



**Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”
Departamento de Virología**

Tesis en opción al título de Máster en Virología

**Título: Evaluación de la actividad antiviral de un extracto
alcohólico de propóleos cubano frente al virus dengue 2 en
ratones BALB/c**

Autora: Lic. Yunaixey Bouza Caballero

La Habana 2024



Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”.

Departamento de Virología.

Tesis en opción al título de Máster en Virología.

**Título: Evaluación de la actividad antiviral de un extracto
alcohólico de propóleos cubano frente al virus dengue 2 en
ratones BALB/c.**

Autora: Lic. Yunaixey Bouza Caballero.

Tutoras: Prof. Rosa Ramírez Bartutis, DrC.

Prof. Mayra Muné Jiménez, DrC.

Asesora: Lic. Nankyu Vega Sánchez, MSc.

La Habana 2024

**A MIS FAMILIARES Y AMIGOS QUE ME HAN AYUDADO A REALIZAR MIS
SUEÑOS Y FORMARME MÁS COMO PERSONA**

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la actividad antiviral de un extracto alcohólico de propóleos cubano contra el virus dengue-2 en ratones BALB/c. Se realizó inicialmente un esquema de inmunización para la determinación de la toxicidad del extracto a diferentes concentraciones, vías de inoculación y frecuencias de administración. La actividad antiviral del extracto se determinó mediante la observación de los signos y síntomas de la enfermedad, la supervivencia, el análisis histopatológico de los órganos y la detección viral por el ensayo de RT-PCR en tiempo real. Se observó que, de forma general, el extracto de propóleos no afectó el peso corporal de los ratones a las concentraciones evaluadas. La concentración tóxica media del extracto fue mayor que la concentración límite evaluada en este estudio. El extracto de propóleos indujo una respuesta inmune en los ratones infectados con el virus dengue en comparación con el grupo placebo. La supervivencia y los hallazgos histopatológicos observados en los ratones luego de la infección con el virus dengue 2 y el tratamiento con propóleos, sugiere que el extracto alcohólico de propóleos evaluado pudiera presentar una actividad antiviral e inducir una respuesta inmune contra la infección del virus dengue 2.

LISTADO DE ABREVIATURAS

AAALAC	Asociación Internacional para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio
ABI	Applied Biosystems
Acs IgG	Anticuerpos de inmunoglobulina G
ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
At P	Atelectasia pulmonar focal
BVDV	Virus de la diarrea viral bovina
CAPE	Ester fenilico del ácido cafeico
CENPALAB	Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio
CIAPI	Centro de Investigaciones Apícolas
CK II	Caseína quinasa II
Ct	<i>Threshold Cycle</i>
CT₅₀	Concentración tóxica media
VDEN	Virus dengue
VDEN-1	Virus dengue 1
VDEN-2	Virus dengue 2
VDEN-3	Virus dengue 3
VDEN-4	Virus dengue 4
DH	Dengue Hemorrágico
DICC₅₀	Dosis infectivas cultivos celulares media
DSS	Sulfato de dextrano sódico
DL₅₀	Dosis letal media
EEP	Extractos etanólicos de propóleos
Exp. In	Expansión interfolicular
HCMV	Virus citomegalovirus humano
Hip CK	Hiperplasia de células Kupffer

H. in	Hemorragia interna
H. ext	Hemorragia externa
HRV	Rinovirus humano
HV	Virus de hemaglutininas de Japón
IAV	Virus de la gripe A
IBDV	Virus de la Bursitis Infecciosa en aves
IBDV	Virus de la enfermedad bursal infecciosa
ic	Intracraneal
IFN	Interferón
I.I	Infiltrado inflamatorio
i.m	Intramuscular
IMPDH	Inosina monofosfato deshidrogenasa
IPK	Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí
ip	Intraperitoneal
NDA	Ácido nordihidroguayarético
NaCl	Cloruro de sodio
OMS	Organización Mundial de Salud
ORF	Marco abierto de lectura
OPS	Organización Panamericana de Salud
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
RELDA	Red de Laboratorios para el Diagnóstico de Arbovirus
RN	Restos de necrosis
TLR	Toll-like receptor
VHS-1	Virus herpes simple 1
VDC	Virus del moquillo canino
VEB	Virus eipsten barr
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

VIH Virus de Inmunodeficiencia Adquirida

VSM Virus del sarampión

VSV Virus de la estomatitis vesicular

VZIK Virus zika

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
Objetivo General.....	3
Objetivos específicos	3
I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
I.1. La enfermedad del virus dengue.....	4
I.2. Epidemiología del virus dengue	4
I.3. Respuesta inmune a la infección	6
I.3.1. Inmunidad innata	6
I.3.2. Respuesta mediada por anticuerpos.....	6
I.3.3. Respuesta mediada por células	7
I.4. Desarrollo de vacunas contra el virus dengue.....	7
I.5. Desarrollo de antivirales contra el virus dengue.....	8
I.6. Características del propóleos.....	10
I.7. Propiedades biológicas del propóleos.....	11
I.7.1. Actividad antiviral del propóleos.....	13
I.8. Modelos experimentales para la evaluación de antivirales contra el virus dengue	14
II. MATERIALES Y MÉTODOS	16
II.1. Diseño y tipo de estudio.....	16
II.2. Cepa viral	16
II.3. Cebadores y sondas	16
II.4. Animales de experimentación	16
II.5. Consideraciones éticas en el uso de animales de laboratorio	16
II.6. Propóleos	17
II.6.1. Características Organolépticas del propóleos	18
II.7. Análisis histopatológico.....	18
II.8. Determinación de la toxicidad del extracto alcohólico del propóleos en ratones BALB/c 18	
II.9. Determinación de la actividad antiviral del extracto alcohólico de propóleos en ratones BALB/c	21
II.9.1. Extracción del ARN viral a partir del suero y órganos de los ratones BALB/c infectados	22
II.9.2. Ensayo de RT-PCR en tiempo real	22
II.10. Procesamiento estadístico	23
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25

III.1. Efecto de la concentración, la vía de inculación y la frecuencia de la dosis de administración del extracto alcohólico de propóleos cubano en los ratones BALB/c.....	25
III.2. Actividad anti-virus dengue 2 del extracto alcohólico de propóleos en los ratones BALB/c	31
CONCLUSIONES	36
RECOMENDACIONES	37
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38



INTRODUCCIÓN

El virus dengue (VDEN) es un arbovirus que se conoce en la región de las Américas desde el siglo XVIII (1, 2). Este virus pertenece al género *flavivirus* de la familia *Flaviviridae* (3) y es el agente causal de la enfermedad del dengue, que históricamente se considera una enfermedad típica de países tropicales. El Dengue es una infección viral aguda que se transmite mediante la picadura de la hembra de los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Presenta una gran variedad de manifestaciones clínicas que van desde un cuadro leve (artralgia, mialgia, fiebre, rash, cefalea y vómitos) hasta la gravedad con el desarrollo de hemorragias que pueden causar la muerte de los individuos (4).

Según la Organización Mundial de Salud (OMS), la enfermedad del Dengue se presenta en más de 100 países (5, 6) y se calcula que aproximadamente 390 millones de personas están en riesgo de infección por VDEN (7). En Cuba se produjo una epidemia de Dengue causada por el VDEN-1 (1) en 1977 y fue el primer país de América en que se desarrolló una epidemia de Dengue Hemorrágico (DH), en 1981. En los últimos años han circulado los 4 serotipos del VDEN, por lo que la vigilancia, prevención y control de VDEN revisten especial interés en la salud pública de Cuba.

El tratamiento de la enfermedad es sintomático y no existe un antiviral específico frente a esta infección. En la actualidad se desarrollan investigaciones para la búsqueda de compuestos naturales como posible antivirales frente a la infección de los cuatro serotipos del VDEN (8). El propóleos es un producto natural que presenta actividad antiviral ante una gran variedad de virus patógenos de humanos, animales y plantas (9), efecto que se debe al sinergismo existente entre sus componentes químicos (10).

Existen pocos estudios relacionados con el efecto antiviral del propóleos frente al VDEN. En un ensayo realizado por Soroy y *col.* en 2014, en pacientes con Dengue grave, se demuestra que un extracto de propóleos (Propoelix™) aumenta el número de plaquetas, los niveles de TNF- α y acorta la duración de la hospitalización (11). Un estudio realizado en Cuba en 1997 evalúa la actividad antiviral de un extracto acuoso de propóleos rojo cubano, frente a los virus herpes simple 1 (VHS-1), Influenza A y B, y VDEN-2. Esta investigación demuestra la actividad virucida del propóleos frente a estos virus y su dependencia de la concentración y del tiempo de contacto (12).

En ensayos *in vitro* realizados por el grupo de trabajo del laboratorio de Vacuna Dengue del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK) en colaboración con el Centro de Investigaciones Apícolas (CIAPI), se demuestra la actividad antiviral de dos extractos alcohólicos de propóleos cubanos (tipo I y II, según su composición química) frente al



VDEN-2. En la presente investigación se evalúa la actividad antiviral en ratones de un extracto alcohólico de propóleos cubano (tipo II) frente al VDEN-2, lo que constituye el primer estudio *in vivo* realizado Cuba, de ahí su novedad científica.



OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la capacidad antiviral de un extracto alcohólico de propóleos cubano frente al VDEN-2 en ratones BALB/c.

Objetivos específicos

1. Determinar la toxicidad de un extracto alcohólico de propóleos cubano en ratones BALB/c.
2. Determinar la actividad antiviral de un extracto alcohólico de propóleos cubano frente al VDEN-2 en ratones BALB/c.



I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1. La enfermedad del virus dengue

El virus dengue es un arbovirus endémico de las regiones tropicales y subtropicales que se transmite por las hembras de los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Pertenece al género flavivirus de la familia *Flaviridae* y se reconocen cuatro serotipos que infectan humanos (VDEN-1, VDEN-2, VDEN-3 y VDEN-4) (13, 14). Es un virus envuelto icosaédrico de 40-50 nm de diámetro. Su genoma es un ARN de simple cadena con polaridad positiva de 11 Kb (15, 16), que contiene un marco abierto de lectura (ORF) el cual codifica para una poliproteína que da lugar a 3 proteínas estructurales y 7 proteínas no estructurales. Este ORF varía en tamaño de acuerdo con cada serotipo del virus e incluso entre un mismo serotipo (17) y se encuentra flanqueado en las regiones 5' y 3' por las regiones no codificantes.

El Dengue se considera la enfermedad más importante transmitida por artrópodos. Es una infección viral aguda, sistémica y emergente (18). En el mundo, se registran entre 50-100 millones de infecciones y 2500 de fallecidos por año. El período de incubación varía de 4 a 10 días después de la picadura del mosquito infectado. Presenta una gran variedad de manifestaciones clínicas que van desde un cuadro leve: artralgia, mialgia, fiebre, rash, cefalea, vómitos y náuseas hasta la aparición de un cuadro grave caracterizado por: extravasación del plasma, acumulación de líquido, disnea, falla multiorgánica, hemorragias y la muerte (19). La vigilancia, prevención y control del virus dengue revisten especial interés en la salud pública de Cuba y el mundo.

I.2. Epidemiología del virus dengue

La naturaleza endémica persistente del dengue se ha transformado lentamente en una epidemia debido a la globalización de la carga de atención médica de las enfermedades infecciosas. Se identifican más de 100 países en regiones de África, Asia, América, Oriente Medio y el Pacífico occidental donde el dengue es una enfermedad que se propaga agresivamente (20). El mayor número de casos de dengue se registra en el año 2023, con más de 80 países de todas las regiones del mundo afectados. Desde principios de 2023, la transmisión persistente del Dengue, combinada con un pico inesperado de los casos, muestra un máximo histórico de más de 6,5 millones de casos y más de 7300 muertes relacionadas con esta enfermedad (21).

Los brotes de esta enfermedad pueden ser explosivos o progresivos y dependen de la densidad y susceptibilidad del vector, la cepa del virus, el nivel de inmunidad en la población humana, y la intensidad de contacto vector-humano (22, 23). Los primeros brotes de dengue se remontan a 1779, principalmente en las regiones de Asia y Europa



(24). En África, se notifican varios brotes a escala limitada con un incremento en los últimos años. Solo cinco epidemias se registran a gran escala en diferentes países de África entre 1977 y 2009 (25).

En la región de las Américas se conoce esta enfermedad desde el siglo XVIII, con grandes brotes en Perú, México, Venezuela, Brasil y Cuba (26), pero no fue hasta 1981 que tiene lugar la primera epidemia de dengue grave en el continente (27). Entre el 2001-2013 más de 30 países notifican un aumento en el número de casos de dengue debido al incremento de viajeros procedentes de áreas endémicas en este período y factores condicionales como el aumento de los índices de infestación del vector, lo cual conduce a un incremento del riesgo de introducción y transmisión viral (28, 29). Particularmente en el año 2010 se registran 1,6 millones de casos de dengue, con aproximadamente 49 000 casos graves de dengue hemorrágico (30). En el año 2016 se observa un brote más grave en los EE.UU., donde se notifican aproximadamente 2,4 millones de casos de dengue hemorrágico. En el año 2019, se documentan casi 3 millones de nuevos casos de infección por dengue (31).

En el 2022 se detecta la circulación simultánea de los 4 serotipos del VDENV en Costa Rica, Colombia, Cuba, El Salvador, Guatemala, México, Nicaragua y Venezuela, para un total de 2 803 096 casos de dengue en la Región de las Américas, con una tasa de incidencia acumulada de 282 casos por 100 000 habitantes, de ellos el 0,16% se clasifican como dengue grave. El mayor número de casos de dengue se observa en Brasil con 2 383 001 casos, seguido por Nicaragua con 97 541 casos y Perú con 72 844 casos. Respecto al número de casos de dengue grave, el mayor número también se observa en Brasil con 1 473 casos y Colombia con 1 371 casos. Adicionalmente, en el mismo período, se notifican un total de 1 223 muertes en la Región (32, 33).

En Cuba el dengue no se reporta hasta el año 1977 cuando se produce una epidemia causada por el VDENV-1 que afecta el 50% de la población (34). Cuatro años más tarde se produce la primera epidemia de dengue hemorrágico en la región, causada por el VDENV-2 genotipo asiático, con más de 10 000 casos graves y 158 fallecidos, de ellos 101 niños y 57 adultos (27).

En 1997 ocurre otra epidemia de dengue en la cual se aísla el VDENV-2 genotipo americano/asiático con un número de casos de 2 946, de ellos 205 casos hemorrágicos y 12 fallecidos en el municipio de Santiago de Cuba (35). Entre los años 2001 y 2002, una epidemia, pero en esta ocasión causada por el VDENV-3, se produce en varias provincias de Cuba, con una mayor incidencia de casos en La Habana, aproximadamente más de 14 000 casos, 79 graves y tres fallecidos (36, 37). En el año 2005 se describen dos brotes de dengue en el país, el primero con 198 casos confirmados, correspondientes al VDENV-2, y el segundo, con 148 casos confirmados,



correspondientes al VDEN-4. En este último, se diagnostica un caso de DH (38). Durante el año 2006 se confirma la presencia de los VDEN-3 y VDEN-4 en seis provincias del país, mientras que en otras dos se identifica únicamente el VDEN-3.

En el periodo 2007-2017 se observa un acortamiento entre los brotes de dengue en diferentes regiones del país; pero se controlan rápidamente (39).

Durante los años 2019 y 2020 se detecta en el país la circulación del VDEN-1 y en el 2021 además de este virus circula el VDEN-2. Durante el 2022 y hasta la fecha se observa un incremento del número de casos de dengue en todo el país con la circulación de los cuatro serotipos virales y el predominio del VDEN-3 seguido del VDEN-2 (40).

I.3. Respuesta inmune a la infección

I.3.1. Inmunidad innata

Entre los componentes principales de la inmunidad innata se encuentran las células asesinas naturales (NK, -del inglés- natural killers) las cuales son altamente productoras de IFN γ . Una actividad temprana de las células NK pudiera ser importante en la eliminación de la infección primaria por el VDEN (41). Durante la infección estas son reclutadas rápidamente en órganos y tejidos infectados, por factores quimioatrayentes producidos por las células infectadas y macrófagos residentes activados. Además, los macrófagos constituyen una fuente principal de los IFNs α/β los que, una vez en el sitio de la inflamación, inducen la proliferación de las células NK, la citólisis de células infectadas por virus mediada por dichas células asesinas y la secreción de quimoquinas (42). La respuesta inmune innata, al parecer, tiene un importante papel protector durante la infección con VDEN (43).

