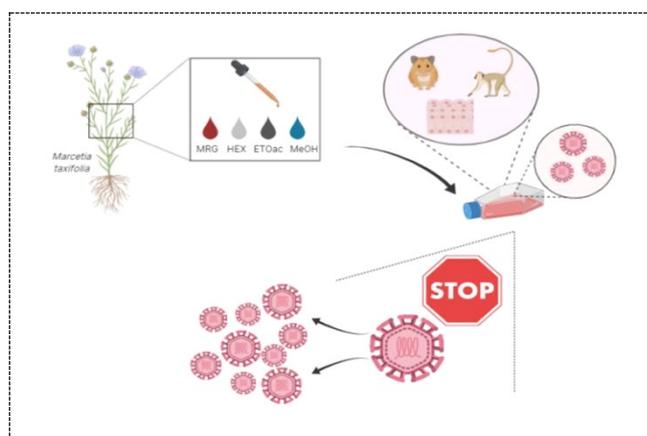


**“Evaluación *in vitro* de la citotoxicidad de extractos vegetales de *Marcetia taxifolia* en cultivos celulares para inhibir la proliferación del virus del Zika”**

**“*In vitro* evaluation of the cytotoxicity of plants extracts of *Marcetia taxifolia* in cell cultures to inhibit the proliferation of the Zika virus”**



**Graphical abstract**

**Inhibición de la proliferación del virus del Zika por acción de extractos de *Marcetia taxifolia*.**

**“Evaluación *in vitro* de la citotoxicidad de extractos vegetales de *Marcetia taxifolia* en cultivos celulares para inhibir la proliferación del virus del Zika”**

***“In vitro evaluation of the cytotoxicity of plants extracts of *Marcetia taxifolia* in cell cultures to inhibit the proliferation of the Zika virus”***

Denis Sofía León Colmenares<sup>1</sup> Anny Karely Rodríguez Fersaca<sup>2</sup> Monica Losada Barragán<sup>2</sup> Felio Jesús Bello García<sup>3</sup> Orlando Alfredo Torres García<sup>4</sup> Ana Luisa Muñoz Ramírez<sup>2</sup>

<sup>2</sup> Universidad Antonio Nariño/ Facultad de Ciencias, Bogotá, Colombia.

<sup>3</sup> Universidad de La Salle/ Facultad de Ciencias Agrícolas y Ganaderas, Programa de Medicina Veterinaria, Bogotá, Colombia

<sup>4</sup> Universidad Antonio Nariño/ Facultad de Medicina Veterinaria, Bogotá, Colombia.

<sup>1</sup>Universidad Antonio Nariño/ Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias, Bogotá, Colombia.

## **Resumen**

La infección por el virus del Zika es una problemática reincidente a nivel mundial, afectando desde mujeres embarazadas y niños, hasta ancianos, conllevando a complicaciones, que podrían incluso ser letales, como lo son la microcefalia que se observa en fetos y bebés infectados por el virus durante la etapa de gestación. Adicionalmente, otras complicaciones observadas son las manifestaciones neurológicas, como el síndrome de Guillain-Barré, que pueden aparecer durante la fase aguda de la infección o después de ella. El síndrome afecta los nervios que controlan el movimiento de los músculos y los nervios que transmiten el dolor, el calor y el tacto. Esto puede provocar debilidad muscular y pérdida de sensibilidad en piernas o brazos, e incluso en el peor de los casos puede causar la muerte. Aunque las personas de todas las edades pueden verse afectadas, es más común que se dé entre adultos y hombres. A pesar de ello, no existe un tratamiento antiviral específico para esta infección, por lo tanto, el objetivo principal de este proyecto fue evaluar la citotoxicidad de

extractos naturales de *Marcetia taxifolia* frente a cultivos celulares derivados de mamíferos, para un posterior estudio de éstos frente al virus del Zika. Para ello se realizó una serie de diluciones a cada uno de los extractos de *Marcetia taxifolia*, en diferentes concentraciones (1, 10, 50, 100, 200 y 300 ug/mL) fueron puestas en interacción con dos líneas celulares diferentes (BHK-21 y Vero) para la posterior determinación de su citotoxicidad. Con estos resultados, se espera más adelante hacer ensayos de inhibición viral.

Además, se espera demostrar que es posible incluir el uso de compuestos bioactivos extraídos de *Marcetia taxifolia* como potenciales productos antiinfecciosos, pudiendo ser un método eficaz, biosostenible y eficiente en el control de este tipo de infección.

### **Abstract**

Zika virus infection is a recurrent problem worldwide, affecting pregnant women and children, to the elderly, leading to complications, which could even be lethal, such as microcephaly observed in fetuses and babies infected by the Zika virus. virus during the gestation stage. Additionally, other complications observed are neurological manifestations, such as Guillain-Barré syndrome, which can appear during the acute phase of infection or after it. The syndrome affects the nerves that control muscle movement and the nerves that transmit pain, heat, and touch. This can lead to muscle weakness and loss of sensation in the legs or arms, and even in the worst case it can lead to death. Although people of all ages can be affected, it is more common in adults and men. Despite this, there is no specific antiviral treatment for this infection, therefore, the main objective of this project was to evaluate the cytotoxicity of plants extracts of *Marcetia taxifolia* against cell cultures derived from mammals, for a subsequent study of these against the Zika virus. For this, a series of dilutions was made to each of the *Marcetia taxifolia* extracts, in different concentrations (1, 10, 50, 100, 200 and 300 ug / mL) they were put in interaction with two different cell lines (BHK-21 and Vero) for the subsequent determination of its cytotoxicity. With these results, it is expected later to do viral inhibition tests.

In addition, it is expected to demonstrate that it is possible to include the use of bioactive compounds extracted from *Marcetia taxifolia* as potential anti-infective products, which can be an effective, biosustainable and efficient method in the control of this type of infection.

