
Facultad de Farmacia

TESIS

“Efecto de la combinación de la ivermectina y oseltamivir sobre la replicación viral y la producción de citocinas en células THP-1 infectadas con virus Dengue”

que para obtener el grado de

MAESTRO EN FARMACIA

Presenta

Q.F.B. Sujey Abigail Niño Herrera

Directora de Tesis

Dr. Judith González Christen

Cuernavaca, Morelos

Junio 2026

Q.F.B. SUJEY ABIGAIL NIÑO HERRERA
ALUMNA DE LA MAESTRÍA EN FARMACIA

Por este medio le informo que la Comisión académica de Maestría en su Sesión ordinaria del 12 de marzo del 2026, designó a los siguientes sinodales como integrantes de la Comisión Revisora y Jurado para la revisión y evaluación de la tesis titulada: titulada **“Efecto de la combinación de la ivermectina y oseltamivir sobre la replicación viral y la producción de citocinas en células THP-1 infectadas con virus Dengue”**.

Sinodal

Presidenta	Dra. Leticia González Maya
Secretario	Dr. Germán Bernal Fernández
Vocal	Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres
Suplente 1	Dra. Nora Alma Fierro González
Suplente 2	Dra. Judith González Christen

Adscripción

Facultad de Farmacia-UAEM
Facultad de Farmacia-UAEM
Lab. De Virología-CINVESTAV
IIB-UNAM
Facultad de Farmacia-UAEM

Se le solicita entregar el presente oficio y manuscrito borrador de tesis a esta comisión, así como dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos. Además de dar seguimiento a la respuesta de los sinodales asignados, quienes tendrán que resolver de su aceptación o rechazo para formar parte de esta comisión y jurado dentro de un plazo de 5 días hábiles después de la entrega del presente oficio.

Nota (Art. 74 RGEP-UAEM): Los sinodales tendrán un plazo máximo de 20 días hábiles contados a partir de la recepción del documento de tesis para entregar los comentarios de la revisión y para emitir un voto aprobatorio o negatorio. En caso de condicionar el voto a la entrega de un documento en el que el tesista deberá solventar lo revisado, este contará con un plazo no mayor a 20 días hábiles, contados a partir de la notificación del primer dictamen emitido, para integrar las correcciones señaladas, una vez fenecido dicho plazo el sinodal emitirá el voto aprobatorio o negatorio que corresponda.

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
Por una humanidad culta

efirma-UAEM
Dr. Germán Bernal Fernández
Jefe de Posgrado
Facultad de Farmacia

c.c.p Dra. Leticia González Maya, Dr. Germán Bernal Fernández, Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres, Dra. Nora Alma Fierro González, Dra. Judith González Christen
c.c.p. Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

GERMAN BERNAL FERNANDEZ | Fecha:2026-03-20 10:41:03 | FIRMANTE

mKp4pi3GIFmKXzxoJ40125plKZqXCo/1s/8vAR7HDC23yYvqlvT8qVGxrnY4F2/TIQ+ByYNwy0Zl2cOsSR6ZEAhM4IO2EE2Il2IJEqTUNJM1So4KzPn31GDKy0TN7Pua7r4jJR060S
ZzdQAN1yCQLnV+8ZWs/yq+reQvAPg0qTVdDWgFrJ1yg1j1h8yeuwq+Sm6OqOUf5dUbF+JMYZZZteuVgH6sYTK00TY20dhWnfPH4I1GH+UYSJLTIBTQg4blVCOYGZy92ZwnLx
d277d/xlyndOSnAZyKBU1Zp6Mdi6QruAXHK62ciwKuvEP9LOyl4HIEXmh8LtcQbnkum7rKbQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



ijdmvCWQa

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/NmUljbqtzn5lmvSXvTUrQn2oNkQOA99w>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 13 de Inmunidad Innata de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). Una parte del proyecto se realizó en el Laboratorio 4 y 5 de la Planta Alta del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública (CISEI-INSP), campus Morelos.

Agradecimientos a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), no. de becario/CVU: 885483.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Ciencia y Tecnología

Secretaría de Ciencia, Humanidades,
Tecnología e Innovación



Instituto Nacional
de Salud Pública

AGRADECIMIENTOS

A la SECIHITI por la beca otorgada.

A mi papá Enrique Niño y mi mamá Lucía Herrera, por apoyarme en todo momento, confiar en mí y su amor incondicional. Los amo infinitamente.

A mi persona favorita en el mundo, mi hermano Jesús Niño, por cada palabra de aliento en momentos difíciles, entenderme mejor que nadie y creer en mí incluso cuando yo dudo de mí misma. Te amo.

A la Dra. Judith González, por haberme aceptado en su grupo de investigación y confiar en mí para desarrollar el proyecto. Por su apoyo brindado en cada etapa de la maestría y sus enseñanzas en el laboratorio y fuera de.

A la Dra. Mayela Govea, por ser mi mentora en el mundo de la investigación y creer en mí.

A mi amigo Alex por su apoyo incondicional en toda la maestría, por escucharme y entenderme en los momentos más caóticos. Te quiero.

A mi mejor amiga Melany, por todos los años de amistad y estar presente desde la distancia. Gracias por mandarme ánimo y decirme que yo puedo con todo. Te amo.

A mis amigas Marlenne y Rebeca, por todos los años de amistad y mandarme siempre sus buenos deseos. Las quiero.

A mi amiga Laura, por hacer el trayecto de la maestría más sencillo. Gracias por todo el apoyo, escuchar cada presentación y alguna que otra crisis existencial. Por las risas dentro y fuera de la facultad y sobre todo, por tu amistad. Te quiero.