I.3.2. Respuesta mediada por anticuerpos

La conjugación de mecanismos de neutralización viral, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity, por sus siglas en inglés) y activación del complemento se activan en la respuesta protectora frente al VDEN.

Los anticuerpos neutralizantes se consideran el mecanismo protector más importante contra la infección por el VDEN (44), por lo que la inducción de niveles elevados de los mismos es el principal objetivo de los candidatos vacunales. Hasta el presente, no se conocen con exactitud los títulos de anticuerpos neutralizantes necesarios para proteger frente a la infección con cada uno de los serotipos, aunque se proponen títulos entre 10 y 100 (45). La formación de inmunocomplejos (IC) entre la proteína E del VDEN y los anticuerpos pueden activar el complemento. La vía clásica de este sistema puede activarse durante la infección primaria por este virus (46). En correspondencia con ello, moléculas de IgM específicas al virus han sido encontradas en esta fase de la infección (47). Durante la infección secundaria, también ocurre activación de la vía clásica del



complemento. Resulta interesante el hecho que las subclases IgG1 e IgG3, las más importantes activadoras del complemento durante una respuesta secundaria, son las subclases de IgG más producidas en los casos de individuos que desarrollan las formas más graves de la infección (48).

I.3.3. Respuesta mediada por células

Las células T ejercen dos funciones principales: (1) la producción de citoquinas que juegan un papel crucial en la regulación de las funciones inmunológicas, el desarrollo de una respuesta anti-viral eficaz, y la activación de células T CD8+, macrófagos y células B, y (2) la lisis de células infectadas. Tanto los linfocitos T CD4+ como los CD8+ son capaces de eliminar células infectadas por mecanismos citotóxicos, lo que contribuye a la recuperación de la infección (49).

Los linfocitos T activados también producen $IFN\gamma$, el cual tiene receptores virtualmente sobre todas las células del organismo. Estos ejercen un sin número de efectos biológicos, entre ellos se destacan ser el principal activador de los macrófagos y además activar las células endoteliales. Estas dos actividades son la base del papel pro-inflamatorio de esta citoquina (50).

I.4. Desarrollo de vacunas contra el virus dengue

El desarrollo de vacunas eficaces contra el Dengue es una prioridad, especialmente en las regiones infestadas por los mosquitos vectores de la enfermedad (51). La obtención de una formulación vacunal tiene entre sus limitaciones, la existencia de los 4 serotipos, el fenómeno de la amplificación dependiente de anticuerpos (ADA), la ausencia de un modelo animal que reproduzca adecuadamente la enfermedad, y el poco conocimiento que se tiene de la etiopatogenia de la misma. Los dos principales retos para el desarrollo de una vacuna son inducir inmunidad protectora duradera contra los 4 serotipos del virus y evitar el fenómeno de ADA (52, 53). Actualmente, existen 2 vacunas aprobadas por la OMS, basadas en virus vivos atenuados que pueden mimetizar la infección por el virus a través de la inducción de una respuesta humoral y celular duradera (54). La vacuna Dengvaxia desarrollada por la compañía Sanofi Pasteur es un vacuna tetravalente, quimérica basada en la cepa atenuada 17D del virus de la fiebre amarilla (VFA) a la cual se le sustituye los genes que codifican para las proteínas prM y E por los que expresan estas mismas proteínas en los cuatro serotipos del VDEN, de ahí que se obtiene una vacuna compuesta de cuatro virus quiméricos (55). Para lograr una completa protección frente al virus se deben administrar tres dosis con seis meses de diferencia a cada individuo. Esta vacuna no es aplicable a individuos inmunodeprimidos, embarazadas, viajeros y personas que no viven en áreas endémicas.



A pesar de que la cepa vacunal del VFA es altamente inmunogénica, la formulación tetravalente quimérica contra el Dengue resultó ser poco eficaz (56, 57). Además los vacunados no expuestos previamente a la enfermedad o que tenían una inmunidad contra el Dengue limitada manifiestan un mayor riesgo de Dengue grave tras la vacunación con Dengvaxia®, aspecto principalmente crítico en niños menores de 9 años (58, 59). Por otra parte, estudios clínicos demuestran una mayor eficacia de la vacuna entre individuos con una inmunidad previa a los flavivirus, lo cual sugiere que la infección natural puede contribuir al establecimiento de una inmunidad adaptativa a largo plazo contra la fiebre del dengue (60).

A pesar de todas las limitaciones de la vacuna Dengvaxia®, sus productores consideran que aun así esta es beneficiosa (61). Sin embargo, el Grupo de Expertos en Asesoramiento Estratégico sobre Inmunización (SAGE) de la OMS, solo recomiendan su empleo en regiones endémicas, con una seroprevalencia del dengue superior al 70%, lo cual también se cuestiona por la comunidad científica internacional a la luz de los dramáticos resultados de la vacunación en Filipinas, que conllevó a la suspensión de la vacuna (62, 63).

Por otra parte, la vacuna diseñada por la compañía Takeda (Qdenga), es una vacuna tetravalente quimérica viva, basada en la cepa atenuada del VDEN-2 (PDK-53) que contiene las proteínas estructurales prM/E de los 4 serotipos virales (64). Su forma de administración se basa en dos dosis aplicadas con un intervalo de tres meses. Es aplicable a personas mayores de 4 años que cursen o no previamente la enfermedad (65). En múltiples estudios clínicos de fase I, II y III se demuestra que la vacuna es inmunogénica y bien tolerada, independientemente de la edad o el estado serológico de los participantes. Esta vacuna muestra una eficacia protectora dependiente del serotipo viral, similar a su predecesora Dengvaxia, pero con niveles más altos de anticuerpos neutralizantes al VDEN-2 (66). Sin embargo, muestra tasas de protección a los VDEN-3 y VDEN-4 más bajas que la mostrada por Dengvaxia (67). Además, posee una protección moderada contra la enfermedad por VDEN-1 tanto en los participantes seronegativos como en los seropositivos, y se sugiere una mayor frecuencia de hospitalización por enfermedad con el VDEN-3 entre los participantes seronegativos vacunados (68), por lo que su perfil de seguridad no se conoce por completo.

Actualmente se encuentran en evaluación varios candidatos vacunales en estudios preclínicos y diferentes fases clínicas (69-74).

I.5. Desarrollo de antivirales contra el virus dengue

Como consecuencia de la alta prevalencia del dengue y la falta de una vacuna ampliamente aplicable, se necesita urgentemente un compuesto antiviral eficiente para



tratar la infección por VDEN. Existen dos estrategias principales en la búsqueda de antivirales contra el dengue, la identificación de compuestos contra las enzimas del VDEN (75) y el descubrimiento computacional basado en la estructura del virus y sus proteínas (76). La primera de estas estrategias se basa fundamentalmente en dos enfoques para el descubrimiento de fármacos antivirales. Según el mecanismo inhibitor, los enfoques incluyen inhibidores que se dirigen a factores de la célula hospedera e inhibidores que se dirigen a componentes virales conocidos como antivirales de acción directa (AAD). Cada uno de ellos tiene ventajas y desventajas (77).

Un enfoque dirigido a la célula hospedera permite un amplio espectro de acción al mismo tiempo que evita la resistencia al fármaco debido a una mayor barrera genética. Sin embargo, dado que el fármaco se dirige a componentes del hospedero involucrados en ciertas actividades celulares, el riesgo de toxicidad y efectos adversos es alto. Esta estrategia tiene como desventaja a la hora de establecer una correlación entre los métodos *in vitro* e *in vivo*, y la falta de un modelo predictivo para la evaluación del fármaco. Por otro lado, los AAD son más prometedores ya que se dirigen directamente a una proteína viral, en consecuencia, ejercen una baja toxicidad y una amplia ventana terapéutica. Sin embargo, una desventaja bien conocida de los AAD es la posibilidad relativamente alta de desarrollo de resistencia (78). A pesar de las desventajas, este enfoque es el más utilizado por la mayoría de los fármacos antivirales autorizados y aquellos que están actualmente en ensayos clínicos.

Existen varios puntos cruciales en el ciclo de vida del virus del dengue en los que el tratamiento antiviral puede utilizarse para limitar eficazmente la replicación del virus y disminuir la carga viral. El descubrimiento de nuevos fármacos antivirales que tengan como objetivo la entrada viral, la replicación del ARN y la escisión de poliproteínas podría ayudar a prevenir la infección por dengue (79, 80). La proteína E del VDEN, la proteína C, la proteasa NS2B/NS3, la ARN polimerasa dependiente de ARN NS5 (RdRp), la metiltransferasa NS5 (MTasa), NS4A y NS4B se reconocen como las principales dianas para el desarrollo de medicamentos antivirales en los últimos cinco años (81-86).

Durante las últimas décadas, los investigadores centran su atención en la naturaleza, tratando de identificar compuestos que puedan utilizarse como antivirales contra el dengue (87). De hecho, la naturaleza es un reservorio extraordinario de sustancias que pueden utilizarse directamente como fármacos o pueden servir como estructuras principales para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos (88). En la actualidad, son diversas las investigaciones realizadas para demostrar la actividad de productos naturales frente al virus dengue (89, 90).

Numerosas plantas en todo el mundo presentan una actividad antiviral potencial contra el dengue (91). En una exhaustiva revisión realizada por Kadir y colaboradores refieren



sesenta y nueve estudios realizados entre 1997 y 2012 relacionados con plantas que presentan una potencial actividad anti-dengue (92). Cabe mencionar que, según una nota informativa de la OMS, el 80% de la población de algunos países asiáticos y africanos depende de la medicina tradicional como su atención sanitaria primaria debido a limitaciones económicas y geográficas (93). En vista de sus pocos (o nulos) efectos adversos, el uso mundial de plantas medicinales o medicinas a base de hierbas está en constante crecimiento. Estudios demuestran la actividad de la cavinnafungina y la cúrcuma como antivirales que interfieren en la replicación del VDEN y el VZIK (94).

Recientemente, en un estudio realizado por Balasubramanian y cols, 2019 se identifica a la curcumina como un inhibidor de la proteasa NS2B/NS3 del VDEN-2. Para ello sintetizan cuatro análogos de la curcumina (curcuminoides) y demuestran la actividad de inhibición de la proteasa *in vitro* y la inhibición de la replicación mediante ensayos basados en células. Los resultados de este estudio muestran que la curcumina es un inhibidor débil de la proteasa viral. Sin embargo, los análogos exhiben una inhibición más potente de la infectividad del VDEN lo que sugiere que la vía celular requerida para la replicación y/o ensamblaje viral son el objetivo de estos compuestos. Un análisis posterior muestra que es probable que la inhibición de los genes involucrados en la biosíntesis de lípidos y de la polimerización de actina por curcuminoides sea el modo de acción en las células infectadas por VDEN-2. Tres de los derivados de la curcumina poseen buenos índices de selectividad en comparación con la curcumina original (95).

I.6. Características del propóleo

El propóleo es un producto natural que resulta de la mezcla de la resina recolectada por las abejas, a partir de las yemas y cortezas de los árboles, las enzimas secretadas por las glándulas del insecto, y de la cera y el polen en distintas porciones (96). Su nombre proviene del griego pro (delante de o defensa) y polis (comunidad o ciudad) y significa defensa de la ciudad. Se encuentra en todas las partes de la colmena y proporciona protección física-química a la misma (97). Se emplea para sellar las grietas, consolidar los componentes estructurales y barnizar el interior de las colmenas (incluyendo los panales). Además, se utiliza por las abejas con fines desinfectantes y para reducir las vías de acceso de los depredadores y embalsamar los cadáveres de estos animales evitando su descomposición (98).

El color del propóleo, aroma, sabor, consistencia y composición química son variables y dependen de su origen geográfico y botánico, las condiciones medioambientales, la vegetación que circula a la colmena y el tipo de abeja (99). De forma general los propóleos se componen, macroscópicamente de resinas (50-55%), ceras (30-40%), impurezas mecánicas (10-15%), polen (5%) aceites esenciales y otras sustancias volátiles (5-15%) (97).



En Cuba existen propóleos de diferentes tonos tales como marrón, pardo, pardo-rojizo, rojo y amarillo (100). Esta variabilidad depende fundamentalmente del origen botánico del producto. Los propóleos cubanos pueden recolectarse por las abejas a partir de las especies del género *Clusia* (copey), *Mangifera* (mango), *Pinus* (pino), *Euphorialactia* (Cardona), *Avicenia germians* (mangle prieto) y *Rhizophora mangle* (mangle rojo) (101). Esto difiere con los propóleos colectados en el continente europeo, Norteamérica y el norte de Asia, pues tienen su origen en los álamos y abedules (102).

I.7. Propiedades biológicas del propóleos

La variabilidad de compuestos bioactivos presente en los propóleos le atribuye al producto una gran variedad de propiedades biológicas. De forma general se pueden mencionar la actividad anticancerígena (103), antialérgica, antimicrobiana (104), antitrombótica, antiinflamatoria, antioxidante (105), antiviral e inmunomoduladora (106).

La actividad antioxidante del propóleos se debe fundamentalmente por su capacidad de inhibir radicales libres y por quelación de iones metálicos (107). Autores reportan que la actividad antioxidante del propóleos no siempre está en relación con la concentración de polifenoles, sino que la posición del(los) grupo(s) hidroxilo en los anillos A y B y las características estructurales son relevantes (105, 108, 109). Flavonoides como catequina o quercetina encontrados en propóleos poseen una mayor capacidad para neutralizar radicales libres y evitan la formación de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) por el grupo fenólico presente en su estructura (105).

La actividad antimicrobiana es una de las propiedades fundamentales de los propóleos, su acción bacteriostática y bactericida se basa en la inhibición de ácidos nucleicos y degradación de la membrana citoplasmática, y principalmente se le atribuye a flavonoides como pinocembrina, quercetina naringenina, acacetina, apigenina, crisina, galangina, kaempferol y pinobanskina (105) así como alteración en los canales iónicos a consecuencia de reacciones de fosforilación y desfosforilación, lo cual disminuye la inhibición de la motilidad bacteriana, factor importante en la virulencia (110). De forma general, se conoce que el propóleos es eficaz para combatir las bacterias Gram positivas más que las bacterias Gram negativas (111). Diversas investigaciones plantean la actividad antimicrobiana del propóleos frente a *Staphylococcus aureus* (112), *Enterococcus faecalis* (113), *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (114). Asimismo, otros autores plantean que alcanos, ácidos, azúcares, ésteres y terpenos procedentes de extractos de propóleos presentan actividad antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida glabrata* y *Streptococcus pyogenes* (115-119). Además, existen estudios que demuestran la actividad anti-*Helicobacter pylori* de propóleos de diferente origen geográfico, asociada a la presencia de compuestos fenólicos en los mismos (120, 121). Además, se conoce, la acción antimicrobiana del propóleos frente a hongos



patógenos de plantas y animales (122-124). Varias investigaciones desarrollan la actividad antifúngica del propóleo contra especies de los géneros *Fusarium* (125), *Aspergillus* (126, 127) y *Trichoderma* (128), así como también, frente a *Malassezia pachydermatis* levadura causante de la dermatitis y otitis en perros (129).

Por otra parte, Song y cols, 2020, demuestran la actividad antiinflamatoria de extractos de propóleo al inhibir la angiogénesis inflamatoria y la inflamación crónica provocada por *Helicobacter pylori* (130). Otros autores determinan el efecto analgésico y antiinflamatorio de extractos etanólicos de propóleo (EEP) *in vivo* y demuestran que este tiene un efecto similar a la prednisona (131). Naik y cols, 2013, observan que el extracto etanólico de propóleo Hindes, sus fracciones y compuestos volátiles presentan actividad antiinflamatoria tópica significativa ya que disminuyen el diámetro de inflamación (132). Nuñez y cols, 2018, plantean que extractos etanólicos de propóleo chilenos poseen potencialidades antiinflamatorias o moduladoras del sistema inmune en edema auricular desarrollado en ratones machos adultos CD-1 con 25-30 g de peso corporal (133). Este efecto antiinflamatorio se debe fundamentalmente a la regulación de la expresión de citoquinas involucradas en el proceso inflamatorio desarrollado en los organismos ante una infección o un daño, tales como TNF- α , TGF e ILs (134).