**Keywords:** Zika, *Marcetia taxifolia*, citotoxicidad, susceptibilidad viral.

## Introducción

El virus Zika pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*, el cual es transmitido por vectores, mosquitos del género *Aedes aegypti*, con una alta prevalencia principalmente en las regiones tropicales sur-Asia pacífico y América, aunque está distribuido por casi todo el mundo (1). En el año 2016, la Organización Panamericana de la Salud – OPS expuso que, 48 países de las Américas informaron de más de 530.000 casos sospechosos de la enfermedad, de los cuales 175.063 fueron casos confirmados, igualmente, 22 países y territorios notificaron 2.439 casos de síndrome congénito asociado con el Zika (2).

El virus del Zika hace viremia en los humanos, por ello, mosquitos hembra, durante su alimentación, se infectan, tras lo cual el virus infecta el intestino del mosquito generando posteriormente una propagación sistémica durante un periodo de 10 días. Después de este periodo de incubación, el virus se puede transmitir a otros seres humanos durante la picadura y posterior alimentación del mosquito (3). Después de esta picadura, el virus ingresa a la célula diana en una interacción mediada por la proteína E, presente en la envoltura viral, permitiendo así la unión a receptores específicos celulares ya posterior fijación y fusión final de la partícula viral a la célula hospedadora. Posteriormente, mediante la endocitosis, el virión entra en el citoplasma de las células, donde las proteínas no estructurales permiten la replicación del ARN viral, para que después de la expresión proteica viral, las células sean sometidas a apoptosis y autofagia, liberando así partículas de virus, que luego llegan al sistema linfático y a la sangre, desde donde el virus se dispersa, produciendo las manifestaciones clínicas (4).

La sintomatología generalmente aparece luego de un periodo de incubación de 3 a 14 días, y similar a lo ocurrido en otras infecciones por arbovirus, estas son: erupciones cutáneas, fiebre, conjuntivitis, mialgia, malestar general y cefalea, los cuales se mantienen entre 4 y 7 días (5)(6). A pesar de que es poco común, la infección también puede provocar un compromiso articular, sin embargo, este compromiso tiende a ser leve.

Por otro, lado también se han descrito manifestaciones neurológicas como complicación de la infección, las cuales pueden aparecer durante la fase aguda de la infección o después de esta (7). Unos ejemplos muy claros de los daños al sistema nervioso son: el síndrome

de Guillan-Barré, una complicación neurológica frecuente que afecta el movimiento muscular, así como los nervios que transmiten el dolor, el calor y el tacto. Esto puede provocar debilidad muscular y pérdida de sensibilidad en piernas o brazos, y en el peor de los casos, la muerte (8). Hacia el 2016, el Ministerio de Salud vinculó el Zika como responsable de 3 muertes de personas con Guillain-Barré, que en una pequeña proporción de los casos se puede presentar como alguna de sus variantes, síndrome de Miller-Fisher u otras mononeuritis craneales (9). Otras complicaciones neurológicas asociadas a la infección por Zika incluyen encefalitis, meningoencefalitis, cerebelitis, encefalomiелitis aguda diseminada, mielitis y alteraciones aisladas de los nervios craneales, como neuritis óptica (10), condiciones todas ellas discapacitantes para quien las padece.

Adicionalmente, si al momento de producirse la infección la hospedera se encuentra en estado de embarazo, pueden presentarse varios inconvenientes, uno de estos es la microcefalia, que presentó una incidencia a nivel mundial de 1,3 a 150 / 100.000 neonatos en el año 2017 (11). En Colombia, el promedio histórico anual de casos de microcefalia es de 140, dato tomado entre los años 2010 a 2015, lo que representa alrededor de 3 casos identificados semanalmente (12).

Si se revisa la epidemiología a nivel nacional, se puede evidenciar que en el año 2020 aún se siguen notificando casos. Hasta la semana 17 se informó acerca de 111 casos de enfermedad por el virus del Zika, de los cuales, el 67,6% (75) de los casos proceden de: Cali (19), Tolima (16), Cundinamarca (13), Antioquia (8), Caquetá (7), Santander (6) y Valle del Cauca (6). En cuanto a los grupos susceptibles (ancianos, niños, embarazadas) se han notificado 11 casos (9,9%) en gestantes, 16 (14,4%) en menores de 1 año y uno mayor de 65 años (0,9%) (13).

Un factor determinante en la circulación y mantenimiento del virus es la relación vector - vertebrado, lo que favorece la propagación incontrolada de este agente infeccioso a través de amplias regiones a nivel mundial. Tres factores han tenido impacto esta propagación: el primero es la desmedida proliferación de la población de su principal vector, mosquitos de la especie *Aedes aegypti*. El segundo factor es la cantidad de reservorios del mosquito existentes y el tercero, la facilidad del vector para transferir este Flavivirus, haciendo que sea baja la probabilidad de su erradicación. Otros factores implicados en el exacerbado aumento de la circulación del virus son: ambientales, tales como el calentamiento global;

sociales, tales como el crecimiento poblacional, la colonización desmedida y la pobreza extrema lo cual está implícito en la incidencia de propagación del virus (14).

Pese a la alta incidencia de presentación de esta infección y a sus severas y frecuentes complicaciones, hasta el momento no existe ningún tratamiento específico para su control. Por ello el uso de extractos vegetales es una herramienta viable para el desarrollo de un tratamiento antiviral.

Basados en las prácticas médicas tradicionales, creencias y conocimientos de la cultura indígena, se ha informado acerca de la actividad antiviral de los productos naturales fundamentados en el conocimiento, experiencia y prácticas, tratando infecciones y diferentes enfermedades en animales y humanos, por ello tienden a convertirse en la materia prima del desarrollo de medicamentos, por ello algunos países asiáticos y africanos emplean la medicina natural como su herramienta de atención primaria en salud debido a la economía, tradición y restricción geográfica. (15).

Extractos vegetales de diferentes plantas se han venido empleando desde hace años en diferentes usos medicinales, por ejemplo extractos de *Marcetia taxifolia* se ha usado como antiinflamatorio (16), extractos de las raíces de *Scutellaria baicalensis* han sido ampliamente utilizados en el tratamiento de inflamación, cáncer, enfermedades infecciosas, hipercolesteremia e hipertensión (17). También está el extracto natural de *houltuynia cordata* que contiene propiedades anti-virulentas, no es tóxico (18), y posee propiedades inhibitorias prometedoras, en la proliferación del virus del dengue, fundamentalmente contra virus envueltos, que son de gran importancia e impacto clínico. Para apoyar estas observaciones se ha demostrado que la fracción de acetato de etilo (EA) de *houltuynia cordata* es eficaz en la inhibición de la infectividad de virus envueltos tales como el virus del dengue (19).

