Dengue Virus Infection. *Curr Microbiol*. 2021;78(1):17-32.
221. Chiang LC, Ng LT, Cheng PW, Chiang W, Lin CC. Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2005;32(10):811-6.
222. Zingg JM, Hasan ST, Cowan D, Ricciarelli R, Azzi A, Meydani M. Regulatory effects of curcumin on lipid accumulation in monocytes/macrophages. *Journal of cellular biochemistry*. 2012;113(3):833-40.
223. Farzaei MH, Zobeiri M, Parvizi F, El-Senduny FF, Marmouzi I, Coy-Barrera E, et al. Curcumin in Liver Diseases: A Systematic Review of the Cellular Mechanisms of Oxidative Stress and Clinical Perspective. *Nutrients*. 2018;10(7).
224. Flory S, Mannle R, Frank J. The Inhibitory Activity of Curcumin on P-Glycoprotein and Its Uptake by and Efflux from LS180 Cells Is Not Affected by Its Galenic Formulation. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2021;10(11).
225. Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Current opinion in microbiology*. 2008;11(4):369-77.
226. Heaton NS, Randall G. Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell host & microbe*. 2010;8(5):422-32.

227. Xavier-Carvalho C, Cardoso CC, de Souza Kehdy F, Pacheco AG, Moraes MO. Host genetics and dengue fever. *Infect Genet Evol.* 2017;56:99-110.
228. Nakagawa K, Zingg JM, Kim SH, Thomas MJ, Dolnikowski GG, Azzi A, et al. Differential cellular uptake and metabolism of curcuminoids in monocytes/macrophages: regulatory effects on lipid accumulation. *Br J Nutr.* 2014;112(1):8-14.
229. Thulasi Raman SN, Latreille E, Gao J, Zhang W, Wu J, Russell MS, et al. Dysregulation of Ephrin receptor and PPAR signaling pathways in neural progenitor cells infected by Zika virus. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):2046-60.
230. Duran A, Carrero R, Parra B, Gonzalez A, Delgado L, Mosquera J, et al. Association of lipid profile alterations with severe forms of dengue in humans. *Arch Virol.* 2015;160(7):1687-92.
231. Delerive P, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol.* 2001;169(3):453-9.
232. Rival Y, Beneteau N, Taillandier T, Pezet M, Dupont-Passelaigue E, Patoiseau JF, et al. PPARalpha and PPARdelta activators inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF-kappaB and expression of VCAM-1 in EAhy926 endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 2002;435(2-3):143-51.
233. Grimble RF. Nutritional modulation of immune function. *Proc Nutr Soc.* 2001;60(3):389-97.
234. Gupta RA, Polk DB, Krishna U, Israel DA, Yan F, DuBois RN, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses nuclear factor kappa B-mediated apoptosis induced by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells. *J Biol Chem.* 2001;276(33):31059-66.
235. Hermanowski-Vosatka A, Gerhold D, Mundt SS, Loving VA, Lu M, Chen Y, et al. PPARalpha agonists reduce 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;279(2):330-6.
236. De S, Mamidi P, Ghosh S, Keshry SS, Mahish C, Pani SS, et al. Telmisartan Restricts Chikungunya Virus Infection In Vitro and In Vivo through the AT1/PPAR-gamma/MAPKs Pathways. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2022;66(1):e0148921.
237. Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, et al. International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors. *Pharmacological reviews.* 2006;58(4):712-25.
238. Allenby G, Bocquel MT, Saunders M, Kazmer S, Speck J, Rosenberger M, et al. Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1993;90(1):30-4.
239. Wang X, Zhang Q, Zhou Z, Liu M, Chen Y, Li J, et al. Retinoic acid receptor β , a potential therapeutic target in the inhibition of adenovirus replication. *Antiviral research.* 2018;152:84-93.
240. Li B, Wang Y, Shen F, Wu M, Li Y, Fang Z, et al. Identification of Retinoic Acid Receptor Agonists as Potent Hepatitis B Virus Inhibitors via a Drug Repurposing Screen. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2018;62(12).
241. Zhou M, Fan C, Tian N. Effects of curcumin on the gene expression profile of L-02 cells. *Biomedical reports.* 2015;3(4):519-26.
242. Goto A, Charman M, Ridgway ND. Oxysterol-binding Protein Activation at Endoplasmic Reticulum-Golgi Contact Sites Reorganizes Phosphatidylinositol 4-Phosphate Pools. *J Biol Chem.* 2016 291(3):1336-47.
243. Amako Y, Sarkeshik A, Hotta H, Yates J, 3rd, Siddiqui A. Role of oxysterol binding protein in hepatitis C virus infection. *J Virol.* 2009;83(18):9237-46.