La actividad antitumoral del propóleo, se ha estudiado en varias líneas celulares como CAM, Hela y HL-60, CI41 y U937 (135). Además, se reporta el efecto antitumoral, anti metástasis, y citotóxico del propóleo en células tumorales en ratones y ratas resistentes a quimioterapia (136). Estudios demuestran que flavonoides, aislados del propóleo, tienen efectos antitumorales, tal es el caso de la propolina C, que induce efecto citotóxico en las células del melanoma humano (137). Por su parte, el ácido caféico disminuye el crecimiento tumoral en metástasis pulmonar de tumor mamario (138). Este en dosis de 10 mg/mL es capaz de inhibir completamente la incorporación de timidina en el ADN del carcinoma de mama (139). Los ácidos p-cumárico y diterpénico prenilados son también citotóxicos para las células tumorales (140). El efecto antitumoral del propóleo se efectúa por los flavonoides que contiene, los cuales inhiben la incorporación de timidina, uridina y leucina en las células cancerígenas. Además, los flavonoides inhiben la tirosinquinasa, las topoisomerasas I y II, así como, las quinasas de las proteínas que controlan la división celular en los cuadros de oncogénesis y manifiesta un metabolismo lento y retraso del crecimiento celular (141).

El propóleo y sus componentes (flavonoides, los ácidos fenólicos y ésteres) presentan actividad inmunomoduladora frente a patógenos virales o microbianos (142). Este producto apícola es capaz de modificar la inmunidad inespecífica. Sus constituyentes, tales como el ácido cinámico y su derivado p-cumarínico, estimulan la producción, en los macrófagos, del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), de la interleucina (IL) -1 β (143), de los receptores celulares tipo toll TLR-2 y TLR-4 y la formación de peróxido de



hidrógeno (H_2O_2), mientras que reduce la producción de óxido nítrico (NO) (144). Por otra parte, en los neutrófilos inhibe producción de aniones superóxidos, favorece la actividad fungicida de los monocitos 58 y estimula, además, la formación de anticuerpos (145). En resumen, en dependencia de la concentración el propóleo exhibe efectos pro-inflamatorios y anti-inflamatorios y puede estimular o inhibir ciertos procesos inmunológicos (111).

I.7.1. Actividad antiviral del propóleo

La actividad antiviral del propóleo se estudia desde la década de los 80, estas investigaciones señalan que el bálsamo tiene efecto sobre los virus con diferentes características estructurales y genómicas, distintos tropismo y diversos hospederos (146). Además, se conoce que la acción antiviral de este producto apícola se realiza por diferentes mecanismos como el bloqueo parcial de la entrada del virus a la célula, la degradación del ARN viral e inhibición del ciclo de replicación del virus dentro de la células (147).

La actividad antiviral del propóleo es de gran interés en la rama investigativa. Varios estudios demuestran su efecto frente a virus que afectan tanto a humanos como a animales.

En Francia, Amoros y cols, 1994, confirmaron la acción antiviral de este producto frente al VHS tipo 1 y 2 y adicionalmente ante poliovirus tipo 2, ya que es capaz de reducir la síntesis del ADN viral, debido a la acción sinérgica de, el ácido caféico con su éster, el ácido ferúlico y los flavonoides que se encuentran en el propóleo (9). Otros estudios demuestran que la actividad frente a ambos tipos de VHS es mayor que la que presenta el Aciclovir, antiviral ampliamente utilizado contra el virus y parece ocurrir antes que penetren la célula y no después de su ingreso (10).

La capacidad antiviral de este producto se demuestra además frente al virus de la Influenza aviar, el virus de la enfermedad Newcastle (116)., el virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), Adenovirus tipo 2, Virus de estomatitis vesicular, Coronavirus, Virus de Influenza A and B, virus Vaccinia, y Rotavirus 2 (11).

Asimismo se estudia la actividad *in vitro* de las flavonas y flavonoles aislados de los propóleos frente al virus de Influenza tipo 1 (VI tipo 1), lo cual demuestra que los segundos son más activos que las primeras en el orden de la galangina, kaempferol, y quercetina (148). Además, en un estudio realizado con extractos etanólicos de propóleos brasileños, se determina, que este presenta actividad frente a los serotipos 2, 3 y 4 de Rinovirus Humanos (HRV-2 y HRV-4) y dicha acción se debe a la presencia en estos extractos del kaempferol y el ácido p-cumárico (149).



Sin embargo, pocos son los estudios realizados para determinar la actividad antiviral del propóleo frente al VDEN. En un estudio realizado por Soroy y cols, 2014 con pacientes que presentan DH se sugiere que un extracto de propóleo (Propoelix™) parece incrementar los niveles de plaquetas y de TNF- α , lo que acorta la duración de la hospitalización de estos pacientes con DH. Por otra parte, algunas investigaciones muestran que flavonoides, que también se encuentran en los propóleos de diferente origen geográfico, como la apigenina, el kaempferol y la quercetina, tienen efecto antiviral frente al VDEN. Más detalladamente la concentración inhibitoria del 50% (CI₅₀) de la quercetina como tratamientos es de 35.7 $\mu\text{g/ml}$ y como profilaxis es de 28.9 $\mu\text{g/ml}$ (149).

De manera general, la acción del propóleo sobre los virus puede ser de diversas formas y concluyen en una reducción de la multiplicación viral e incluso en una acción virucida (150). Este producto induce la producción de Interferones (INFs), sustancias que fortalecen la membrana celular, inducen nucleasas que destruyen el genoma viral y modifican el patrón de la fosforilación del factor de iniciación eucariótico (eIFs), el cual influye en la transducción de las proteínas y detiene toda la biosíntesis de estas y la de los virus (151). Además, interfiere con las estructuras del virión o enmascaran los compuestos virales que son necesarios para la entrada del virus a la célula huésped (152, 153).

I.8. Modelos experimentales para la evaluación de antivirales contra el virus dengue

Los tratamientos que se utilizan actualmente para controlar la infección por VDEN son en gran medida de apoyo para aliviar los síntomas de la enfermedad, incluida la rehidratación y el seguimiento del paciente. Por lo tanto, un modelo de infección *in vivo* es fundamental para comprender la protección mecánica y la patogénesis durante la infección por VDEN, a fin de impulsar la investigación traslacional. Los esfuerzos por lograr una mejor comprensión de VDEN y un tratamiento específico eficaz, incluidas las vacunas y los antivirales, se ven obstaculizados en gran parte por la falta de un modelo animal apropiado. Un modelo de infección adecuado debe simular la progresión de la enfermedad y la naturaleza y distribución de los cambios patológicos observados en humanos. El desarrollo de un modelo animal relevante para la infección humana por VDEN es un desafío, porque ningún animal de laboratorio desarrolla de forma natural formas graves de la enfermedad del VDEN. A lo largo de los años se han desarrollado varios modelos para tender un puente entre la traducción de los estudios *in vitro* y los estudios observacionales en humanos.

Los modelos de ratones consanguíneos permiten minimizar la variabilidad experimental; y los modelos de ratones modificados genéticamente hacen posible reproducir algunos



aspectos de los síntomas clínicos del dengue (154). Mediante el uso de cepas adaptadas a ratones y/o diferentes vías de inoculación, se podría superar la resistencia natural de los ratones al VDEN, lo que convierte a los mismos en un modelo atractivo para la investigación del dengue (155, 156).

Los ratones lactantes son el primer modelo animal pequeño empleado en la investigación del dengue, al aumentar la adaptabilidad de las cepas humanas de VDEN a los ratones mediante pases seriados en el cerebro (157). Este modelo de inoculación intracraneal produce encefalitis y parálisis inducidas por VDEN (158), una condición de compromiso del sistema nervioso central que es rara en la infección humana. Varios grupos adoptan el modelo de ratón lactante ICR para evaluar la eficacia de los antivirales y las vacunas mediante la gravedad clínica y la puntuación de supervivencia, así como la reducción de la carga viral en el tejido cerebral (159). Sin embargo, el tropismo alterado del VDEN para infectar predominantemente el cerebro debido a la barrera hematoencefálica y la vía poco común de administración del patógeno/antivirales plantean la cuestión de la relevancia biológica y fisiológica para los seres humanos y, por lo tanto, la idoneidad de los ratones lactantes para modelar la infección por VDEN debe interpretarse con cautela.

Las respuestas inmunes innatas y celulares en diferentes fases de la infección natural por VDEN se relacionan con la gravedad y la patogénesis de la enfermedad (160). Con este fin, el uso de ratones inmunocompetentes es ideal para comprender la contribución mecanística de las respuestas inmune del huésped a la inmunopatogénesis.

Aunque los ratones inmunocompetentes son naturalmente resistentes al VDEN, la infección puede establecerse con inóculos virales altos (10^6 - 10^8 pfu). Luego de la infección i.v. de 10^8 pfu de VDEN-2 en ratones C57BL/6, se puede detectar la carga viral en el suero, bazo, hígado y cerebro de los animales, lo cual indica la diseminación y replicación sistémica del virus en los diversos tejidos (161). En el mismo estudio, los autores demuestran una asociación entre la infiltración y activación de células T hepáticas y el daño hepático, una patología común documentada en pacientes con dengue. Esto respalda el uso de ratones inmunocompetentes en estudios de patogénesis del VDEN, lo cual se extiende a la comprensión del papel de las respuestas inmunes en las manifestaciones graves del dengue. Asimismo, un estudio demuestra el desarrollo de hemorragia localizada (una característica distintiva de la DH/DSS) en los tejidos subcutáneos de ratones inmunocompetentes infectados con VDEN-2, acompañado de trombocitopenia grave y carga viral detectable en suero, bazo, hígado, piel y cerebro (162). Además, se sugiere que la producción de TNF- α por macrófagos inducida por VDEN se correlaciona fuertemente con la hemorragia, ya que la eliminación de TNF- α en ratones disminuye la incidencia de hemorragia, lo que indica un papel potencial de la inmunidad innata en la inmunopatología de la enfermedad grave.



II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Diseño y tipo de estudio

En la presente investigación se realizó un estudio experimental cuantitativo.

II.2. Cepa viral

Para la evaluación de la actividad antiviral del extracto alcohólico de propóleos frente al VDEN-2 se utilizó la cepa A15 (4PR 7P C6/36HT), conservada en la colección de cepas del Laboratorio Nacional de Referencia de Arbovirus del IPK.

II.3. Cebadores y sondas

Para la realización del ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR) en tiempo real se emplearon los siguientes cebadores y sonda (Tabla 1).

Tabla 1. Cebadores y sonda para detección y cuantificación del VDEN-2

Cebador sentido	AAG GAC TAG AGG TTA KAG GAG ACC C	
Cebador antisentido	GGC GYT CTG TGC CTG GAW TGA TG	
Sonda	AAC AGC ATATTG ACG CTG GGA AAG ACC	(5'-JOE)

II.4. Animales de experimentación

En el estudio se emplearon ratones BALB/c, hembras, entre 8 y 10 semanas de vida, con un peso aproximado entre 18 y 22 g, suministrados por el Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), La Habana, Cuba. Los animales se manipularon de acuerdo a las normas cubanas para el cuidado y uso de animales de laboratorio incluidas en las Guías para el Trabajo con Animales de Laboratorio del IPK. Los animales se alojaron en jaulas con suelo sólido y lecho grueso a una temperatura de 25°C. Además, recibieron alimentos y agua ad libitum, durante todo el período de experimentación.

II.5. Consideraciones éticas en el uso de animales de laboratorio

En el diseño de los experimentos con animales se siguió el principio de las 3 Rs (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) enunciado por Russell & Burch (1959) (163). El protocolo experimental estuvo en concordancia con las regulaciones internacionales para el manejo y cuidado de los animales de experimentación y las buenas prácticas de



Laboratorio para estudios preclínicos (164). Además, obtuvo la aprobación del Comité de Ética del IPK.

Principio del reemplazo: Se realizó una extensa revisión bibliográfica en las principales bases de datos internacionales para revistas biomédicas. Esto permitió seleccionar el modelo animal a emplear, así como las dosis de inmunización, lo que evitó la repetición innecesaria de experimentos.

Principio de reducción: Se emplearon animales con un estado genético BALB/c y la interpretación de los resultados experimentales se avaló con la introducción de grupos controles.

Principio de refinamiento: Se tuvieron en cuenta las principales necesidades biológicas de los animales: encamado, confinamiento social, alimentación y suministro de agua (165). Los procedimientos quirúrgicos y la toma de la muestra del seno orbital se realizaron con los animales anestesiados.

En la inmunización intraperitoneal (i.p) e intramuscular (i.m) se emplearon técnicas adecuadas para la restricción del animal y en el estudio del reto viral, se empleó la vía intracraneal previa inducción de anestesia en cámaras con dietileter (166).

Para evaluar la severidad, se registraron diariamente en una hoja de observación los aspectos clínicos individuales junto con una evaluación neurológica específica del procedimiento. Se aplicó el punto final humanitario a los animales que experimentaron problemas de salud o malestares como pérdida de peso superior al 20%, inmovilidad durante más de 24 h, falta de acicalamiento, disnea y erizamiento. El método de eutanasia empleado fue la exanguinación (167).

Se emplearon todos los medios de protección disponibles, entre los que se encontraron los uniformes quirúrgicos, guantes, gorros y mascarillas de protección. Una vez concluidos los experimentos las carcasas de los animales sacrificados se colocaron en bolsas para desechos biológicos, debidamente rotuladas y se procedió a su eliminación según el procedimiento establecido por el Departamento de Salud, Seguridad y Epidemiología Hospitalaria del IPK.

II.6. Propóleos

En el estudio se empleó un extracto alcohólico de propóleos cubano tipo II (según su composición química) al 5 %. Este se obtuvo en el CIAPI a partir de un propóleos materia prima recolectado en el apiario Medero I, procedente de la provincia Mayabeque del año 2021.



II.6.1. Características Organolépticas del propóleo

- Color: Rojo
- Apariencia: Líquido
- Olor: Resinoso alcohólico
- Contenido de sólidos: 5 %

II.7. Análisis histopatológico

Para el análisis histopatológico se extrajeron los órganos hígado, bazo, corazón, pulmón, riñón y cerebro. Este último, se extrajo solo en los animales retados por vía i.c. La extracción se realizó luego de aplicar eutanasia a los animales. Los órganos se conservaron en formol al 10% para su posterior procesamiento y análisis en el laboratorio de anatomía patológica del IPK.

Para el procesamiento de las muestras se realizó el pase quirúrgico que consiste en la descripción macroscópica de la pieza teniendo en cuenta su tamaño, coloración, aspecto y morfología. Las muestras se colocaron en un procesador automático de tejido con la función de deshidratar, aclarar e inhibir en parafina los fragmentos de tejido seleccionado. Luego se introdujo cada muestra en parafina 2 °C por encima del punto de fusión de la misma, sirviendo de sostén al tejido para ser cortado con el empleo de un micrótopo. Los cortes histológicos se realizaron seriados a 4 micras a un ángulo de 45 grado para la cuchilla y la estufa se calentó hasta 2 °C por encima del punto de fusión de la parafina (para adherir el tejido a la lámina para su posterior coloración). La tinción de las láminas se realizó mediante la técnica de hematoxilina/eosina empleando la hematoxilina de Mayer.

II.8. Determinación de la toxicidad del extracto alcohólico del propóleo en ratones BALB/c

Este método se basó en la evaluación toxicológica de extractos de propóleo en grupos reducidos de animales de experimentación a dosis fijas durante 14 días (168).

Para este ensayo se emplearon 30 ratones distribuidos en 6 grupos de 5 animales cada uno. Los grupos de ratones se conformaron atendiendo a la concentración de extracto de propóleo empleada para la evaluación de la toxicidad, 20, 100, 500 y 1000 mg/kg/d, la vía de inoculación i.p. e i.m., así como la frecuencia de la dosis de administrada, diaria y cada 24 h (Tabla 2). En el ensayo se contó con un grupo placebo, el cual solo recibió NaCl al 0,09 %, administrado diariamente por vía i.p. Todos los ratones se inocularon con un volumen de 0,1 mL durante 10 días.



Tabla 2. Grupos de ratones para el ensayo de toxicidad, (n=5)

Grupo de ratones	Tratamiento	Vía de inoculación	Dosis
Grupo placebo (G.P)	NaCl al 0,09%	i.p.	Dosis única diaria
Grupo I (G.I)	20 mg/kg/d de propóleos	i.p.	Dosis única diaria
Grupo II (G.II)	500 mg/kg/d de propóleos	i.p.	Dosis única diaria
Grupo III (G.III)	1000 mg/kg/d de propóleos	i.p.	Dosis única diaria
Grupo IV (G.IV)	500 mg/kg/d de propóleos	i.p.	Dosis única espaciada
Grupo V (G.V)	500 mg/kg/d de propóleos	i.m	Dosis única diaria

Cada grupo se observó diariamente durante 14 días y se registraron los datos desde la aparición de los signos de toxicidad de moderado o bajo grado de severidad relacionados con el estado general y comportamiento de los ratones (lagrimeo, apnea, disnea, salivación, temblor, somnolencia, letargo, ruido nasal, erizamiento, epistaxis, convulsiones y parálisis, disminución del acicalamiento), hasta la muerte del animal. A cada signo de toxicidad se le asignó una puntuación como se muestra en la Tabla 3. Además, se analizó la variación del peso corporal de los animales.