De igual manera existen varios estudios que apoyan el uso de extractos naturales como antivirales específicos con compuestos importantes, fundamentalmente gracias a compuestos como polifenoles y flavonoides. Las hojas del té verde contiene grandes cantidades de un polifenol llamado galato de epigallocatequina, el cual ha demostrado tener actividad antiviral, inhibiendo la entrada del virus en la célula huésped (20). La *Lippia alba*

es una planta aromática, con la cual se realizaron estudios para determinar si presenta actividad antiviral frente a células de insectos C6/36 y mamíferos Vero-E6, para establecer ello, utilizaron los aceites esenciales obtenidos de la totalidad de la planta a concentraciones desde 5.22 µg/ml hasta 400.8 µg/ml y finalmente, se determinó que a una concentración de 13.36 µg/ml presentan una actividad antiviral óptima contra virus Zika (21). Por último, la *Ocimum basilicum* o comúnmente conocida como albahaca es una hierba utilizada en varios países en sus comidas diarias, los autores P.Singh et al, utilizaron su extracto a diferentes diluciones, 1:16, 1:32, 1:64, 1: 128, 1: 256 y 1: 512 sobre células Vero E6, para demostrar su potencial antiviral, y según los resultados pudieron concluir que el extracto si inhibe la proliferación del virus en este tipo de células, finalmente, esta inhibición varía del 13 al 97% dependiendo de la dilución de extracto que se emplee, siendo la dilución 1:16 la que más porcentaje de inhibición mostró, una reducción del 97% en la infectividad del virus (22).

Lo que tienen en común todas estas plantas, es la presencia de ciertos metabolitos secundarios, llamados polifenoles y flavonoides, los cuales ya han sido reportados como potenciales antivirales, por ello se puede afirmar que la estrategia terapéutica antiviral partiendo de extractos vegetales es viable y sostenible económicamente.

Como se mencionó, hasta el momento no existe, ni se ha aceptado formalmente un tratamiento antiviral específico para la infección producida por el virus del Zika. Lo cual representa la problemática más grande, teniendo en cuenta la morbilidad que se ha presentado en los últimos años, por ello este trabajo de grado busca realizar estudios para determinar la capacidad antiinfecciosa de extractos vegetales de *Marcetia taxifolia*, ya que se ha reportado que tiene compuestos con potencial antiviral, como lo son los flavonoides y los polifenoles, y que además han presentado tener una actividad medicinal importante desde hace varias décadas demostrada, sin embargo, no se ha profundizado ningún estudio en ninguno de los extractos de dicha planta.

En respuesta se plantea el objetivo de investigar cuál es el nivel de citotoxicidad de extractos de *Marcetia taxifolia* frente cultivos celulares derivados de mamíferos, para un posterior estudio de estos frente al virus del Zika.

## 1. Materiales y Métodos

Para establecer la determinación de la citotoxicidad de extractos de *Marcetia taxifolia* en las líneas celulares BHK-21 y Vero primero se estableció la densidad celular óptima de BHK-21 y Vero.

**Obtención de los extractos:** Los extractos fueron obtenidos de la planta *Marcetia taxifolia*, colectada en el Amazonas Venezolano y suministrados por los Doctores Suarez y Rangel del Instituto Venezolano de investigaciones científicas (IVIC), co-investigadores de este proyecto. La planta recolectada se secó a temperatura ambiente (25°C) por dos semanas. Se tomó el tallo para ser molido y sometido a extracción por maceración secuencial con metanol (MeOH) y acetato de etilo (ETOAc). Se obtuvieron dos fracciones que se purificaron por cromatografía de columna con sílice gel empleando como eluyente CHCl<sub>3</sub> obteniendo los compuestos: 5-Hydroxy-3,6,7,8,3',4'- hexamethoxyflavona (HEX) y mirecetina 3-(6-rhamnosylgalactosida) (MRG)

**Líneas celulares:** Para la infección viral, se emplearan las líneas celulares, BHK-21 (Baby Hamster Kidney-21, por sus siglas en inglés) y Vero (fibroblastos de riñón de mono verde Africano), (4). Las dos líneas celulares se mantuvieron en medio esencial mínimo modificado (MEM), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% e incubadas a una temperatura de 37°C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

**La línea celular BHK-21** fue elegida debido a que esta línea posee un rápido crecimiento, pases ilimitados y alta eficiencia de plaqueo, además se considera que esta línea celular es un excelente sustrato para la producción de varios virus (4).

Por otro lado, **la línea celular Vero** fue elegida por su susceptibilidad a un amplio rango de virus, siendo empleada para la fabricación de vacunas (23). Así mismo, se ha reportado que este sustrato es apropiado para el aislamiento y la replicación productiva de virus (24).

**Determinación de la densidad celular:** El ensayo de MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide) se usa para determinar una cantidad de células viables en estudios de proliferación, citotoxicidad y otros. Este ensayo se basa en la conversión celular de la sal tetrazolium en un formazán, el cual es un producto de fácil detección utilizando un lector de placas de 96 pocillos.

La curva de proliferación de cada una de las líneas celulares se obtuvo mediante este método, para ello se llevó control de la absorbancia de cada línea celular a las 24, 48, 72 y 96 horas, después de ser sembradas a diferentes concentraciones (desde 15.000 hasta 60.000 células/pozo) cada una por triplicado, finalmente, para la selección de la densidad óptima se tuvo en cuenta la concentración a la cual las células mostraran un mejor comportamiento, donde se evitara la inhibición por contacto que suele ser un problema en todos los ensayos(25).