244. Arita M, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Wakita T, Shimizu H. Oxysterol-binding protein family I is the target of minor enviroxime-like compounds. *J Virol.* 2013;87(8):4252-60.
245. Meutiawati F, Bezemer B, Strating J, Overheul GJ, Zusinaite E, van Kuppeveld FJM, et al. Posaconazole inhibits dengue virus replication by targeting oxysterol-binding protein. *Antiviral Res.* 2018;157:68-79.

246. Lagace TA, Byers DM, Cook HW, Ridgway ND. Altered regulation of cholesterol and cholesteryl ester synthesis in Chinese-hamster ovary cells overexpressing the oxysterol-binding protein is dependent on the pleckstrin homology domain. *The Biochemical journal*. 1997;326 (Pt 1)(Pt 1):205-13.
247. Perttola J, Merikanto K, Naukkarinen J, Surakka I, Martin NW, Tanhuanpää K, et al. OSBPL10, a novel candidate gene for high triglyceride trait in dyslipidemic Finnish subjects, regulates cellular lipid metabolism. *J Mol Med (Berl)*. 2009;87(8):825-35.
248. Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Gen Virol*. 2008;89(Pt 2):474-84.
249. Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. *Cell Microbiol*. 2009;11(10):1533-49.
250. Mosso C, Galvan-Mendoza IJ, Ludert JE, del Angel RM. Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. *Virology*. 2008;378(1):193-9.
251. Liu SY, Aliyari R, Chikere K, Li G, Marsden MD, Smith JK, et al. Interferon-inducible cholesterol-25-hydroxylase broadly inhibits viral entry by production of 25-hydroxycholesterol. *Immunity*. 2013;38(1):92-105.
252. Zheng J, Sun P, Sun N, Hao Z, Fan K, Yin W, et al. Curcumin inhibits EMCV replication by activating CH25H and inhibiting the formation of ROs. *BMC Vet Res*. 2022;18(1):453.
253. Ryu H, Kim J, Kim D, Lee JE, Chung Y. Cellular and Molecular Links between Autoimmunity and Lipid Metabolism. *Molecules and cells*. 2019;42(11):747-54.
254. Jiang S. Recent progress in immune-metabolism. *Cancer letters*. 2018;421:15-6.
255. Bafirman B, Yulfadinata A, Agus A, Ayubi N. Curcumin: Compound in Turmeric that Has the Potential to Increase Serum Interleukin-10 (IL-10) Levels After High-Intensity Exercise. *Retos*. 2023;52:37-41.
256. Tomita M, Kawakami H, Uchihara JN, Okudaira T, Masuda M, Takasu N, et al. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive active NF- κ B, leading to suppression of cell growth of human T-cell leukemia virus type I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *International journal of cancer*. 2006;118(3):765-72.
257. Hayakari R, Matsumiya T, Xing F, Yoshida H, Hayakari M, Imaizumi T. Critical Role of IRF-3 in the Direct Regulation of dsRNA-Induced Retinoic Acid-Inducible Gene-I (RIG-I) Expression. *PLOS ONE*. 2016;11(9):e0163520.
258. Rehwinkel J, Gack MU. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nature reviews Immunology*. 2020;20(9):537-51.
259. Kell AM, Gale M, Jr. RIG-I in RNA virus recognition. *Virology*. 2015;479-480:110-21.
260. Chazal M, Beauclair G, Gracias S, Najburg V, Simon-Lorière E, Tangy F, et al. RIG-I Recognizes the 5' Region of Dengue and Zika Virus Genomes. *Cell reports*. 2018;24(2):320-8.
261. Onomoto K, Onoguchi K, Yoneyama M. Regulation of RIG-I-like receptor-mediated signaling: interaction between host and viral factors. *Cellular & molecular immunology*. 2021;18(3):539-55.
262. Ti H, Mai Z, Wang Z, Zhang W, Xiao M, Yang Z, et al. Bisabolane-type sesquiterpenoids from *Curcuma longa* L. exert anti-influenza and anti-inflammatory activities through NF- κ B/MAPK and RIG-1/STAT1/2 signaling pathways. *Food & function*. 2021;12(15):6697-711.
263. Wang X, Wang X, Zhang J, Shan Q, Zhu Y, Xu C, et al. Prediction and Verification of Curcumin as a Potential Drug for Inhibition of PDCoV Replication in LLC-PK1 Cells. *Int J Mol Sci*. 2023;24(6).
264. Dejnirattisai W, Duangchinda T, Lin CL, Vasanawathana S, Jones M, Jacobs M, et al. A complex interplay among virus, dendritic cells, T cells, and cytokines in dengue virus infections. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008;181(9):5865-74.