El porcentaje de supervivencia asociado a cada concentración evaluada se calculó comparando con el grupo placebo, el cual se consideró como el 100% de supervivencia. Se determinó el valor de la concentración tóxica media (CT₅₀) y de la dosis letal media (DL₅₀) mediante regresión lineal a partir de la ecuación de la línea de tendencia de la curva dosis-respuesta, obtenida al graficar concentración del extracto - porcentaje de aparición de signo de toxicidad y concentración del extracto - porcentaje de supervivencia, respectivamente.



Tabla 3. Puntuaciones clínicas para el desarrollo de signos y síntomas que indican enfermedad en los ratones.

Aspecto	Puntuación	Acciones
Peso corporal		
Pérdida de peso hasta el 10 %	1	Revisar la frecuencia del seguimiento
Pérdida de peso del 10 % al 20 %	2	Consultar al veterinario
Pérdida de peso superior al 20 %	3	Consultar al veterinario
Acicalamiento		
Ligeramente descuidado	1	Revisar la frecuencia del seguimiento, Consultar al veterinario
Falta de acicalamiento	2	Revisar la frecuencia del seguimiento, Consultar al veterinario
Locomoción		
Postura/locomoción anormales	1	Revisar la frecuencia del seguimiento, Consultar al veterinario
Inmovilidad durante más de 24 horas	2	Adoptar punto final humanitario (PFH)
Respiración		
Taquipnea (respiración rápida)	1	Consultar al veterinario
Disnea (dificultad para respirar)	2	Adoptar PFH
Erizamiento		
Ligeramente erizado	1	
Abundante erizamiento	2	Consultar al veterinario
Síndromes neurológicos		
Temblor y/o convulsiones	1	Consultar al veterinario
Parálisis general y/o Caída del tren posterior	2	Adoptar PFH

Al concluir el período de observación todos los animales del estudio se sacrificaron con vista a evaluar las posibles alteraciones anatomopatológicas de las cavidades y órganos tales como hígado, bazo, corazón, pulmón y riñón, que pudieran manifestarse de forma



macroscópica. Para esto, se procedió según lo descrito en el acápite para la realización del análisis histopatológico.

II.9. Determinación de la actividad antiviral del extracto alcohólico de propóleos en ratones BALB/c

Para el desarrollo del ensayo antiviral se emplearon 45 ratones BALB/c distribuidos en 5 grupos de nueve animales cada uno. En este estudio, los ratones se inocularon con 0,1 mL de 200 dosis infectivas media en cultivos celulares (DICC₅₀) del VDEN-2 cepa A15 por vía i.p. Posterior a las cuatro horas de infección (4 h.p.i), los animales se trataron con una dosis diaria de propóleos por igual vía durante 10 días. Además, para determinar la capacidad antiviral profiláctica del extracto, el grupo 3 se trató con una dosis diaria de 500 mg/kg/d de propóleos por vía i.p durante 10 días. Posteriormente, los ratones se retaron por vía intracraneal (i.c) con 0,1 mL del VDEN-2 cepa A15 con un título viral de 10⁴ (Tabla 4).

Tabla 4. Grupos de ratones para el ensayo antiviral, (n=9).

Grupo de ratones	Infección con VDEN-2 vía de inoculación	Tratamiento	Vía de inoculación del propóleos
Grupo placebo (G.P)	No*	NaCl al 0,09%	i.p
Grupo I (G.I)	200 DICC ₅₀ / vía i.p.	20 mg/kg/d de propóleos; 4h.p.i.	i.p
Grupo II (G.II)	200 DICC ₅₀ / vía i.p.	500 mg/kg/d de propóleos; 4h.p.i.	i.p
Grupo III (G.III)	10 ⁴ DICC ₅₀ / vía i.c / después de 10 días de tratamiento	500 mg/kg/d de propóleos antes de la infección	i.p
Grupo IV (G.IV) (Control positivo)	200 DICC ₅₀ / vía i.p.	Sin tratar	Sin tratar

*se seleccionaron tres ratones para el reto con el VDEN-2 a los 10 días de tratamiento.

Para determinar la actividad antiviral del propóleos, los animales se observaron durante 28 días y se evaluaron parámetros como la aparición de signos de la enfermedad (excitabilidad, temblor, ruido nasal, erizamiento, epistaxis, letargo, tendido boca abajo, parálisis, disnea, encorvadura y conjuntivitis) y mortalidad, referidos como puntuación en la Tabla 3. Por otra parte, se determinó la concentración del ARN viral en el suero



(viremia) de los ratones a los 6 y 28 d.p.i, a partir de muestras de sangre extraídas por vía retro-orbital. Por último, a los 28 d.p.i. se realizó la eutanasia a los animales y se procedió a determinar el grado de lesión y la concentración viral en los órganos (hígado, bazo, pulmón, riñón, corazón y cerebro) de los animales, mediante análisis histopatológico y RT-PCR, respectivamente.

II.9.1. Extracción del ARN viral a partir del suero y órganos de los ratones BALB/c infectados

Una vez extraídas las muestras de sangre, estas se centrifugaron durante 10 min a 1 500 rpm para obtener el suero, a partir del cual se emplearon 140 μ L para la extracción del ARN viral. Para ello se utilizó manualmente, el estuche comercial *QIAamp Viral RNA Mini Spin Kit* siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen, Alemania). El ARN extraído se conservó a -80°C hasta su utilización en los posteriores ensayos. Para la obtención del ARN viral a partir de los órganos, las muestras de los mismos se maceraron manualmente en PBS 1X. El macerado se centrifugó a 1 500 rpm por 10 min y se obtuvo el sobrenadante, a partir del cual se realizó la extracción del ARN viral con el empleo del mismo estuche comercial mencionado anteriormente.

II.9.2. Ensayo de RT-PCR en tiempo real

El ARN extraído se amplificó por qRT-PCR. El sistema que se empleó utiliza sondas de hidrólisis o TaqMan® y la amplificación se realizó con el empleo de los cebadores y sondas propuestos por la Red de Laboratorios para el Diagnóstico de Arbovirus (RELDA) de la OPS/OMS (Tabla 1). Estos cebadores amplifican un fragmento del gen de la proteína E del VDEN-2.

Para la mezcla de reacción de la RT-PCR en tiempo real (Tabla 5), se utilizó el estuche comercial *SuperScript™ One-Step RT-RCP System with Platinum® Taq High Fidelity* (Invitrogen™, EU). Se distribuyeron 20 μ L en placas de 96 pocillos [Micro Amp Fast Optical 96-well reaction Plate with Barcode (0.1 mL)], Applied Biosystems (ABI), EUA, a las cuales se les añadieron 10 μ L del ARN viral previamente purificado. Las placas se sellaron con una película adhesiva para evitar la evaporación de la mezcla de reacción y se colocaron en el termociclador, según el programa diseñado (Tabla 6).



Tabla 5. Composición de la mezcla de reacción de la RT-PCR en tiempo real.

Reactivos	Volumen en μL (Para una determinación)
Agua libre de RNasas	1,35
Solución Tampón 2X	12,5
Cebadores (sentido y antisentido)	0,25
Sonda	0,15
Mezcla de enzimas	0,5

Tabla 6. Programa de la reacción de RT-PCR en tiempo real

Etapas	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (s)
Transcripción inversa	50	30 min
Desnaturalización	95	120
Cuantificación (45 ciclos)		
• Desnaturalización	95	15
• Hibridación	52	10
• Extensión	72	60
Curva de Fusión		
• Desnaturalización	95	0
• Hibridación	65	15
• Fusión	95	0
Enfriamiento	4	30

Una vez concluido el ensayo de RT-PCR en tiempo real los datos se analizaron según las instrucciones del fabricante. Se consideraron positivas aquellas muestras cuya línea umbral (Ct del inglés-*Threshold Cycle*) estuvo por debajo del ciclo 38 y negativas aquellas muestras cuyo Ct estuvo por encima del ciclo 38.

II.10. Procesamiento estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó empleando el programa GraphPad Prism versión 5.00 [GraphPad Software, USA, (<http://www.graphpad.com>)]. La comparación entre los grupos experimentales para la búsqueda de diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia y el peso corporal de los ratones teniendo en cuenta la concentración, la vía de inmunización y la dosis del extracto alcohólico de propóleos, se realizó por medio de la prueba no paramétrica de Kruskal-



Wallis con un nivel de significación estadística de $p < 0.05$. El valor de CT_{50} y de DL_{50} se determinó mediante regresión lineal a partir de la ecuación de la línea de tendencia de la curva dosis-porcentaje de supervivencia.



III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la actualidad, la medicina tradicional representa una alternativa frente a las enfermedades infecciosas sin tratamiento específico. Entre los productos naturales el propóleo emerge como un compuesto eficaz para prevenir y tratar un gran número de enfermedades por las diversas propiedades biológicas que posee. Estudios realizados *in vitro*, demuestran la capacidad antiviral de este producto frente al VDEN (12, 169), por lo que resulta importante determinar *in vivo* su toxicidad, efectos terapéuticos y preventivos para esta enfermedad. Estos estudios preclínicos apoyan futuras investigaciones que avalan el empleo del propóleo como posible compuesto antiviral.

III.1. Efecto de la concentración, la vía de inculación y la frecuencia de la dosis de administración del extracto alcohólico de propóleos cubano en los ratones BALB/c

Las pruebas de toxicidad constituyen las primeras investigaciones hacia el conocimiento de la actividad biológica de un producto natural. Estos ensayos tienen como objetivos: definir la toxicidad intrínseca del compuesto, identificar los órganos blancos, obtener datos acerca del riesgo que conlleva la exposición aguda del producto, así como proporcionar información para la designación y selección de los niveles de dosis para la conducción de estudios a largo término (170)

El ensayo de toxicidad realizado en el presente estudio tuvo como objetivo fundamental determinar la dosis, vía de inoculación y la concentración del extracto de propóleos que no provoca toxicidad en los ratones BALB/c. Para ello se evaluaron las concentraciones de 20, 500 y 1000 mg/kg diariamente por la vía i.p. Además, la concentración de 500 mg/kg se evaluó por vía i.m y una dosis cada 24 h.

En la Figura 1 se observa que los ratones inoculados con diferentes concentraciones (20, 500 y 1000 mg/kg) del extracto alcohólico de propóleos cubano tipo II, por vía i.p e i.m, sobrevivieron a los 15 días del ensayo. Asimismo, no se observaron signos de toxicidad de menor grado, relacionados con el estado general y comportamiento de los ratones tales como, letargo, ruidos nasales, erizamiento, convulsiones, parálisis y disminución del acicalamiento. La DL_{50} y la CT_{50} en ratones BALB/c inoculados por vía i.p fue mayor de 1000 mg/kg y por vía i.m superior a los 500 mg/kg. Estos resultados demuestran que el extracto de propóleos no resultó tóxico para los ratones BALB/c, independientemente de las vías empleadas, las dosis y las concentraciones evaluadas.

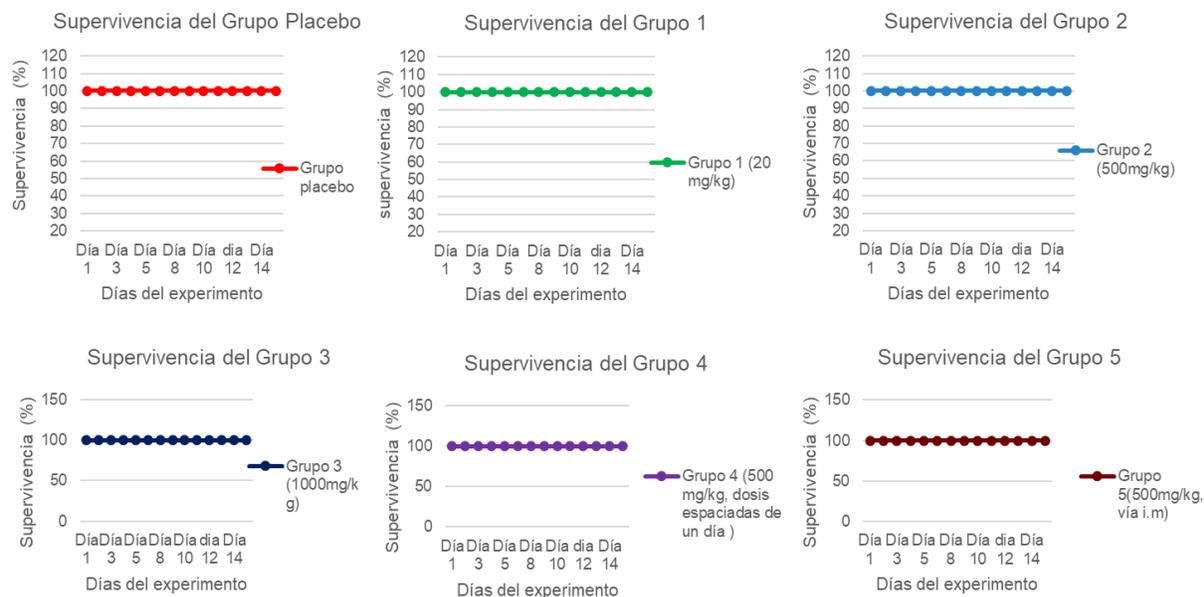


Figura 1. Porcentaje de supervivencia de los ratones inmunizados con el extracto de propóleos. Se representa el comportamiento durante 14 días del grupo de animales placebo y grupos de animales inmunizados con 20, 500 y 1000 mg/kg por vía i.p y dosis única (grupos 1, 2 y 3). Además, se muestran los grupos de animales inmunizados con 500 mg/kg vía i.p, dosis espaciadas cada 24 h (grupo 4) y por vía i.m, dosis única (grupo 5). $y = 100$ y $R^2 = \#N/A$ para cada gráfico.

Los resultados del presente estudio son similares a los obtenidos por Pérez y cols, 2003, quienes evalúan en ratas *Sprague Dawley*, una tintura de propóleos cubano por vía oral, la cual no provocó la muerte ni la aparición de signos de toxicidad (171). Asimismo, son resultados comparables con los planteados por Seijo y cols, 2022, quienes demuestran que una tintura hidroalcohólica de propóleos cubano no presenta riesgo de toxicidad, al probar dicho producto en igual modelo animal (172). Ambos estudios indican la ausencia o muy baja toxicidad del propóleos cubano.

En la Figura 2 se muestra el comportamiento del peso corporal, en los diferentes grupos de ratones. Como se puede apreciar hubo un aumento de peso en todos los ratones a excepción del grupo inoculado con 1000 mg/kg (Figura 2A), que mostró una pérdida de peso de un 4.1%, valor aún por debajo del límite de toxicidad (10%). El análisis estadístico de los resultados arrojó que esta disminución no fue significativa ($p \geq 0.05$). Asimismo, para esta concentración no se observó mortalidad ni signos de toxicidad, por lo que no se consideró tóxica durante el periodo evaluado. Por otra parte, al cuarto día del experimento se observó un incremento del peso corporal de un 12 % en el grupo de ratones inoculados con la concentración de 20 mg/kg, en comparación con el grupo placebo que tuvo un aumento de 3.1%. Esto significa que con cuatro dosis de propóleos a la concentración de 20 mg/kg se produce un aumento significativo del peso ($p=0.0066$)



en los ratones BALB/c con respecto al control, lo cual favorece el empleo de esta concentración para la evaluación de la actividad antiviral del extracto de propóleos cubano.

El comportamiento del peso corporal es uno de los principales indicadores de posibles trastornos orgánicos en las evaluaciones de la toxicidad de productos naturales (16) con una asociación entre la no ganancia o incremento del peso corporal con la baja toxicidad del producto evaluado. Estudios realizados sobre la toxicidad de propóleos de diferente origen geográfico muestran similar comportamiento del peso corporal en ratones. Hwang y cols, 2020, al evaluar los efectos del propóleos coreano en ratones BALB/c con colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS) demuestran que los ratones que recibieron oralmente el propóleos a la concentración de 500 mg/kg no mostraron diferencias en el peso corporal en comparación con los controles, lo que sugiere que el propóleos coreano a la mayor concentración evaluada no afectó el peso corporal de los ratones BALB/c (173).

Por su parte, Shimizu y cols, 2011 al estudiar la toxicidad de tres tipos de propóleos brasileños a una concentración de 10 mg/kg obtienen que no hubo diferencia significativa entre los pesos corporales netos de los ratones infectados y el grupo placebo, el décimo día después de la infección (174).