Por otra parte, se realizó un ensayo con azul de tripán para la determinación de la viabilidad celular e integridad de la membrana, el cual consistió en teñir las células con azul de tripán y luego hacer un conteo en la cámara de Neubauer, para determinar que células se tiñeron (células no viables y con poca integridad en la membrana) y cuales permanecieron intactas (células viables y con buena integridad) los datos obtenidos también fueron por triplicado (26).

**Determinación de la Citotoxicidad:** Los extractos fueron obtenidos de la planta *Marcetia taxifolia*, colectada en el Amazonas Venezolano y suministrados por los Doctores Suarez y Rangel del Instituto Venezolano de investigaciones científicas (IVIC), co-investigadores de este proyecto. La planta recolectada se secó a temperatura ambiente (25°C) por dos semanas. Se tomó el tallo para ser molido y sometido a extracción por maceración secuencial con metanol (MeOH) y acetato de etilo (ETOAe). Se obtuvieron dos fracciones que se purificaron por cromatografía de columna con sílice gel empleando como eluyente CHCL 3 obteniendo los compuestos: 5-Hydroxy-3,6,7,8,3',4'- hexamethoxyflavona (HEX) y mirecetina 3-(6-rhamnosylgalactosida) (MRG). Ya en la UAN, para los ensayos de citotoxicidad cada extracto fue disuelto en dimetil sulfoxido (DMSO) a las concentraciones de 1, 10, 50, 100, 200 y 300 µg/MI, teniendo en cuenta que la concentración de DMSO no fuera superior al 1%.

Se manejaron células al 90% de confluencia, las cuales fueron tripsinizadas, contadas en cámara de Neubauer, y luego transferidas a placas de microtitulación de 96 pozos para determinar la citotoxicidad de los diferentes compuestos purificados. Para ello se usó la metodología descrita por Mosmann, la cual se fundamenta en la reducción del compuestos MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide) (27). Para estos ensayos la densidad celular que fue determinada fue de 30.000 células/pozo, según los resultados de la curva de proliferación, lo que concedió una señal de densidad óptica no

saturada del MTT. La citotoxicidad fue estimada después de un período de incubación de 24 h, luego las células fueron tratadas por períodos de 24 h y 48 h con cada uno de los extractos a diferentes concentraciones (1, 10, 50, 100, 200 y 300 ug/mL). El efecto de los extractos a las 24 y 48h de incubación se detectó mediante el ensayo colorimétrico, en el cual se agregaron 10 µL de una solución de 5 mg/mL de MTT (*Sigma*) a cada uno de los pozos y se incubó a 37 °C durante 4 h. Posteriormente el medio fue eliminado y el formazán generado por la actividad de la deshidrogenasa en las células, fue disuelto en detergente (100 µL/pozo). La cantidad de MTT-formazán, que es directamente proporcional al número de células vivas, se determinó midiendo la absorbancia (DO) en un lector de micro placas de ELISA a 570 nm, empleando 620 nm como referencia (28). Una vez se obtuvieron los datos de las absorbancias por triplicado se halló el porcentaje de supervivencia mediante la ecuación 1 y con ello, finalmente se determinó la concentración citotóxica media (CC<sub>50</sub>), realizando un análisis mediante el software GraphPad Prism 8 (29)(30).

$$\% \text{supervivencia} = \frac{X_{\text{abs.tratamiento}}}{X_{\text{abs.ctrl}}} * 100 \quad \text{Ecuación 1.}$$

Donde Xabs. Tratamiento hace referencia al promedio de la absorbancia del tratamiento con el extracto. Y Xabs. Ctrl es el promedio de la absorbancia del control positivo, en este caso DMSO.

## 2. Resultados y Discusión

### Proliferación celular por MTT de BHK-21 y Vero

Se utilizaron dos métodos diferentes para medir la proliferación de ambas líneas celulares, MTT y azul de tripán. Con MTT se manejaron diferentes concentraciones (60.000, 45.000, 30.000, 15.000 células/pozo) y se midió su absorbancia a las 24, 48, 72 y 96 horas. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Se determinó que la concentración de 30.000 células/pozo fue la que demostró tener un mejor comportamiento en ambas líneas celulares, debido a que para hacer los ensayos de citotoxicidad las células deben tener el 70% de confluencia, por lo tanto, a esta concentración muestra una confluencia adecuada, después de las 16 horas de adsorción.

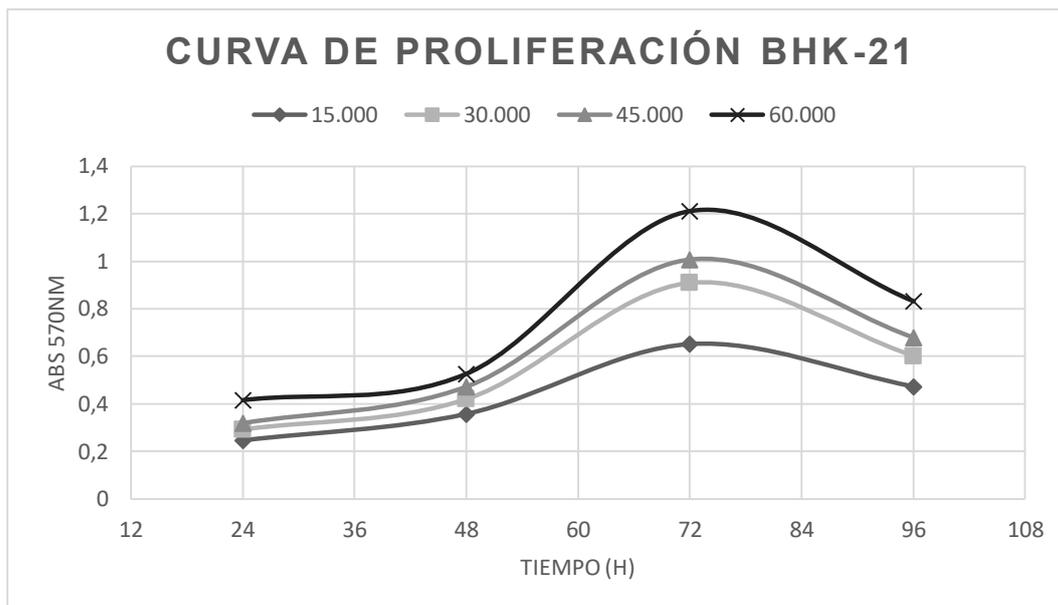


Figura 1. Curva de proliferación línea celular BHK-21 determinada según el método MTT.