265. Jeremic V, Alempijevic T, Mijatovic S, Sijacki A, Dragasevic S, Pavlovic S, et al. Clinical relevance of IL-6 gene polymorphism in severely injured patients. *Bosnian journal of basic medical sciences*. 2014;14(2):110-7.
266. Jing Q, Wang M. Dengue epidemiology. *Global Health Journal*. 2019;3(2):37-45.
267. Schaefer TJ, Panda PK, Wolford RW. *Dengue Fever*: StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2022 2022.
268. Singla M, Kar M, Sethi T, Kabra SK, Lodha R, Chandele A, et al. Immune response to dengue virus infection in pediatric patients in New Delhi, India—association of viremia, inflammatory mediators and monocytes with disease severity. 2016;10(3):e0004497.
269. Yong YK, Wong WF, Vignesh R, Chattopadhyay I, Velu V, Tan HY, et al. Dengue Infection - Recent Advances in Disease Pathogenesis in the Era of COVID-19. *Front Immunol*. 2022;13:889196.
270. Sciberras JN, Galloway SD, Fenech A, Grech G, Farrugia C, Duca D, et al. The effect of turmeric (Curcumin) supplementation on cytokine and inflammatory marker responses following 2 hours of endurance cycling. *J Int Soc Sports Nutr*. 2015;12(1):5.
271. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2014;6(10):a016295.
272. Ghandadi M, Sahebkar A. Curcumin: An Effective Inhibitor of Interleukin-6. *Current pharmaceutical design*. 2017;23(6):921-31.
273. Derosa G, Maffioli P, Simental-Mendia LE, Bo S, Sahebkar A. Effect of curcumin on circulating interleukin-6 concentrations: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacological research*. 2016;111:394-404.
274. Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2004;36(10):1882-6.
275. Bhavsar I, Miller CS, Al-Sabbagh M. Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha (MIP-1 alpha)/CCL3: As a Biomarker. In: Preedy VR, Patel VB, editors. *General Methods in Biomarker Research and their Applications. Biomarkers in Disease: Methods, Discoveries and Applications*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2015. p. 223-49.
276. Kukita T, Nomiyama H, Ohmoto Y, Kukita A, Shuto T, Hotokebuchi T, et al. Macrophage inflammatory protein-1 alpha (LD78) expressed in human bone marrow: its role in regulation of hematopoiesis and osteoclast recruitment. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1997;76(3):399-406.
277. Domachowske JB, Bonville CA, Dyer KD, Easton AJ, Rosenberg HF. Pulmonary eosinophilia and production of MIP-1alpha are prominent responses to infection with pneumonia virus of mice. *Cell Immunol*. 2000;200(2):98-104.
278. Sierra B, Perez AB, Garcia G, Aguirre E, Alvarez M, Gonzalez D, et al. Role of CC chemokine receptor 1 and two of its ligands in human dengue infection. Three approaches under the Cuban situation. *Microbes and infection*. 2014;16(1):40-50.
279. Sierra B, Perez AB, Vogt K, Garcia G, Schmolke K, Aguirre E, et al. MCP-1 and MIP-1alpha expression in a model resembling early immune response to dengue. *Cytokine*. 2010;52(3):175-83.
280. Liang Z, Xue Y, Wang T, Xie Q, Lin J, Wang Y. Curcumin inhibits the migration of osteoclast precursors and osteoclastogenesis by repressing CCL3 production. *BMC complementary medicine and therapies*. 2020;20(1):234.
281. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annual review of immunology*. 2011;29:71-109.
282. Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1998;160(7):3188-93.
283. Wildbaum G, Netzer N, Karin N. Tr1 cell-dependent active tolerance blunts the pathogenic effects of determinant spreading. *The Journal of Clinical Investigation*. 2002;110(5):701-10.

284. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1991;174(5):1209-20.
285. Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1994;153(2):811-6.
286. van der Poll T, Jansen J, Levi M, ten Cate H, ten Cate JW, van Deventer SJ. Regulation of interleukin 10 release by tumor necrosis factor in humans and chimpanzees. *The Journal of experimental medicine*. 1994;180(5):1985-8.
287. Chai YS, Chen YQ, Lin SH, Xie K, Wang CJ, Yang YZ, et al. Curcumin regulates the differentiation of naive CD4+T cells and activates IL-10 immune modulation against acute lung injury in mice. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2020;125:109946.
288. Porro C, Cianciulli A, Trotta T, Lofrumento DD, Panaro MA. Curcumin Regulates Anti-Inflammatory Responses by JAK/STAT/SOCS Signaling Pathway in BV-2 Microglial Cells. *Biology (Basel)*. 2019;8(3):51.