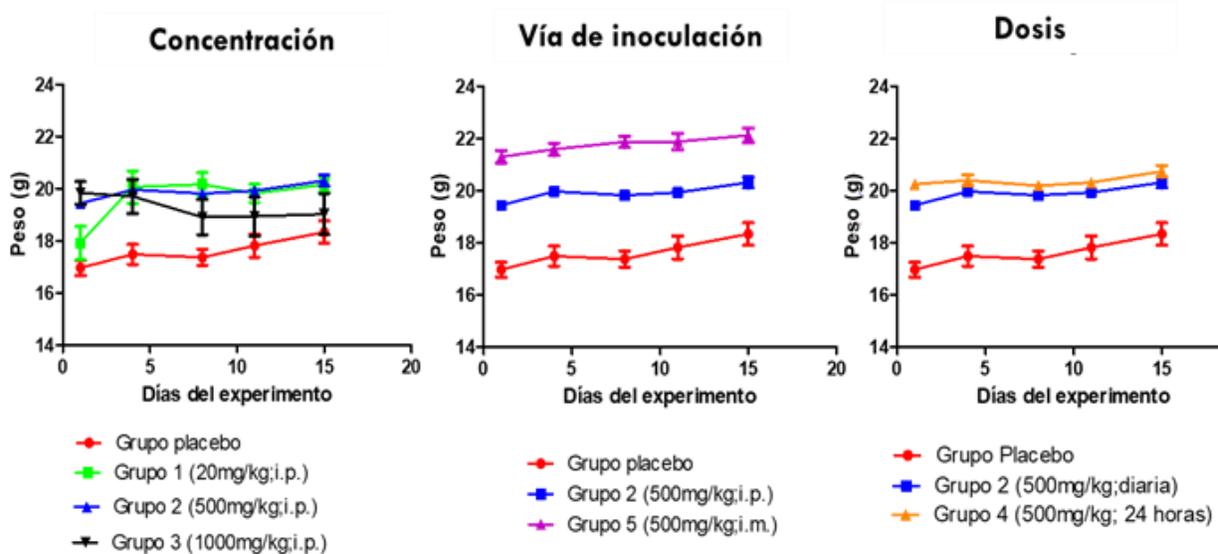


Figura 2. Efecto del extracto alcohólico de propóleos sobre el peso corporal de los ratones BALB/c comparado con el grupo placebo para cada concentración empleada (A), vías de inoculación (B), y la frecuencia de administración de las dosis evaluadas (C) ($p>0.05$)



Al comparar el efecto del extracto alcohólico de propóleos administrado por diferentes vías de inoculación, i.p e i.m en los ratones (Figura 2B) se observó que no existen diferencias significativas entre ambas vías en cuanto al comportamiento de peso corporal. Resultados similares se obtuvieron cuando se compararon las frecuencias de administración de las dosis de inoculación (diarias y cada 24 h) (Figura 2C). Sin embargo, el análisis estadístico obtenido al comparar las pendientes de las curvas de ganancia de peso corporal de los grupos inoculados con 500 mg/kg por vía i.m ($p=0,0019$) y cada 24 h ($p=0,0034$) con el control indicó que hubo diferencias significativas. Asimismo, la correlación de Spearman mostró una correlación positiva significativa ($p=0.0167$) para el grupo inoculado con 500 mg/kg por vía i.m, lo que significa que a medida que aumentan los días y el número de dosis, aumenta también el peso corporal de los ratones. Estos análisis permitieron determinar que independientemente de la vía de inoculación y la frecuencia de la dosis evaluada, el comportamiento del peso en los ratones BALB/c no se afectó negativamente, por tanto, ninguna de las variables resultó tóxica para este modelo animal.

Numerosos estudios sobre la evaluación de la toxicidad de extractos de propóleos muestran los efectos no tóxicos de los mismos en ratones, independientemente de la concentración, la vía de inmunización, la frecuencia de las dosis empleadas y el origen geográfico. En una investigación que evalúa la toxicidad aguda oral de un extracto de propóleos en ratones la DL₅₀ fue mayor que 7,34 g/kg, lo que significa que el extracto no fue tóxico hasta esta concentración (175). Otros investigadores evalúan la toxicidad oral de dos extractos alcohólicos de propóleos y no se produjo mortalidad ni signos de toxicidad a dosis de hasta 5g/kg de peso (176). Autores iraníes estudian la composición química, toxicidad oral y actividad antimicrobiana de propóleos iraníes y obtienen resultados semejantes a dosis límites (177).

Investigaciones realizadas con propóleos cubanos evalúan la toxicidad aguda oral de un extracto de propóleos cubano en ratas *Sprague Dawley* mediante un ensayo límite donde se administra una dosis de 2 g/kg y no se observa toxicidad (178). Otros estudios toxicológicos realizados a extractos etanólicos de propóleos procedentes de la región occidental de Cuba, en ratones OF1 de ambos sexos, a una dosis de 2 g/kg, por vía oral, refieren que este producto no produce letalidad, ni desarrolla signos tóxicos (179).

Otro de los aspectos a considerar en la evaluación de la toxicidad de compuestos naturales es el análisis de los daños a nivel de órganos. Al realizar el estudio macroscópico de los órganos corazón, pulmón, bazo, hígado y riñón, para la búsqueda de posibles signos de toxicidad se observó que no hubo ningún daño posterior a la administración del extracto alcohólico del propóleos.



En la Figura 3 se muestra los resultados histopatológicos de la evaluación de la toxicidad en los grupos de ratones inmunizados con las diferentes concentraciones del extracto alcohólico del propóleo. En la misma se observa el desarrollo de una ligera atelectasia pulmonar focal acompañada de restos de necrosis (RN) en pulmón en los ratones inoculados con propóleo a diferencia del grupo placebo (Figura 3A y 3B). Esto sugiere que el extracto a pesar de no inducir signos clínicos de toxicidad y no causar la muerte de los ratones, si puede afectar ligeramente el pulmón de los mismos. Sin embargo, en el análisis histopatológico de los órganos del grupo placebo se observó congestión vascular, hemorragia focal intra-alveolar pulmonar, depleción linfocítica intensa en bazo y congestión de las aurículas cardíacas, lo cual indica que los ratones sufrieron un proceso infeccioso asintomático. Este resultado del grupo placebo sugiere que la atelectasia y los RN observados en los ratones inmunizados con propóleo son consecuencia de la respuesta inmune inducida por el propóleo más que por su toxicidad.

La infiltración inflamatoria pulmonar focal, la ligera hiperplasia de células Kupffer en hígado y el aumento de tamaño del bazo por expansión interfolicular, observados en los ratones inmunizados con las diferentes concentraciones de propóleo sugieren que este extracto favorece la producción de células implicadas en la respuesta inmune de los ratones BALB/c. Varias son las investigaciones que se realizan sobre el papel del propóleo en el sistema inmune, con diferentes enfoques experimentales *in vitro* e *in vivo*. Yosri y cols, 2021, plantean en un estudio acerca de las propiedades inmunomoduladoras del propóleo, que este producto natural induce una respuesta inmune modulada por TLR (*del inglés* Toll-like receptor) que reconoce las moléculas PAMPs (*del inglés* pathogen associated molecular patterns) en ratones BALB/c, así como incrementa la expresión de células CD4+ y CD8+ ante microorganismos (180). Asimismo, Ripari y cols, 2021, refieren que el propóleo puede modular la función de diferentes células involucradas en la inmunidad innata y adaptativa, como macrófagos, monocitos, neutrófilos, células NK y linfocitos, lo cual mejora su actividad y mecanismos de defensa ante agentes infecciosos (144). En otro estudio realizado en ratones albinos suizos, se obtiene que la administración de propóleo por sonda durante 4 días luego de una lesión causada por un implante intraperitoneal disminuye la producción de TGF- β 1 y aumenta el número de neutrófilos, la acumulación de macrófagos y la producción de TNF- α y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (181). Estos resultados indican que el propóleo puede activar mecanismos de la respuesta inmune involucrados en la eliminación de microorganismos.

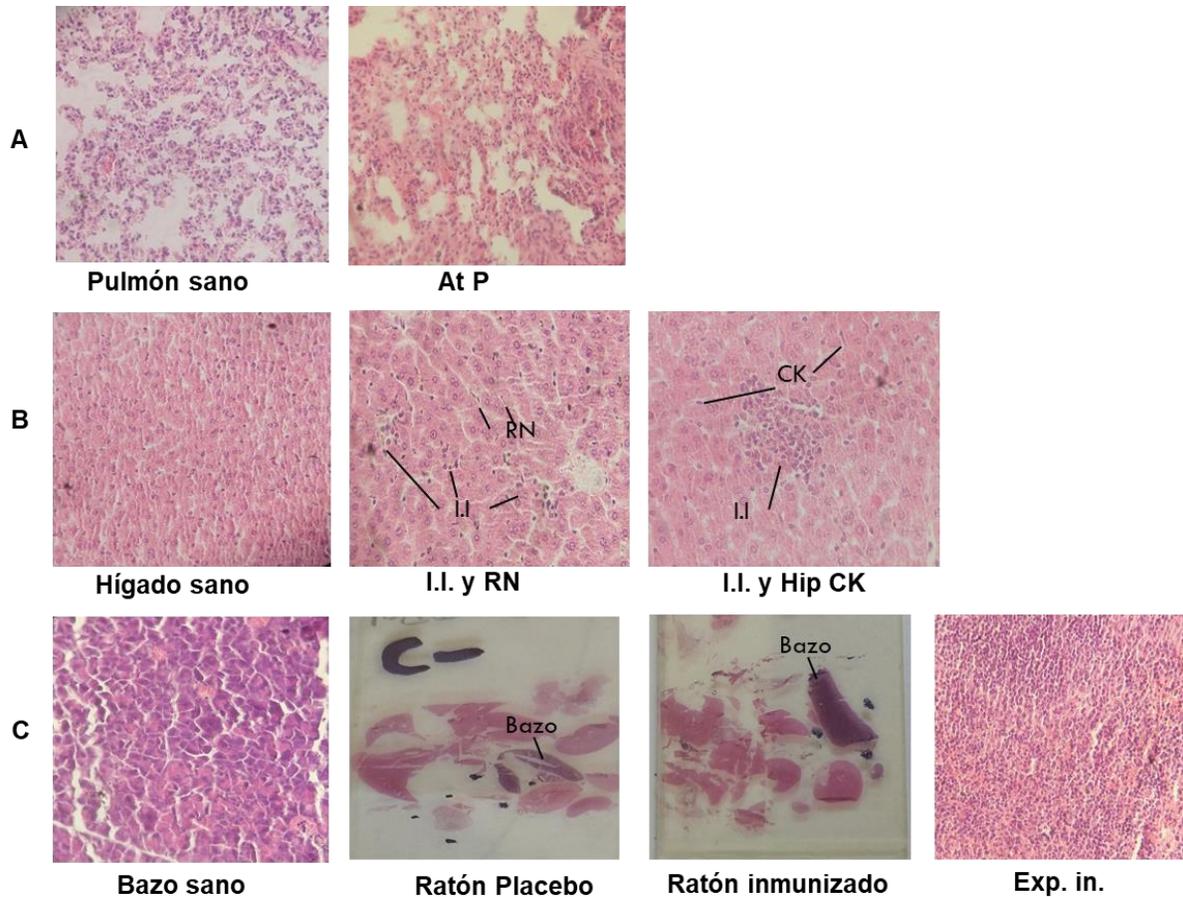


Figura 3. Hallazgos histopatológicos observados en el análisis de toxicidad. **(A)** Pulmón sano y el desarrollo de atelectasia pulmonar focal (At P) en ratones inmunizados con propóleos **(B)** Hígado sano del y el desarrollo de infiltrado inflamatorio focal (I.I), restos de necrosis (RN) e hiperplasia de células Kupffer (Hip CK) en hígado de los ratones tratados con propóleos **(C)** Bazo sano y aumento del tamaño del bazo por expansión interfolicular (Exp. In.) en ratones inmunizados con propóleos. Todas las micrografías se realizaron a 40X.

El análisis histológico del corazón y del riñón de los grupos tratados con propóleos no mostró daños en estos órganos, lo cual indica la no toxicidad del propóleos en los mismos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Kalia y cols, 2014, quienes evalúan un extracto alcohólico de propóleos indio, en ratones BALB/c a dosis de 300, 500 y 1000 mg/kg por vía oral. Los autores no encuentran diferencias en los parámetros bioquímicos, hematológicos e histológicos con respecto al grupo control (182).

De los resultados del presente análisis de toxicidad se infiere que, el extracto alcohólico de propóleos, no fue tóxico para los ratones BALB/c con respecto a los parámetros evaluados, por lo cual puede emplearse en los estudios posteriores de actividad antiviral.



III.2. Actividad anti-virus dengue 2 del extracto alcohólico de propóleos en los ratones BALB/c

El objetivo de este ensayo fue determinar la actividad anti-VDEN-2 del extracto alcohólico de propóleos en ratones BALB/c. Para ello se evaluaron las concentraciones de 20 y 500 mg/kg, por vía i.p, con la administración de una dosis única diaria durante 28 días.

En la Figura 4 se muestran los resultados del estudio de supervivencia de los grupos controles y de los ratones tratados con propóleos. En la misma se observa que en los grupos tratados con propóleos luego de la infección con el VDEN-2 (Figura 4B y 4C), todos los ratones sobrevivieron a la infección viral y no mostraron signos de la enfermedad. Estos resultados sugieren que el extracto alcohólico de propóleos pudiera presentar una actividad antiviral luego de la infección con el VDEN-2.

Existen pocos estudios que evalúan los extractos de propóleos como compuestos antivirales (144). Shimizu y cols, 2008, demuestran la eficacia del propóleos frente a la infección por el virus influenza H1N1 en ratones DBA/2, con un incremento de la producción de IFN- γ y la activación de la respuesta Th1 dirigida por los linfocitos T CD4+ (183). Por su parte, Sartori y cols, 2012, plantean la reducción de los daños causados por VHS-2 al administrar propóleos a 50 mg/kg en ratones BALB/c (184).

Al comparar los resultados de los grupos tratados con el grupo control de la enfermedad no se observaron en este último, signos característicos de la infección ni mortalidad. Este resultado se corroboró con la determinación de la viremia mediante el ensayo de RT-PCR en tiempo real en el suero obtenido a los seis d.p.i y de los órganos extraídos al término del experimento, los cuales fueron negativos. Los resultados del grupo control positivo en este ensayo son similares a los obtenidos por Paes y cols, 2005, quienes evalúan a los ratones BALB/c como un modelo animal de infección para el VDEN-2 (185). Estos autores observan que todos los ratones sobreviven a la infección y no presentan signos clínicos de la enfermedad tras inocular por vía i.p una cepa de VDEN-2 no adaptada en ratones.