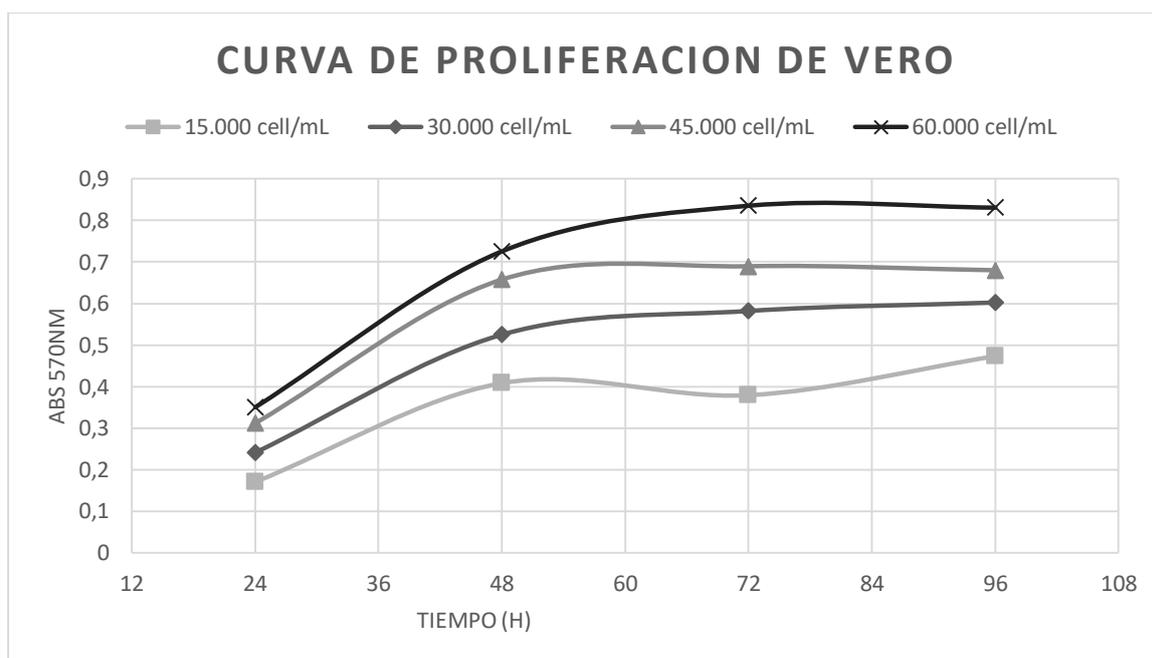


Figura 2. Curva de proliferación línea celular Vero determinada según el método MTT.

### Proliferación celular por azul de tripán

Se realizó un ensayo de tinción con azul de tripán para determinar la proliferación celular por otro método. A partir de diferentes concentraciones celulares de BHK-21 (5.000, 10.000, 15.000, 20.000, 25.000, 30.000, 35.000, 40.000 células/mL) se cuantificó la cantidad de células vivas (según el fundamento de esta técnica las células muertas tienen una membrana desestabilizada, por tanto, permitirán el ingreso del colorante, obteniéndose

como resultado células teñidas de color azul). El conteo celular se realizó en cámara de Neubauer, y para calcular el porcentaje de células vivas se empleó la ecuación 2:

$$\%celulas.vivas = \frac{numerototalcelulasvivas}{numerototaldecelulas} * 100 \quad \text{ecuación 2.}$$

Para obtener estos datos se manejaron los ensayos por triplicado y estos se promediaron. *Tabla 1. Porcentajes de viabilidad celular de BHK-21 correspondientes a cada concentración.*

| Concentración<br>Células/mL | 24 horas | 48 horas | 72 horas | 96 horas |
|-----------------------------|----------|----------|----------|----------|
| 5.000                       | 66,67%   | 46,15%   | 36,36%   | 33,33%   |
| 10.000                      | 86,27%   | 73,33%   | 67,33%   | 46,77%   |
| 15.000                      | 92,54%   | 68,71%   | 5,88%    | 4,17%    |
| 20.000                      | 71,88%   | 64,29%   | 81,67%   | 61,36%   |
| 25.000                      | 86,67%   | 60,61%   | 59,46%   | 57,93%   |
| 30.000                      | 78,26%   | 70,97%   | 67,72%   | 26,92%   |
| 35.000                      | 71,43%   | 69,90%   | 53,33%   | 59,49%   |
| 40.000                      | 60%      | 70,37%   | 50%      | 53,85%   |

Finalmente, lo que se pudo observar en este ensayo es que a medida que el tiempo va pasando va sucediendo un evento llamado inhibición de la división celular por contacto, inicialmente las células se multiplican hasta cubrir la superficie del flask (recipiente de cultivo), formando una monocapa, sin embargo, como consecuencia del contacto entre las células se detiene temporalmente su proliferación, y debido al paso del tiempo las células presentes en la monocapa se empiezan a desprender, indicando muerte celular (31). Razón por la cual este ensayo únicamente se realizó en BHK-21, ya que vero es una línea celular que no muestra inhibición por contacto. Sin embargo, este ensayo únicamente está demostrando la integridad de la membrana, mientras que el ensayo de MTT se fundamenta más en el metabolismo celular, por esta razón son más confiables sus datos, para observar proliferación y muerte celular.

### Citotoxicidad de los extractos seleccionados de *Marcetia taxifolia*

Con la concentración celular determinada por los ensayos de proliferación de ambas líneas celulares: BHK-21 y Vero, se realizó la siembra de las placas, para evaluar el impacto de los compuestos aislados de *Marcetia taxifolia*, sobre la viabilidad de las células, mediante la técnica cuantitativa MTT, los resultados pueden observarse en la tabla 2, donde se muestra la concentración citotóxica que causa el 50% de muerte celular (CC<sub>50</sub>) hallada mediante graphpad prism 8.

Tabla 2. Concentraciones citotóxicas medias correspondientes a cada extracto a las 24 y 48 horas, respectivamente.

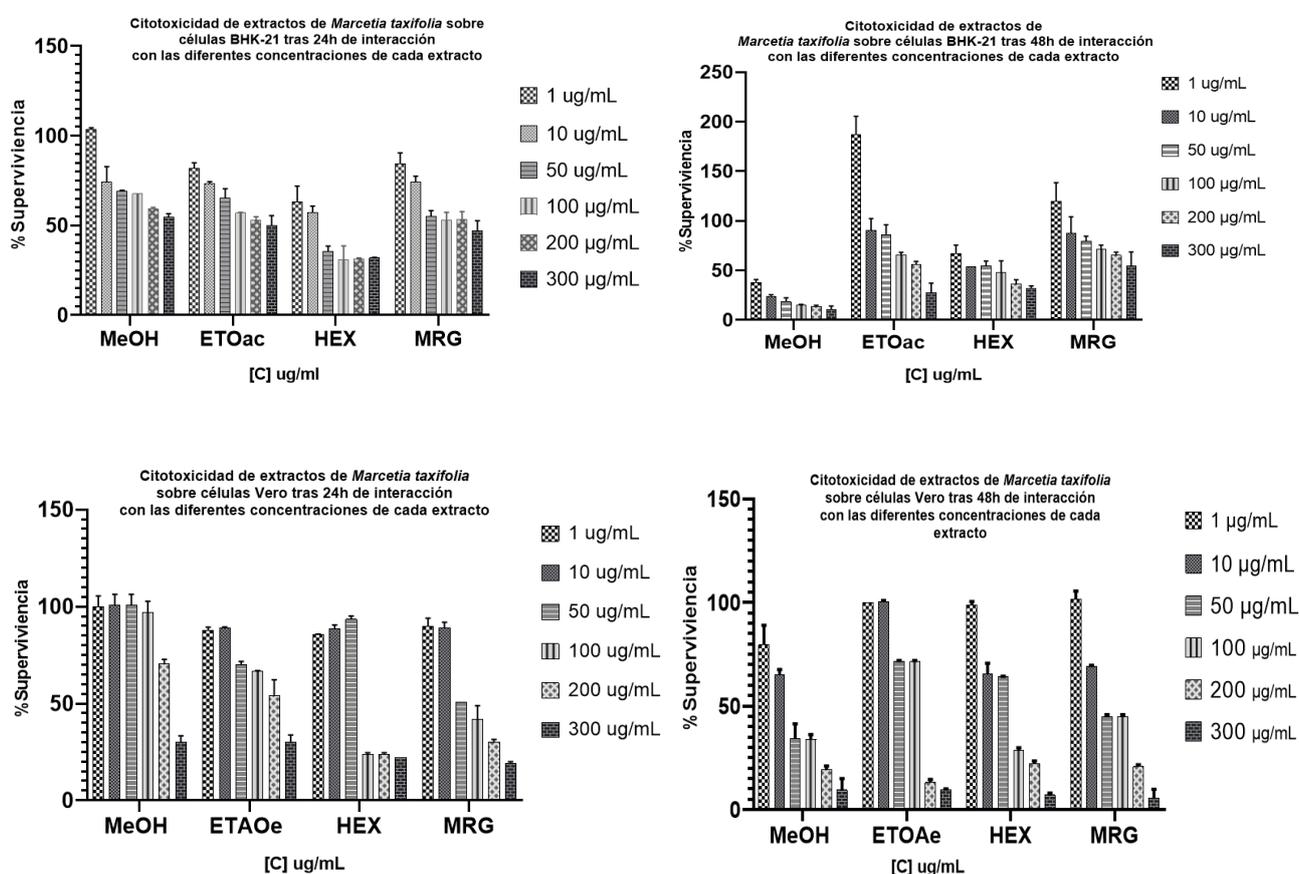
| Dosis CC50 (µg/mL) 24h post tratamiento |                |                |                |               |
|---|----------------|----------------|----------------|---------------|
|   | ETOac          | MeOH           | MRG            | HEX           |
| <b>Vero</b>                             | 217,80 ± 20,47 | 254,00 ± 3,78  | 57,30 ± 5,25   | 83,61 ± 1,64  |
| <b>BHK-21</b>                           | 231,14 ± 35,27 | 215,39 ± 19,08 | 205,68 ± 40,63 | 87,72 ± 22,61 |

| Dosis CC50 (µg/mL) 48h post tratamiento |               |              |                |               |
|---|---------------|--------------|----------------|---------------|
|   | ETOac         | MeOH         | MRG            | HEX           |
| <b>Vero</b>                             | 74,84 ± 1,38  | 29,73 ± 3,97 | 38,25 ± 2,12   | 56,20 ± 56,20 |
| <b>BHK-21</b>                           | 227,68 ± 7,68 | -            | 141,69 ± 16,06 | 44,930 ± 0,79 |

Allí se puede observar que los extractos que presentan una mayor CC<sub>50</sub> son ETOac y MeOH, esto indica que ambos extractos requieren de una mayor concentración para matar a la mitad de las células a comparación de los otros dos, así mismo, esto nos lleva a la conclusión de que los extractos que presentan una menor citotoxicidad son ETOac y MeOH, y que los que presentan una mayor citotoxicidad y por ende requieren una menor concentración para matar a la mitad de las células son MRG y HEX, esta afirmación se puede apoyar con la figura 4, donde se puede ver claramente las gráficas de % de

supervivencia frente a la concentración de cada extracto y se logra percibir una tendencia de que a mayor concentración de los extractos habrá un menor % de supervivencia. Además, se muestra cómo decrece el número de células en los pozos que contienen los compuestos a las 48 horas a diferencia de los pozos de 24 horas, este fenómeno se presenta debido a que los extractos si presentan una alta citotoxicidad, y a mayor tiempo que se da la interacción mayor será la muerte celular.

Figura 4. Citotoxicidad de los cuatro extractos en dos líneas celulares diferentes a las 24 y 48 horas, respectivamente.