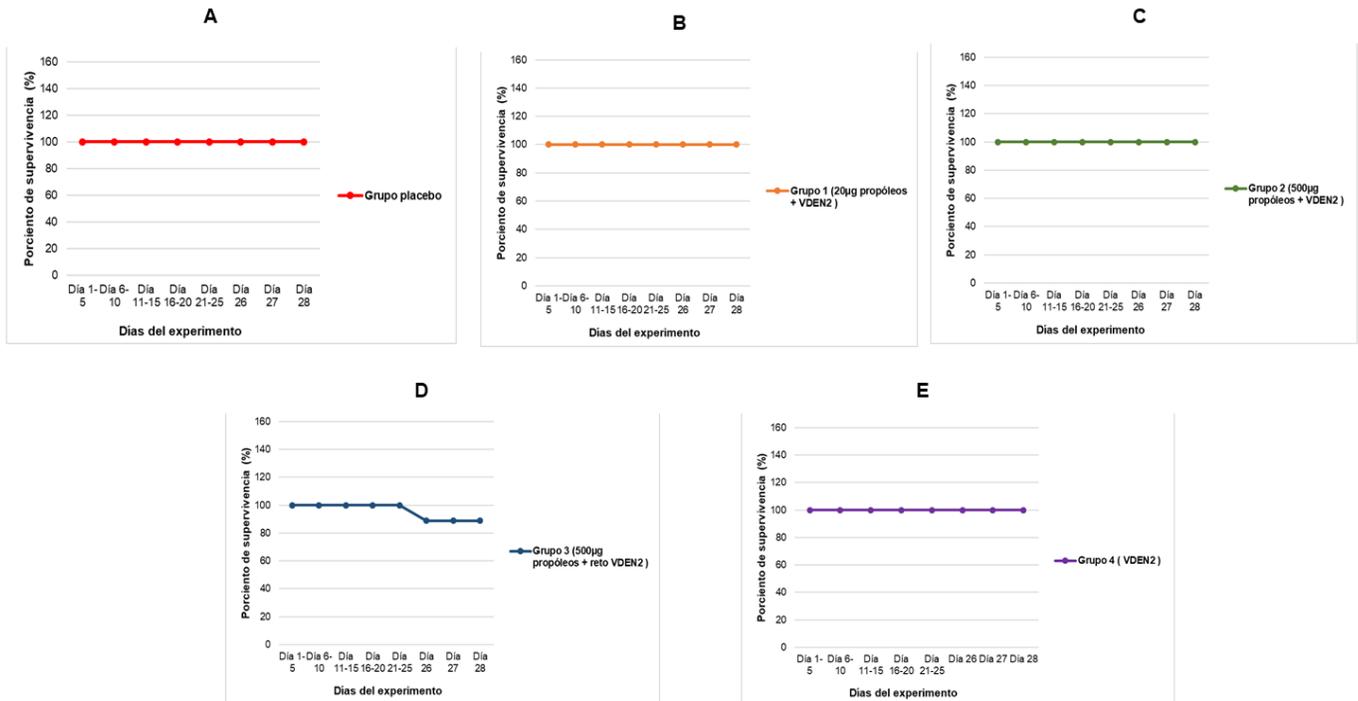


Figura 4. Porciento de supervivencia de los ratones BALB/c ante cada tratamiento del análisis antiviral del extracto alcohólico de propóleos. Se representa el comportamiento durante 28 días de los grupos de animales, placebo (A), grupo de ratones inoculados con 200 DICC50 del VDEN-2 cepa A15 por vía i.p y tratados a las 4 h.p.i con 20 mg/kg (B) y 500 mg/kg (C) de propóleos, grupo de animales inoculados inicialmente con 500 mg/kg del extracto alcohólico durante 10 días y retos via i.c con 10^4 DICC50 del VDEN-2 (D) y grupo de ratones control positivo inoculados con 200 DICC50 del VDEN-2.

La Figura 4D muestra la curva de supervivencia del grupo retado con VDEN-2 luego de la administración de 10 dosis de propóleos a 500 mg/kg (grupo 3). En esta se observa la muerte de un ratón al día 26, el cual mostró con anterioridad signos de la infección por VDEN tales como la caída del tren posterior, erizamiento y temblores (Figura 5). Además, se detectó la presencia del VDEN-2 por la técnica de RT-PCR en tiempo real en la muestra de cerebro. El análisis del comportamiento de su peso corporal determinó que hubo una pérdida de la masa corporal de un 34.1% desde el 5 d.p.i., lo cual puede ser consecuencia del desarrollo de la enfermedad (datos no mostrados). El resto de los ratones del grupo 3 y los retos en el grupo placebo fueron negativos al ensayo de RT-PCR en tiempo real y no desarrollaron ningún signo de la infección durante el periodo evaluado.

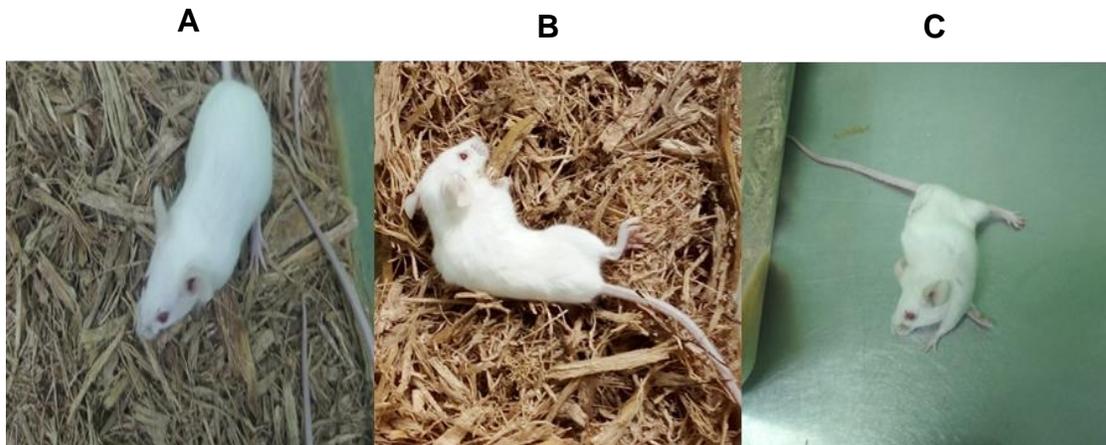


Figura 5. Signos de la enfermedad observados en el ratón fallecido del grupo 3 en el estudio de la actividad antiviral. (A) Ratón sano, (B) y (C) Ratón con caída del tren posterior y erizamiento.

Al realizar el análisis histopatológico de los órganos extraídos (corazón, hígado, pulmón, bazo, cerebro y riñón) se observó el desarrollo de una atelectasia pulmonar focal y RN en hígado, riñón y pulmón, en los grupos tratados con propóleos antes y después de la infección, no siendo así en los grupos controles. La histopatología del grupo placebo mostró que estos no sufrieron un proceso infeccioso a diferencia del estudio de toxicidad. Además, en el grupo control positivo no se observaron daños en pulmón asociados a la infección; sin embargo, estudios plantean que el VDEN-2 provoca daño histopatológico severo en pulmones tales como engrosamiento de tabiques interalveolares y neumonía intersticial, caracterizada por la presencia de células mononucleares en ratones BALB/c infectados con el virus no neuroadaptado por vía intraperitoneal e intravenosa (186, 187). La extracción de los órganos a los 28 días realizada en el presente estudio pudiera ser la causa de la no observación de daños en pulmón de los ratones del grupo control de la enfermedad. Estos resultados confirman que la atelectasia pulmonar y los RN en hígado, riñón y pulmón se produjo por la respuesta inmune inducida por el extracto alcohólico evaluado, debido al daño pulmonar ocasionado por el VDEN-2.

Además, en el grupo control de la enfermedad se observó un proceso de infiltrado inflamatorio en los lobulillos hepáticos que pueden ser provocados por una hepatitis reactiva. Estos resultados concuerdan con un estudio realizado con el objetivo de caracterizar a ratones BALB/c como modelo animal de la infección de VDEN-2 por vía i.p., en el cual se observan lesiones en hígado que indican una replicación del virus en este órgano (185). Por otra parte, en los ratones inmunizados con propóleos también se observó un infiltrado inflamatorio, pero en mayor medida que el grupo control positivo, así como también hiperplasia de células de Kupffer en hígado. Estos hallazgos sugieren



que los ratones al ser inmunizados con propóleos desarrollan una mayor respuesta inmune que los ratones inoculados con VDEN-2, lo que pudiera estar relacionado con una actividad antiviral.

Asimismo, en el grupo inoculado con virus luego del tratamiento con propóleos, se observaron las lesiones anteriormente descritas, además de una respuesta inflamatoria inespecífica de meninges focal y la reparación de los bazos sanguíneos en cerebro, no mostrada en los otros grupos tratados con propóleos. Estas lesiones pueden deberse a que dicho grupo se inoculó con el VDEN-2 por vía i.c.

Además, se observó que los ratones tratados con 500 mg/kg del extracto alcohólico de propóleos presentaron lesiones en pulmón no observadas en los grupos controles ni en los inoculados con 20 mg/kg de propóleos, tales como hemorragia interna y externa, trombos y necrosis del vaso sanguíneo resultados de una respuesta inmune exacerbada, que puede estar dada por la combinación de una alta concentración de propóleos con el VDEN-2. Esto sugiere que los daños histopatológicos observados al evaluar la actividad antiviral dependen de la concentración del extracto alcohólico de propóleos.

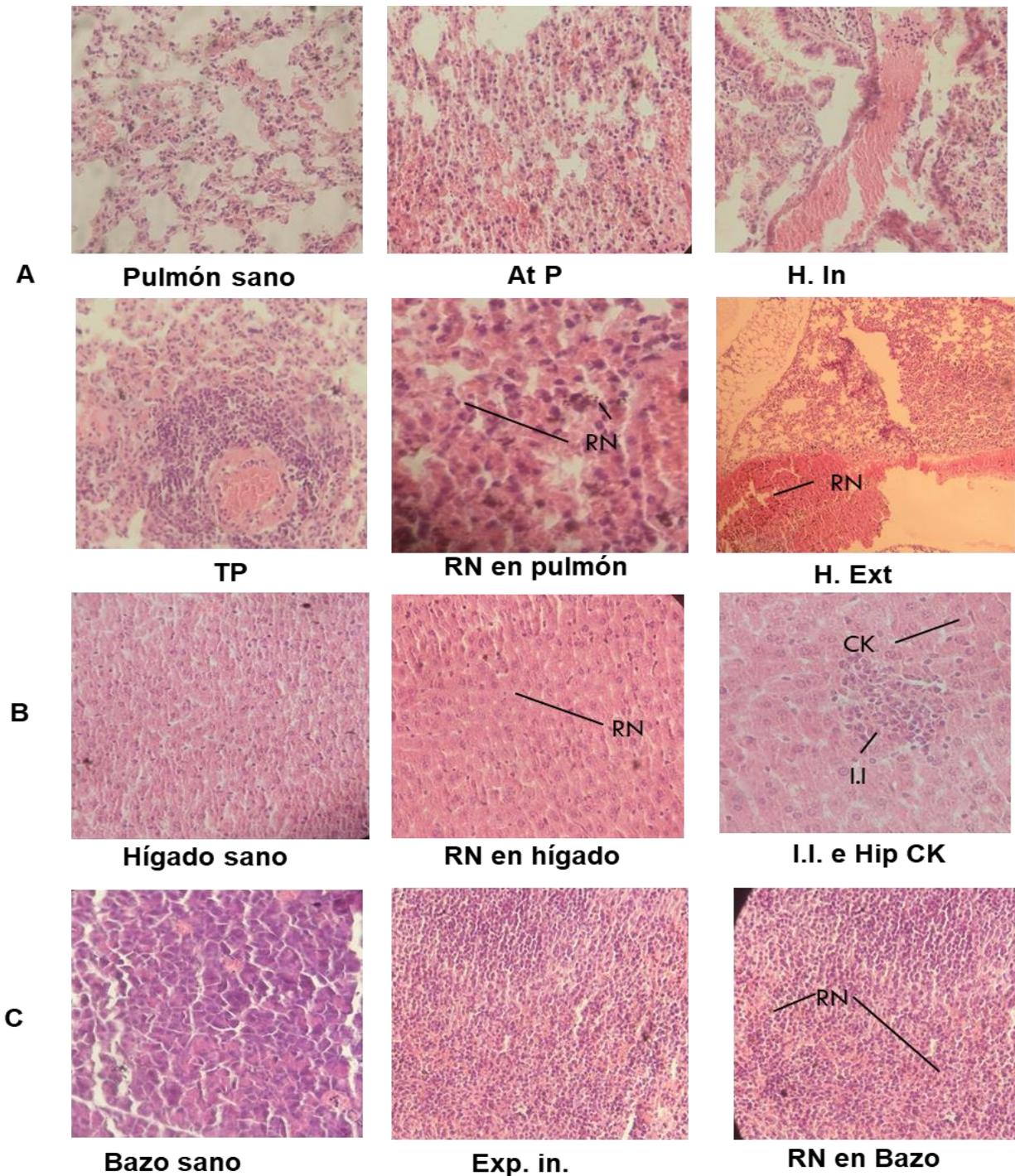


Figura 6. Hallazgos histopatológicos observados en el estudio de actividad antiviral. **(A)** Pulmón sano del grupo placebo; atelectasia pulmonar (At P) focal de los grupos inmunizados con propóleos; hemorragia interna (H. in), hemorragia externa (H. ext) con necrosis del vaso sanguíneo, restos de necrosis (RN) en pulmón y trombo pulmonar observados en el grupo inoculado con 500 mg/kg del extracto alcohólico de propóleos. **(B)** Hígado sano del grupo placebo; restos de necrosis en hígado, infiltrado inflamatorio (I.I) focal e hiperplasia de células Kupffer (Hip.CK) observadas en los grupos inmunizados con propóleos **(C)** Bazo sano del grupo placebo; expansión interfolicular (Exp. in) y restos de necrosis en el bazo de los grupos tratados con propóleos.



CONCLUSIONES

- La vía de inoculación, la frecuencia de la dosis evaluada y la concentración del extracto, no afectaron el comportamiento del peso corporal de los ratones BALB/c, por lo que estas variables no influyeron en la toxicidad del extracto alcohólico del propóleo en este modelo animal.
- La atelectasia pulmonar focal y los restos de necrosis en tejidos de hígado y bazo observadas en los grupos tratados con propóleos, pudieran corresponderse a la inducción de la respuesta inmune anti-infecciosa más que a la propia toxicidad del propóleo teniendo en cuenta que las lesiones encontradas en el control positivo son compatibles a un posible proceso infeccioso.
- La supervivencia y los hallazgos histopatológicos observados en los ratones luego de la infección con el VDEN-2 y el tratamiento con propóleos sugiere que el extracto alcohólico de propóleos pudiera presentar una actividad antiviral e inducir una respuesta inmune contra la infección del VDEN-2.



RECOMENDACIONES

- Evaluar otras concentraciones del extracto alcohólico de propóleos en los estudios de toxicidad y actividad antiviral.
- Determinar el efecto del extracto alcohólico de propóleos en la respuesta inmune inducida en los ratones inmunizados con el VDEN.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Valdés L, Guzmán MG, Kourí G, Delgado J, Carbonell I, Cabrera MV, et al. La epidemiología del dengue y del dengue hemorrágico en Santiago de Cuba, 1997. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 1999;6(1):16-25.
2. Guzmán MG, Kourí G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *International journal of infectious diseases*. 2004;8(2):69-80.
3. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Actualización Epidemiológica: Dengue, chikunguña y Zika. 25 de enero de 2023. In: Washington DCOO, editor. 2023.
4. Arias J. El dengue en Cuba. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 2002;11(4):221-2.
5. Urbina E, Rodríguez M. Presentaciones atípicas de la infección por el virus del dengue: Una Revisión de la Literatura. *Revista Médica de Trujillo*. 2017;12(1).
6. Alvarez M. Comportamiento del virus dengue en los últimos años. *LNR Arbovirus, IPK2023*.
7. Santana LMR, Baquero OS, Maeda AY, Nogueira JS, Chiaravalloti-Neto F. Spatio-temporal dynamics of dengue-related deaths and associated factors. *Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2022;64.
8. de León Gálvez F. Manual de Antivirales (No HIV)(Revisión Sistemática) Mayo 2012. 2012.
9. Amoros M, Sauvager F, Girre L, Cormier M. In vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie*. 1992;23(3):10.
10. Bustinza A. Propóleo: Un potencial tratamiento para el COVID-19. *SCientífica*. 2020;18(1):27-31.
11. Soroy L, Bagus S, Purnama I, Djoko W. The effect of a unique propolis compound (Propoelix TM) on clinical outcomes in patients with dengue hemorrhagic fever. *Infection and Drug Resistance*. 2014(7):323-9.
12. Giral T. Estudio preliminar de la actividad antiviral de un extracto acuoso de Propóleos-Rojo. [Tesis de Maestría]: Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí; 1997.
13. Rey FA. Dengue virus envelope glycoprotein structure: new insight into its interactions during viral entry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:6899-901.
14. Valdiviano SF, Mayta EM. Actividad antiviral in vitro del aceite esencial de *Ophryosporus peruvianus* contra los virus Zika y Dengue-2 [Tesis de pregrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2023.
15. Guzmán MG, Kourí GP, Morier L, Soler M, Fernandez A. A study of fatal hemorrhagic dengue cases in Cuba, 1981. *Bulletin of the Pan American Health Organization (PAHO)*; 18 (3), 1984. 1984.
16. Murrell S W, S-C & Butler ,M Review of dengue virus and the development of a vaccine *Biotechnology Advances* 2011;29(2)
17. Yabar C. Rol de las proteínas no estructurales en los eventos de replicación del ARN del virus dengue : propuesta de un modelo de replicación del ARN. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*. 2003;20(1).



18. Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB. Dengue infection. Nature reviews Disease primers. 2016;2:16055.
19. Arias J. EL dengue en Cuba. Revista panamericana Salud Pública. 2002;11(4).
20. Bifani AM, Siriphanitchakorn T, Choy MM. Intra-Host Diversity of Dengue Virus in Mosquito Vectors. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2022;12.
21. WHO Organization Facts Sheets (23 April 2024). <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/dengue-and-severe-dengue>.
22. Chen CC, Chang HC. Predicting dengue outbreaks using approximate entropy algorithm and pattern recognition. The Journal of infection. 2013;67(1):65-71.
23. Shoichet BKM, S. L ; Wei, B ; Irwin, J. J.C Lead discovery using molecular docking. Current opinion in chemical biology, 6(4), 439-446. Lead discovery using molecular docking. Current opinion in chemical biology. (2002). Lead discovery using molecular docking. Current opinion in chemical biology.; 6(4):439-46
24. Brathwaite Dick O, San Martin JL, Montoya RH, del Diego J, Zambrano B, Dayan GH. The history of dengue outbreaks in the Americas. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2012;87(4):584-93.
25. Messina JP, Brady OJ, Golding N, Kraemer MUG, Wint GRW, Ray SE, et al. The current and future global distribution and population at risk of dengue. Nat Microbiol. 2019;4(9):1508-15.
26. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clinical microbiology reviews. 1998;11(3):480-96.
27. Kouri G, Guzman MG, Bravo J. Hemorrhagic dengue in Cuba: history of an epidemic. Bulletin of the Pan American Health Organization. 1986;20(1):24-30.
28. Madani TA, Abuelzein el TM, Al-Bar HM, Azhar EI, Kao M, Alshoeb HO, et al. Outbreak of viral hemorrhagic fever caused by dengue virus type 3 in Al-Mukalla, Yemen. BMC infectious diseases. 2013;13:136.
29. Lau CL, Weinstein P, Slaney D. Dengue surveillance by proxy: travellers as sentinels for outbreaks in the Pacific Islands. Epidemiology and infection. 2013:1-7.
30. San Martin JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solorzano JO, Bouckenooghe A, Dayan GH, et al. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2010;82(1):128-35.
31. Yang X, Quam MBM, Zhang T, Sang S. Global burden for dengue and the evolving pattern in the past 30 years. Journal of travel medicine. 2021;28(8).
32. M Á. Comportamiento del virus dengue en los últimos años.LNR.Arbovirus ,IPK. 2023.
33. Plataforma de Información de Salud para las Américas .Plisas O, OMS. Situacion epidemiologica. 2023.
34. Cantelar de Francisco N, Fernandez A, Albert Molina L, Perez Balbis E. [Survey of dengue in Cuba. 1978-1979]. Revista cubana de medicina tropical. 1981;33(1):72-8.
35. Kouri G, Guzman MG, Valdes L, Carbonel I, del Rosario D, Vazquez S, et al. Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. Emerging infectious diseases. 1998;4(1):89-92.



36. Guzman MG, Alvarez A, Vazquez S, Alvarez M, Rosario D, Pelaez O, et al. Epidemiological studies on dengue virus type 3 in Playa municipality, Havana, Cuba, 2001-2002. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2012;16(3):e198-203.
37. Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Vazquez S, Morier L, Gonzalez D, et al. Dengue hemorrhagic Fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2006;75(6):1113-7.
38. M. A. Cinética y capacidad neutralizante de los anticuerpos homólogos y heterólogos contra serotipos de virus dengue en relación con el intervalo entre las infecciones, la secuencia de infección, duración de la viremia y la amplificación dependiente de anticuerpos en infecciones primarias y secundarias [PhD Thesis]. IPK2008.
39. Guzmán M, Vázquez S, Álvarez M, Pelegrino J, Ruiz D, P. M. Vigilancia de laboratorio de dengue y otros arbovirus en Cuba, 1970-2017. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2019;71(1).
40. M. A. Comportamiento del virus dengue en los últimos años. LNR Arbovirus, IPK2023.
41. Shresta S, Kyle JL, Snider HM, Basavapatna M, Beatty PR, Harris E. Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *Journal of virology*. 2004;78(6):2701-10.
42. Robertson MJ. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol Rev* 2002;71:173–83.
43. Navarro-Sanchez E, Despres P, Cedillo-Barron L. Innate immune responses to dengue virus. *Archives of medical research*. 2005;36(5):425-35.
44. Hombach J, Cardoso MJ, Sabchareon A, Vaughn DW, Barrett AD. Scientific consultation on immunological correlates of protection induced by dengue vaccines report from a meeting held at the World Health Organization 17-18 November 2005. *Vaccine*. 2007;25(21):4130-9.
45. Hombach J, Barrett AD, Cardoso MJ, Deubel V, Guzman M, Kurane I, et al. Review on flavivirus vaccine development. Proceedings of a meeting jointly organised by the World Health Organization and the Thai Ministry of Public Health, 26-27 April 2004, Bangkok, Thailand. *Vaccine*. 2005;23(21):2689-95.
46. Kuberski TT, Rosen L. Identification of dengue viruses using complement fixing antigen produced in mosquitoes. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1977;26(3):538-43.
47. Davis AC, Shulman MJ. IgM -molecular requirement for its assembly and function. *Immunology Today*. 1989;10:118-28.
48. Jefferis R, Kumararatne DS. Selective IgG subclass deficiency. *Clinical and Experimental Immunology*. 1990;81:357-67.
49. Rothman AL. T lymphocyte responses to heterologous secondary dengue virus infections. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009;1171 Suppl 1:E36-41.



50. Diamond MS, Roberts TG, Edgil D, Lu B, Ernst J, Harris E. Modulation of Dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons. *Journal of virology*. 2000;74(11):4957-66.
51. Khetarpal N, Khanna I. Dengue fever: causes, complications, and vaccine strategies. *J Immunol Res*. 2016;2016:6803098.
52. Tripathi NK, Shrivastava A. Recent Developments in Recombinant Protein-Based Dengue Vaccines. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1919.
53. Torresi J, Ebert G, Pellegrini M. Vaccines licensed and in clinical trials for the prevention of dengue. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2017;13:1059-72.
54. Burke DSM. *Fields Virology libro*. 2001.
55. Guy B, Lang J, Saville M. Vaccination against dengue: challenges and current developments. *Annu Rev Med*. 2016;67:387-404.
56. Vannice KS, Edge C, Dunleavy U. Clinical development and regulatory points for consideration for second-generation live attenuated dengue vaccines. *Vaccine*. 2018;36:3411-7.
57. Arredondo-García JL, Hadinegoro SR, Reynales H. Four-year safety follow-up of the tetravalent dengue vaccine efficacy randomized controlled trials in Asia and Latin America. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;24:755-63.
58. Halstead SB, Russell PK, Sun G. Protective and immunological behavior of chimeric yellow fever dengue vaccine. *Vaccine*. 2016;34:1643-7.
59. Sridhar S, Luedtke A, Langevin E. Effect of dengue serostatus on dengue vaccine safety and efficacy. *The New England journal of medicine*. 2018.
60. Guy B, Jackson N. Dengue vaccine: hypotheses to understand CYD-TDV-induced protection. *Nature reviews Microbiology*. 2015;14(nrmicro.2015.2):45.
61. Guy B, Noriega F, Ochiai RL. A recombinant live attenuated tetravalent vaccine for the prevention of dengue. *Expert review of vaccines*. 2017;16:1-13.
62. Arkin F. Dengue researcher faces charges in vaccine fiasco. *Science*. 2019;364(6438):320.
63. Dyer O. Philippines to charge Sanofi staff and government officials over dengue vaccine. *BMJ case reports*. 2019;364:l1088.
64. Sirivichayakul C, Barranco-Santana EA, Esquilin-Rivera I, Oh HM, Raanan M, Sariol CA, et al. Safety and Immunogenicity of a Tetravalent Dengue Vaccine Candidate in Healthy Children and Adults in Dengue-Endemic Regions: A Randomized, Placebo-Controlled Phase 2 Study. *The Journal of infectious diseases*. 2016;213(10):1562-72.
65. A. W-S. TAK-003 dengue vaccine as a new tool to mitigate dengue in countries with a high disease burden. *The Lancet*. 2024;12.
66. White LJ, Young EF, Stoops MJ, Henein SR, Adams EC, Baric RS, et al. Defining levels of dengue virus serotype-specific neutralizing antibodies induced by a live attenuated tetravalent dengue vaccine (TAK-003). *PLoS neglected tropical diseases*. 2021;15(3):e0009258.
67. Kallás EG, Cintra MAT, Moreira JA, Patiño EG, Braga PE, Tenório JCV, et al. Live, Attenuated, Tetravalent Butantan-Dengue Vaccine in Children and Adults. *The New England journal of medicine*. 2024;390(5):397-408.



68. Biswal S, Mendez Galvan JF, Macias Parra M, Galan-Herrera J-F, Carrascal Rodriguez MB, Rodriguez Bueno EP, et al. Immunogenicity and safety of a tetravalent dengue vaccine in dengue-naïve adolescents in Mexico City. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 2021;45:e67.
69. Whitehead SS, Durbin AP, Pierce KK, Elwood D, McElvany BD, Fraser EA, et al. In a randomized trial, the live attenuated tetravalent dengue vaccine TV003 is well-tolerated and highly immunogenic in subjects with flavivirus exposure prior to vaccination. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017;11(5):e0005584.
70. Kirkpatrick BD, Durbin AP, Pierce KK, Carmolli MP, Tibery CM, Grier PL, et al. Robust and Balanced Immune Responses to All 4 Dengue Virus Serotypes Following Administration of a Single Dose of a Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine to Healthy, Flavivirus-Naive Adults. *The Journal of infectious diseases*. 2015;212(5):702-10.
71. Thomas SJ, Eckels KH, Carletti I, De La Barrera R, Dessy F, Fernandez S, et al. A phase II, randomized, safety and immunogenicity study of a re-derived, live-attenuated dengue virus vaccine in healthy adults. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2013;88(1):73-88.
72. Schmidt AC, Lin L, Martinez LJ, Ruck RC, Eckels KH, Collard A, et al. Phase 1 Randomized Study of a Tetravalent Dengue Purified Inactivated Vaccine in Healthy Adults in the United States. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2017;96(6):1325-37.
73. Manoff SB, Sausser M, Falk Russell A, Martin J, Radley D, Hyatt D, et al. Immunogenicity and safety of an investigational tetravalent recombinant subunit vaccine for dengue: results of a Phase I randomized clinical trial in flavivirus-naïve adults. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2019;15(9):2195-204.
74. Danko JR, Kochel T, Teneza-Mora N, Luke TC, Raviprakash K, Sun P, et al. Safety and Immunogenicity of a Tetravalent Dengue DNA Vaccine Administered with a Cationic Lipid-Based Adjuvant in a Phase 1 Clinical Trial. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2018;98(3):849-56.
75. Crunkhorn S. Towards a pan-serotype dengue antiviral. *Nat Rev Drug Discov*. 2021;20(12):895.
76. Jafari Y, Brady OJ, Biggs JR, Lien LT, Mai HK, Nguyen HAT, et al. Could prophylactic antivirals reduce dengue incidence in a high-prevalence endemic area? *PLoS neglected tropical diseases*. 2024;18(7):e0012334.
77. Norshidah H, Vignesh R, Lai NS. Updates on Dengue Vaccine and Antiviral: Where Are We Heading? *Molecules*. 2021;26(22):6768.
78. Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Advances in virus research*. 2003;59:315-41.
79. Sampath A, Padmanabhan R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. *Antiviral research*. 2009;81(1):6-15.
80. Neufeldt CJ, Cortese M, Acosta EG, Bartenschlager R. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nature reviews Microbiology*. 2018;16(3):125-42. Isa DM, Chin SP, Chong WL, Zain SM, Rahman NA, Lee VS. Dynamics and binding



- interactions of peptide inhibitors of dengue virus entry. *Journal of Biological Physics*. 2019;45(1):63-76.
81. Smith JL, Sheridan K, Parkins CJ, Frueh L, Jemison AL, Strode K, et al. Characterization and structure-activity relationship analysis of a class of antiviral compounds that directly bind dengue virus capsid protein and are incorporated into virions. *Antiviral research*. 2018;155:12-9.
 82. Bhowmick S, Alissa SA, Wabaidur SM, Chikhale RV, Islam MA. Structure-guided screening of chemical database to identify NS3-NS2B inhibitors for effective therapeutic application in dengue infection. *Journal of Molecular Recognition*. 2020;33(7):e2838.
 83. Yao X, Ling Y, Guo S, He S, Wang J, Zhang Q, et al. Inhibition of dengue viral infection by diasarone-I is associated with 2'O methyltransferase of NS5. *European journal of pharmacology*. 2018;821:11-20.
 84. Nobori H, Toba S, Yoshida R, Hall WW, Orba Y, Sawa H, et al. Identification of Compound-B, a novel anti-dengue virus agent targeting the non-structural protein 4A. *Antiviral research*. 2018;155:60-6.
 85. Moquin SA, Simon O, Karuna R, Lakshminarayana SB, Yokokawa F, Wang F, et al. NITD-688, a pan-serotype inhibitor of the dengue virus NS4B protein, shows favorable pharmacokinetics and efficacy in preclinical animal models. *Science translational medicine*. 2021;13(579).
 86. Lim SP. Dengue drug discovery: Progress, challenges and outlook. *Antiviral research*. 2019;163:156-78.
 87. Soares LBF, Silva-Júnior EF, Moreira KA, Aquino PGV. Chapter 12 - Natural products for controlling dengue and its vectors. In: Atta ur R, editor. *Studies in Natural Products Chemistry*. 72: Elsevier; 2022. p. 423-64.
 88. Saqallah FG, Abbas MA, Wahab HA. Recent advances in natural products as potential inhibitors of dengue virus with a special emphasis on NS2b/NS3 protease. *Phytochemistry*. 2022;202:113362.
 89. Alagarasu K, Patil P, Kaushik M, Chowdhury D, Joshi RK, Hegde HV, et al. In Vitro Antiviral Activity of Potential Medicinal Plant Extracts Against Dengue and Chikungunya Viruses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022;12.
 90. Monsalve Escudero LM. Actividad antiviral in vitro e interacciones In silico de alcaloides indólicos aislados de *Tabernaemontana cymosa* frente a la infección por los virus Zika, Chikungunya y Dengue [Maestría]. Colombia: Universidad de Antioquia; 2019.
 91. Abd Kadir SL, Yaakob H, Mohamed Zulkifli R. Potential anti-dengue medicinal plants: a review. *Journal of natural medicines*. 2013;67(4):677-89.
 92. Organización Mundial de la Salud. Medicina tradicional. online: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>.
 93. Loaiza V, Monsalve LM, Bezerra C, Martinez M, Pergentino D. Antiviral Role of Phenolic Compounds against Dengue Virus: A Review. *Biomolecules*. 2021;11(11):28.
 94. Balasubramanian A, Pilankatta R, Teramoto T, Sajith AM, Nwulia E, Kulkarni A, et al. Inhibition of dengue virus by curcuminoids. *Antiviral research*. 2019;162:71-8.
 95. Cibanal I, Krepper G, Fernández L, Gallez L. Caracterización fisico-química de propóleos argentinos para su uso como biofungicida agrícola. 2017.



96. Fernández Sánchez OA. Estudio de propóleos a base de nemorosona: Composición química y Estabilidad. 2022.
97. Vargas RD, Torrescoano GR, Sánchez A. El propóleos: conservador potencial para la industria alimentaria. *Interciencia*. 2013;38(10):705-7.
98. Rojas MS, Torres A, Hoffmann W. Determinación de propiedades fisicoquímicas de propóleos provenientes de cinco especies de abejas sin aguijón de Norte de Santander-Colombia. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*. 2016;14(1):03-16.
99. Cuesta O, Piccinelli A, Campo M, Marquez I, Rosado A, Rastrelli L. Chemical Characterization of Cuban Propolis by HPLC–PDA, HPLC–MS, and NMR: the Brown, Red, and Yellow Cuban Varieties of Propolis. *Agricultural and Food Chemistry* 2007;55:7502–9.
100. Ramos F. Características físico-químicas y capacidad antioxidante de los propóleos del Estado de Guanajuato. 2016.
101. Bankova V. S. dC, S. L., & Marcucci, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. 2000;31(1):3-15.
102. Suarez MA, Rosende RO. Propiedades del Propóleo y su relación con la salud y la práctica odontológica. *Revista Facultad de Odontología*. 2013;VI(1).
103. Pobiega K, Gniewosz M, Kraśniewska K. Antimicrobial and antiviral properties of different types of propolis. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*. 2017;589(22):69-79.
104. Vargas R, Torrescoano G, Acedo E, Carvajal E, González A, Vallejo B, et al. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Commercial Propolis Extract in Beef Patties. *Journal of Food Science*. 2014;79(8):1499-504.
105. Rodríguez B, Canales M, Penieres J, Cruz T. Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos. 2020;30.
106. Geckil H, Ates, B., Durmaz, G., Erdogan, S., & Yilmaz, I. . Antioxidant, Free Radical Scavenging and Metal Chelating Characteristics of Propolis. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 2005;1(1):27-31.
107. Limón D, Díaz A, Mendieta L, Luna F, Zenteno E, J.. G. Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. *Mensaje Bioquímico*. 2010;34:143-54.
108. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*. 2012;27(1):76-89.
109. Farnesi AP, Aquino-Ferreira, R., De Jong, D., Bastos, J. K., & Soares, A.E.E. . , 8(2), . Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. *Genetics and Molecular Research*. 2009;8(2):635-40.
110. Šabanović M, Saltović S, Mujkić A, Jašić M, Bahić Z. Impact of Propolis on the Oral Health. *Balkan Journal of Dental Medicine* 2019:1-9.
111. Katircioglu H, Mercan N. Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different regions. *African Journal of Biotechnology*. 2006;5(11):3.