## Discusión de resultados

El virus del Zika produce una infección que se transmite por picaduras de mosquito a nivel mundial y con alta prevalencia en las zonas tropicales de América latina. Su comportamiento epidemiológico no ha cesado aun, ya que desde el 2015 hasta el día de hoy se siguen presentando casos de infección y notificación de complicaciones. Con base en lo anterior, se ha demostrado la importancia de la evaluación de compuestos que puedan

tener efectividad contra la infección por el virus del Zika, línea en la que este trabajo de investigación ha incursionado, enfocado en compuestos derivados de la planta *Marcetia taxifolia*. Esta planta ha sido empleada en otras aplicaciones en el campo de la salud como antiinflamatorio y por tener capacidad anti infecciosa contra el virus HIV, es por ello, que como grupo de investigación se seleccionaron extractos de esta planta para realizar esta investigación..

En este estudio se determinó que en la línea celular Vero, 30.000 células/mL es la cantidad ideal para inocular en ensayos de citotoxicidad al igual que lo encontrado en el artículo del grupo de investigación de la Universidad Cooperativa de Colombia (32).

A diferencia de lo reportado en estudios previos sobre BHK-21, donde encuentran que la concentración óptima para sembrar en ensayos de citotoxicidad es de 100.000 células/mL, como lo reportó Grace Ruiz Pinell, et al (33). En este estudio se determinó que con 30.000 células/mL se obtuvo la confluencia del 70%, necesaria para efectuar los ensayos de citotoxicidad.

Por otra parte, Ocazonez, et al (34), evidencian que las concentraciones de extractos vegetales que muestran una CC<sub>50</sub> están dentro del rango de concentraciones  $\geq 100 \mu\text{g/mL}$ , la CC<sub>50</sub> seleccionadas para los estudios posteriores con el virus Zika, en este trabajo están por debajo de este rango, sugiriendo un mayor aprovechamiento del recurso y una mayor efectividad de las fracciones seleccionadas .

Por último, *Marcetia taxifolia* podría ser un gran candidato a anti-Zika porque está compuesto por flavonoides, y como lo demuestran Sánchez et al (35) y Frohner, et al (36) este compuesto ha mostrado actividad anti-arbovirus.

Para el desarrollo de este trabajo se tuvo muchas limitaciones a la hora de completar el estudio, debido a las políticas de distanciamiento social establecidas a nivel mundial y local, lo cual obligo la detención de los ensayos, por dicha razón, en este trabajo de grado únicamente se presenta hasta la determinación de la concentración citotóxica media de cada uno de los extractos evaluados. Y se deja abierto para una continuación del mismo, utilizando los resultados obtenidos.

### 3. Conclusión

Se determinó que para los ensayos que se querían realizar la concentración óptima para

las líneas celulares a emplear fue de 30.000 células/pozo, ya que a esta concentración la confluencia será adecuada (70%) para continuar con los ensayos de citotoxicidad.

Por otra parte, se analizaron los 4 extractos y se logró determinar la concentración citotóxica media  $CC_{50}$  de cada uno de estos, demostrando que los diferentes extractos exhiben una actividad distinta en cada una de las líneas celulares, además se determinó que los extractos que demuestran ser los mejores postulados son las fracciones HEX y MRG ya que la  $CC_{50}$  demuestra ser eficaz y eficiente.

## Agradecimientos

Agradezco a la vicerrectoría de la Universidad Antonio Nariño. Por el apoyo del investigador y practicante Manuel Alejandro Giraldo. Por la financiación del proyecto (Código: 64546 "Evaluación de la susceptibilidad de los virus del Dengue, chikungunya y Zika frente a extractos naturales de *Marcetia taxifolia* en cultivos celulares derivados de insectos y mamíferos") por parte de Colciencias. Y a la directora de trabajo de grado Ana Luisa Muñoz, por su disposición y apoyo a la línea de investigación en general, sin su ayuda no hubiese sido posible la obtención de estos resultados.

## Referencias

1. Arbovirus en Latinoamérica [Internet]. [cited 2020 Nov 10]. Available from: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0186-23912016000200111](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-23912016000200111)
2. DE COMBATE AL ZIKA SISTEMATIZACIÓN DE LA ESTRATEGIA [Internet]. [cited 2019 Oct 24]. Available from: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=12861%3A2016-zika-evolved-from-emerge](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=12861%3A2016-zika-evolved-from-emerge)
3. Vector competence: Entomological considerations and its implications on the epidemiology of Dengue [Internet]. [cited 2020 May 23]. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-07932010000200006](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932010000200006)
4. De F, De C, Salud LA. Universidad Privada Norbert Wiener. 2018; Available from: <http://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/123456789/956/ESPECIALIDAD - Montero Crisologo%2C Diana Carolina.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
5. Krow-Lucal ER, Biggerstaff BJ, Staples JE. Estimated Incubation Period for Zika

- Virus Disease. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2017 [cited 2019 Oct 24];23(5):841–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28277198>
6. Cabezas C, García P. Diagnóstico de la infección por el virus zika Diagnosis of Zika virus infection. [cited 2019 Oct 24]; Available from: <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v78i1.13028>
  7. Carod-Artal FJ. Neurological complications associated with dengue virus infection. *Rev Neurol* [Internet]. 2019 [cited 2020 Nov 10];69(3):113–22. Available from: <https://www.neurologia.com/articulo/2019140>
  8. Síndrome de Guillain–Barré [Internet]. [cited 2020 Oct 18]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/guillain-barré-syndrome>
  9. (No Title) [Internet]. [cited 2020 Nov 11]. Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/ED/VSP/Zica-Mayo-2015-Analisis-Riesgo.pdf>
  10. Cao-Lormeau V-M, Blake A, Mons S, Lastère S, Roche C, Vanhomwegen J, et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2016 Apr 9 [cited 2019 Oct 24];387(10027):1531–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26948433>
  11. Faheem M, Naseer MI, Rasool M, Chaudhary AG, Kumosani TA, Ilyas AM, et al. Molecular genetics of human primary microcephaly: an overview. *BMC Med Genomics* [Internet]. 2015 [cited 2019 Oct 24];8 Suppl 1:S4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25951892>
  12. Ministerio de Salud y Protección Social [Internet]. [cited 2019 Oct 24]. Available from: <https://www.minsalud.gov.co/Paginas/default.aspx>
  13. Semanal BE. Semana epidemiológica 18 26 de abril al 2 de mayo de 2020.
  14. (No Title) [Internet]. [cited 2020 Nov 11]. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/cesm/v33n1/0120-8705-cesm-33-01-42.pdf>
  15. Betancur-Galvis LA, Saez J, Granados H, Salazar A, Ossa JE. Antitumor and Antiviral Activity of Colombian Medicinal Plant Extracts. Vol. 94, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro.
  16. Ortega JT, Serrano ML, Suárez AI, Baptista J, Pujol FH, Rangel HR. Methoxyflavones from *Marcetia taxifolia* as HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors.
  17. Scheck AC, Perry K, Hank NC, Clark WD. Anticancer activity of extracts derived