112. Herrera L, Piscioti M, Ramos O, Neira L, Pinzón J, Herrera A, et al. Actividad Antimicrobiana *in vitro* de un propóleo de Santander sobre *enterococcus faecalis*. Ustasalud. 2012;11:73-8.
113. Marielsa Gil1* AP, Riloarbert, Alvarado1, Yuneidi Arias1, Eucaris Blumenthal1. Actividad bacteriostática y bactericida de la tintura de propóleos sobre bacterias enteropatógenas. Salus [online]. 2012;16(3):21-5.
114. De Souza EC, Da Silva EJ, Cordeiro HK, Lage NM, Da Silva FM, Dos Reis DL, et al. Chemical compositions and antioxidant and antimicrobial activities of propolis produced by Frieseomelitta longipes and Apis mellifera bees. Quim Nova. 2018;41(5):1-7.
115. Saiz M, Serrano J. Propóleo: aplicaciones terapéuticas. NATURA MEDICATRIX. 2003;21(2):11.
116. Tolosa L, Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. Ars Pharmaceutica. 2002;43(1-2):187-204.
117. Pinargote Anchundia EG, Vélez Intriago EA. Actividad antimicrobiana in vitro del propóleo en el control de Escherichia coli y Staphylococcus aureus: Calceta: ESPAM MFL; 2024.
118. Guaraca AL, Palomino DL. Estudios de la composición química y actividad antibacteriana de muestras de propóleos de diferente localización geográfica. [Tesis de Maestría en Ciencias y Tecnología Cosmética]: Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador.; 2018.
119. Villanueva M, González M, Fernández H, Wilson M, Manquián N, Otth C, et al. Actividad antibacteriana in vitro de propóleos chilenos sobre Helicobacter pylori. Revista chilena de infectología. 2015;32(5):530-5.
120. Banskota A, Tezuka Y, Adnyana IK, Ishii E, Midorikawa K, Matsushige K, et al. Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. Phytomedicine. 2001;8(1):8.
121. Londoño-Orozco A, Pinieres-Carrillo JG, García-Tovar CG, Carrillo L, Quintero-Mora ML, García-Vásquez SE, et al. Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja Apis mellifera proveniente del Estado de México. Revista Tecnología en Marcha. 2008;21(1):ág. 49-55.
122. García J, Jarquin Y, Flores V, Conesa J. Antifungal Activity of Chitosan Biofilms Enriched with Stingless Bee Honey Against Colletotrichum gloeosporioides. Journal of Agricultural Sciences (Sri Lanka). 2024;19(2).
123. Dalben KF, Lopes ME, Estivalet TI, Marcos Luciano M. Antifungal Activity of Brazilian Propolis Microparticles against Yeasts Isolated from Vulvovaginal Candidiasis. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2011:8.
124. Becerra Miranda MP, Rendón Londoño TM. Actividad antifúngica de extractos de propóleos sobre el hongo fitopatógeno Fusarium oxysporum: alerta fitosanitaria en la industria del Banano. 2020.
125. GARCÍA PFA. Cubiertas comestibles de quitosano/propóleo y su efecto en la maduración, desarrollo de Aspergillus flavus y calidad sensorial, en frutos de higo, durante el almacenamiento controlado. 2022.



126. Hashem A, Abd-Allah E, Alwathnani HA. Effect of propolis on growth, aflatoxins production and lipid metabolism in *Aspergillus parasiticus* spear. *Pak J Bot.* 2012;44(3):1153-8.
127. Hussain MA, Hassan MS. Evaluation of propolis activity to inhibition of opportunistic fungi isolate from soil. *Plant Archives.* 2020;20(1):938-40.
128. Fuentes Esquivel DB, Pérez BR, Betancourt NT, García Tovar CG, Penieres Carrillo JG, Galindo FH, et al. In Vitro Antimycotic Activity and Structural Damage against Canine *Malassezia pachydermatis* Strains Caused by Mexican Stingless Bee Propolis. *Veterinary Sciences.* 2024;11(3):106.
129. Song M-Y, Lee D-Y, Kim E-H. Anti-inflammatory and anti-oxidative effect of Korean propolis on *Helicobacter pylori*-induced gastric damage in vitro. *Journal of Microbiology.* 2020;58:878-85.
130. Pereira PM. Potencial modulador da própolis marrom de araucária sobre o processo inflamatório, analgesia e artrite reumatoide. 2022.
131. Naik DM, A. & Vaidya, H. . Anti-inflammatory activity of propolis from Maharashtra, India. *J Apicultural Res.* 2013;52(2):35-43.
132. Núñez RD, Balboa PN, Alvear ZM, Ceron A, Abarzua SK, Vasconcellos CA. Evaluación de la Actividad Anti-inflamatoria de Propóleos Chileno sobre Cortes Histológicos de Orejas de Ratón. *Int J Morphol.* 2018;36(1):189-93.
133. Aparecida S, Diniz MAN, Passos S, Costa ML, de Lourdes M, Carmona D. Brazilian Green Propolis Inhibits Inflammatory Angiogenesis in a Murine Sponge Model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2011:7.
134. del Río E, Casas V, Gómez E, Gil J, Abdala R, Figueroa F. Estudio de la actividad antioxidante y antitumoral del propóleo. *Ars Pharmaceutica.* 2017;58(2):75-81.
135. Oršolic N, Bašić I. Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2005;59:10.
136. Chen C-N, Weng M-S, Wu C-L, Lin J-K. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2004;1(2):175-85.
137. Oršolic N, Bašić I. Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. *Journal of Ethnopharmacology.* 2005;102:9.
138. Gruenberger T, Gorlitzer M, Soliman T, Rudas M, Mittlboeck M, Gnant M, et al. It is possible to omit postoperative irradiation in a highly selected group of elderly breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment.* 1998;50:37-46.
139. Muñoz LC, Linares SE, Narváez W. Propiedades del propóleo como aditivo natural funcional en la nutrición animal. *Biosalud.* 2011;10(2):11.
140. BH. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology y Therapeutics.* 2002;96(2-3).
141. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia.* 2002;73:S1-S6.



142. Bachiega TF, Orsatti CL, Pagliarone AC, Sforcin JM. The effects of propolis and its isolated compounds on cytokine production by murine macrophages. *Phytotherapy Research*. 2012;26(9):1308-13.
143. Ripari N, Alves A, da Silva M, Lopes F, Ingrid K, K.; B, et al. Propolis antiviral and immunomodulatory activity: a review and perspectives for COVID-19 treatment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2021;73(3):19.
144. Ivanovska ND, Dimov VB, Pavlova S, Bankova V, Popov S. Immunomodulatory action of propolis. V. Anticomplementary activity of water soluble derivative. *Journal of Ethnopharmacology*. 1995;47:9.
145. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol*. 1999(64):235-40.
146. Bustinza Pacajes A. Propóleo: Un potencial tratamiento para el COVID-19. *Propolis: A potential treatment for COVID-19. Rev SCientífica* 2020; 18(1).
147. Guanche D. Evaluación de diferentes extractos de propóleos. *Rev CENIC Cienc Biol*. 2022;53(3).
148. Vaculik P, Cardozo B, Pérez S, Rosende R, Juárez R. Aplicaciones del Propóleo en Ciencias de la salud. *Revista facultad de odontología* 2011;IV (1):43-7.
149. Oliva M, L ;Fragas Valdés,R ; Bordonado Ramírez,R ; Santana,J,L ; González Oramas,E y Merino,A.. ENFERMEDAD DE PEYRONIE. EVALUACIÓN DE TRES MODALIDADES TERAPÉUTICAS: PROPÓLEO, LÁSER Y PROPÓLEO + LÁSER. 2005; 58, 9 (931-935).
150. Abreu EC, E ;Riveros ,A ;Padrón M.. Actividad anticaries de una cream dental con propoleos. 2000;37(3):166-70.
151. Solanellas G. Propolis for Herpes simplex lesions: Review of the evidence and design of a lipstick for its application [Licenciatura]: Universidad de Barcelona; 2019.
152. Sevda DAT, A. ; Galeotti, F ; U Garzarella, E ; Zaccaria,V ; Volpi, N ; Karagoz, A ; Sahin,F.. . Antiviral activity of different extracts of standardized propolis preparations against HSV 10.3851/IMP3383
153. Zellweger RM, Shresta S. Mouse models to study dengue virus immunology and pathogenesis. *Frontiers in immunology*. 2014;5.
154. St John AL, Abraham SN, Gubler DJ. Barriers to preclinical investigations of anti-dengue immunity and dengue pathogenesis. *Nature reviews Microbiology*. 2013;11(6):420-6.
155. Frias-Staheli N, Dorner M, Marukian S, Billerbeck E, Labitt RN, Rice CM, et al. Utility of humanized BLT mice for analysis of dengue virus infection and antiviral drug testing. *Journal of virology*. 2014;88(4):2205-18.
156. Sabin AB, Schlesinger RW. Production of Immunity to Dengue with Virus Modified by Propagation in Mice. *Science*. 1945;101(2634):640-2.
157. Lee YR, Hu HY, Kuo SH, Lei HY, Lin YS, Yeh TM, et al. Dengue virus infection induces autophagy: an in vivo study. *J Biomed Sci* 2013;20:65.



158. Zhao H, Jiang T, Zhou XZ, Deng YQ, Li XF, Chen SP, et al. Induction of neutralizing antibodies against four serotypes of dengue viruses by MixBiEDIII, a tetravalent dengue vaccine. *PloS one*. 2014;9(1):e86573.
159. Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet*. 2015;385:453-65.
160. Chen LH, Wilson ME. Transmission of dengue virus without a mosquito vector: nosocomial mucocutaneous transmission and other routes of transmission. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2004;39(6):e56-60.
161. Chen HC, Hofman FM, Kung JT, Lin YD, Wu-Hsieh BA. Both virus and tumor necrosis factor alpha are critical for endothelium damage in a mouse model of dengue virus-induced hemorrhage. *Journal of virology*. 2007;81(11):5518-26.
162. Russell WMS, RL. B. *The principles of humane experimental technique*. Methuen & Co Ltd, London, England. 1959.
163. WHO/TDR. *Handbook: good laboratory practice (GLP): quality practices for regulated non-clinical research and development*. (2nd ed ed2009.).
164. Guittin P, T. D. Future improvements and implementation of animal care practices within the animal testing regulatory environment. *ILAR Journal*. 2002;43(1):S80-4.
165. DB. M. *Removal of blood from laboratory mammals and birds*. Laboratory Animal Ltd Royal Society of Medicine Press. 2001.
166. Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, J. B. *Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1 Laboratory animals*. 1996;30:293-316.
167. Seidle T., Robinson S., Holmes T., Creton S., Prieto P., J. S, et al. Cross-sector review of drivers and available 3Rs approaches for acute system toxicity testing. *Toxicological Sciences* 2010;116:382-96. .
168. Vega N, Ramirez R, Alvarez M, Del Barrio G, Guanche D. Caracterización de extractos alcohólicos de propóleos cubanos como antiviral contra el virus dengue 2 [Maestría]. *Biblioteca del IPK: Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri (IPK)*; 2023.
169. Chan PK., W. H. *Principles and methods for acute and subchronic toxicity*. In: *Principles and methods of toxicology*. New York: Raven Press. 1986:1-51.
170. PÉREZ MR, RODRIGUEZ C, LEON OS, RODRIGUEZ SS, ALVAREZ D, CASTAÑEDA J, et al. Evaluación Toxicológica de una Tintura de Propóleos. *Acta Farm Bonaerense*. 2003;22(1):4.
171. Seijo M, Meneses A, Marrero O, Águila E, Castañedo Z. *Estudios de seguridad toxicológica de la Tintura Hidroalcohólica de Propóleos producida en el Centro de Bioactivos Químicos: Universidad Central «Marta Abreu» de Las Villas*; 2022.
172. Hwang S, Hwang S, Jo M, Lee CG, KJ. R. Oral administration of Korean propolis extract ameliorates DSS-induced colitis in BALB/c mice. . *Int J Med Sci* 2020 17(13):1984-91.
173. Shimizu T, Takeshita Y, Takamori Y. Efficacy of Brazilian propolis against herpes simplex virus type 1 infection in mice and their modes of Antiherpetic efficacies. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011:61-96.



174. Arvouet-Grand A, Lejeune B, Bastide P, Pourrat A, LP. PAM. Propolis Extract. I. Acute Toxicity and Determination of Acute Primary Cutaneous Irritation. *J Pharm Belg.* 48(3):165-70.
175. Ramadan A, Soliman G, Mahmoud SS, Nofal SM, RF. A-R. Evaluation of the safety and antioxidant activities of *Crocus sativus* and Propolis ethanolic extracts. *J Saudi Chem Soc [Internet]*. 2012;16(1):13-21.
176. Mohammadzadeh S, Shariatpanahi M, Hamedi M, Ahmadkhaniha R, Samadi N, SN. O. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food Chemistry*. 2007;103:1097-103. .
177. Pérez Capote MR, Rodríguez Torres CC, Leon Fernández OS, Rodríguez SS, Alvarez D, J. C. Evaluación toxicológica de una tintura de propóleos. *Acta Farm Bonaer*. 2003;22(1):61-4.
178. Cuesta OR. Estudios sobre propóleos. [Tesis en opción al título de Master en Química Farmacéutica]: Universidad de La Habana.; 1996.
179. Yosri N, Abd El-Wahed AA, Ghonaim R, Khattab OM, Sabry A, Ibrahim M, et al. Anti-Viral and Immunomodulatory Properties of Propolis: Chemical Diversity, Pharmacological Properties, Preclinical and Clinical Applications, and In Silico Potential against SARS-CoV-2. *Foods*. 2021;10:47.
180. Lima LD, Andrade SP, Campos PP, et al. Brazilian green propolis modulates inflammation, angiogenesis and fibrogenesis in intraperitoneal implant in mice. . *BMC Complement Altern Med*. 2014;14(1):1-9.
181. Kalia P, Kumar N, Harjai K. Studies on the effect of ethanolic extract of propolis in BALB/c mice *Applied and Natural Science*. 2014;6(2):638-43
182. Shimizu T, Hino A, Tsutsumi A, Park YK, Watanabe W, Kurokawa M. Anti-influenza virus activity of propolis in vitro and its efficacy against influenza infection in mice. *Antivir Chem Chemother*. 2008(19):7-13.
183. Sartori G, Pesarico AP, S P. Protective effect of brown Brazilian propolis against acute vaginal lesions caused by herpes simplex virus type 2 in mice: involvement of antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. . *Cell Biochem Funct* 2012;30(1):1-10.
184. Paes MVP, A. T. ; Barreto, D. F. ;Costa, S. M. ;Oliveira, M. P. ;Nogueira, A. C ;... & Barth, O. M.. Liver injury and viremia in mice infected with dengue-2 virus. *Virology*. 2005;338(2).
185. Débora Ferreira Barretol CMTHGSRMRNJdCF-FOMB. Histopathological and ultrastructural aspects of mice lungs experimentally infected with dengue virus serotype 2. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102(2).
186. S. Sakinah aSK, a Rusheni Munisvaradass,b Pooi-Ling Mok,b,c Hui-Yee Chee,a Arivudainambi Seenichamy,d Kiruthiga P.V,e Akon Higuchi,f,g,h Mariappan Rajan,i K. Nataraja Seenivasan,j Marlina,k Palanisamy Arulselvan,l Giovanni Benelli,m,n and S. Suresh Kumara,c,l. Repeated infections of dengue (serotype DENV-2) in lung cells of BALB/c mice lead to severe histopathological consequences. *Pathog Glob Health*. 2018;112(5):259-67. .