from the mature roots of *Scutellaria baicalensis* on human malignant brain tumor cells. *BMC Complement Altern Med*. 2006 Aug 16;6.

18. Chiow KH, Phoon MC, Putti T, Tan BKH, Chow VT. Evaluation of antiviral activities of *Houttuynia cordata* Thunb. extract, quercetin, quercetrin and cinanserin on murine coronavirus and dengue virus infection. Vol. 9, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. Elsevier (Singapore) Pte Ltd; 2016. p. 1–7.
19. Chen H, Yang C, Ke T, Zhou M, Li Z, Zhang M, et al. Antimicrobial activity of secondary metabolites from *Streptomyces* sp. K15, an endophyte in *Houttuynia cordata* Thunb. *Nat Prod Res*. 2015 Dec 2;29(23):2223–5.
20. Carneiro BM, Batista MN, Braga ACS, Nogueira ML, Rahal P. The green tea molecule EGCG inhibits Zika virus entry. *Virology*. 2016 Sep 1;496:215–8.
21. Esteban QUISPE BRAVO ASESOR B. Actividad inhibitoria de los aceites esenciales de *Lippia alba* contra el virus zika en células VERO – 76 y C6/36 de *Aedes albopictus*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2018.
22. Singh P, Chakraborty P, He D-H, Mergia A. Extract prepared from the leaves of *Ocimum basilicum* inhibits the entry of Zika virus.
23. Kistner O, Barrett PN, Mundt W, Reiter M, Schober-Bendixen S, Dorner F. Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine. *Vaccine* [Internet]. 1998 May [cited 2020 Nov 11];16(9–10):960–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9682344/>
24. Govorkova EA, Murti G, Meignier B, de Taisne C, Webster RG. African green monkey kidney (Vero) cells provide an alternative host cell system for influenza A and B viruses. *J Virol* [Internet]. 1996 Aug 1 [cited 2020 Nov 11];70(8):5519–24. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/8764064/?tool=EBI>
25. Fabiola López de la Torre M, Ana Denisse Re Araujo D, Avalos Borja Alexei Fedorovich Licea Navarro M, Negrete Regagnon P, Rufina Hernández Martínez David Hilario Covarrubias Rosales D. i TESIS DEFENDIDA POR.
26. Jorquera A. Tratamiento. Enfermedad de Chagas. *Biomédica*. 2011;31(sup3.2):403.
27. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. Vol. 65, *Journal of Immunological Methods*. 1983.
28. Evaluación de la citotoxicidad de extractos marinos sobre un panel de líneas

- celulares | Díaz-García | Revista Cubana de Farmacia [Internet]. [cited 2020 Oct 16]. Available from: <http://revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/12/13>
29. Baptista J, Chávez K, Torrico F, Trejo E, Garcia CC, Urbina J, et al. Constituyentes químicos y actividad antiinflamatoria de *Marcetia taxifolia*. Vol. 24, Scientific Journal from the Experimental Faculty of Sciences, at the Universidad del Zulia. Abril-Junio; 2016.
  30. Dorantes-Álvarez L, Salas-Benito J, Barrón-Romero B, Salas-Benito M, De Nova-Ocampo M. CITOTOXICIDAD Y ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE EXTRACTOS DE CHILES (*Capsicum* spp) CYTOTOXICITY AND ANTIVIRAL ACTIVITY OF PEPPER EXTRACTS (*Capsicum* spp). Inst Politécnico Nac Núm [Internet]. 2018 [cited 2020 Oct 16];46:273–85. Available from: <http://www.polibotanica.mx>
  31. (No Title) [Internet]. [cited 2020 Oct 15]. Available from: <https://www.formacionegs.com/archivos/1325673989.pdf>
  32. Restrepo-Mendez LC, Zapata-Cardona MI, Gutierrez MM. Evaluación in vitro del efecto virucida e interacciones in silico del Lupeol contra los cuatro serotipos del virus Dengue AUTORES.
  33. Actividad citotóxica in vitro en líneas celulares y células de sangre periférica humana de los alcaloides totales de corteza de *Galipea longiflora* (Evanta) [Internet]. [cited 2020 Nov 18]. Available from: [http://www.scielo.org/bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0250-54602009000200008](http://www.scielo.org/bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602009000200008)
  34. Ocazonez RE, Meneses R, Torres FÁ, Stashenko E. Virucidal activity of Colombian *Lippia* essential oils on dengue virus replication in vitro. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2010 [cited 2020 Nov 18];105(3):304–9. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762010000300010&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762010000300010&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
  35. Sánchez I, Gómez-Garibay F, Taboada J, Ruiz BH. Antiviral effect of flavonoids on the dengue virus. Phyther Res [Internet]. 2000 Mar 1 [cited 2020 Nov 18];14(2):89–92. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/%28SICI%291099-1573%28200003%2914%3A2%3C89%3A%3AAID-PTR569%3E3.0.CO%3B2-C>
  36. Andrighetti-Fröhner CR, Sincero TCM, Da Silva AC, Savi LA, Gaido CM, Bettega JMR, et al. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. Fitoterapia. 2005 Jun 1;76(3–4):374–8.