A mis compañeros del laboratorio 13, por su ayuda cuando lo necesité, sus enseñanzas y las risas que no faltaron.

Al Dr. Salvador Hernández, por aceptarme en su laboratorio en el CISEI y poder continuar con mis ensayos. Por su apoyo incondicional y sus enseñanzas en el laboratorio.

A los miembros del laboratorio 4 del CISEI, Armando Méndez y Karla Hernández, gracias por hacer tan amena mi estancia en el INSP, por su apoyo incondicional ante las situaciones y las pláticas de la vida.

Al comité tutorial, la Dra. Vanessa López y el Dr. José Luis Montiel, por sus comentarios, opiniones y sugerencias para la realización de este proyecto.

A todos los que me ayudaron a concluir de una u otra manera este proyecto, infinitamente gracias.

ÍNDICE GENERAL

1.	Resumen.....	1
2.	Abstract.....	2
3.	Introducción	3
4.	Marco Teórico.....	4
4.1.	Epidemiología	4
4.1.1.	El Dengue en México.....	6
4.2.	El Virus del Dengue: Estructura y Genoma.....	7
4.2.1.	Proteínas Estructurales	7
4.2.2.	Proteínas No Estructurales	8
4.2.3.	Ciclo de replicación.....	11
4.3.	Manifestaciones Clínicas de la Enfermedad	14
4.3.1.	Dengue No Grave.....	14
4.3.2.	Dengue con Signos de Alarma.....	14
4.3.3.	Dengue Grave.....	14
4.3.4.	Tratamiento	15
4.3.5.	La Respuesta Inmune durante la Infección por Dengue	16
4.3.6.	Mecanismos de inmunopatogénesis	19
4.3.6.1.	Aumento de la Infección Dependiente de Anticuerpos (ADE).....	19
4.3.6.2.	Reactividad Cruzada Mediada por Linfocitos T	20
4.3.7.	Tormenta de citocinas	21
4.3.8.	Mediadores de la respuesta inmune	23
5.	Antecedentes	25
5.1.	Oseltamivir	26
5.1.1.	Efecto del Oseltamivir y la Producción de Citocinas Inflamatorias	27
5.2.	Ivermectina.....	28
5.3.	Tratamiento Combinado de Ivermectina y Oseltamivir.....	30
6.	Justificación	31
7.	Hipótesis	32
8.	Objetivos.....	33
8.1.	Objetivo General	33

8.2.	Objetivos Particulares	33
9.	Metodología	34
9.1.	Cultivo y Diferenciación de células THP-1	34
9.2.	Determinación de la Citotoxicidad de los fármacos por el Ensayo de MTT	34
9.3.	Evaluación del efecto del Oseltamivir sobre la actividad de Neuraminidasa	35
9.4.	Expansión del Dengue 2 cepa Nueva Guinea	36
9.5.	Titulación del Stock Viral	36
9.6.	Infección de las células THP-1 con Virus Dengue	37
9.7.	Inmunotinción para Detección de Infección	37
9.8.	RT-PCR anidada para Detección de Infección	38
9.9.	Evaluación del Tratamiento de Ivermectina y Oseltamivir sobre la replicación de DENV-2.	40
9.10.	Evaluación del Tratamiento de Ivermectina y Oseltamivir sobre la expresión de ARNm de TNF- α e IL-6	41
9.11.	Evaluación del Tratamiento de Ivermectina y Oseltamivir sobre la producción de TNF- α e IL-6 mediante Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzima (ELISA).....	42
9.11.1.	TNF- α	42
9.11.2.	IL-6.....	43
10.	Resultados	45
10.1.	Determinación de la Citotoxicidad de los fármacos por el Ensayo de MTT	45
10.2.	Evaluación del efecto del Oseltamivir sobre la actividad de Neuraminidasa	48
10.3.	Expansión del Dengue 2 y Titulación del Stock Viral	51
10.4.	Detección de la infección por DENV-2 en macrófagos.....	52
10.5.	Evaluación del Tratamiento con Ivermectina y Oseltamivir sobre la Replicación de DENV-2	55
10.6.	Evaluación del Tratamiento con Ivermectina y Oseltamivir sobre la Expresión de TNF- α e IL-6.	58
10.7.	Evaluación del Tratamiento con Ivermectina y Oseltamivir sobre la secreción de TNF- α e IL-6.	60
11.	Discusión.....	63
12.	Conclusiones	69
12.1.	Conclusión General	69
12.2.	Conclusiones Específicas	69
13.	Perspectivas.....	70

14.	Referencias	71
15.	ANEXOS.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de casos de dengue a nivel mundial, datos de la OMS 2023 (Organización Mundial de la Salud, 2023).	4
Figura 2. Distribución geográfica de los serotipos de dengue en la Región de las Américas (Organización Panamericana de la Salud, 2025).	6
Figura 3. Estructura conformacional y genómica del virus Dengue	¡Error! Marcador no definido.
Figura 4. Comienzo del ciclo de replicación del virus Dengue.	13
Figura 5. Ciclo de replicación del virus Dengue.....	13
Figura 6. Etapas de la enfermedad del Dengue. (World Health Organization, 2009).	15
Figura 7. Reactividad cruzada por linfocitos T.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 8. Esquema general de la producción de citocinas durante la infección por DENV. (Imagen realizada en BioRender).....	22
Figura 9. Efecto de NS1 de falfivirus sobre células endoteliales.	23
Figura 10. Esquema general de la activación del TLR.	26
Figura 11. Mecanismo de acción del oseltamivir. El oseltamivir es un profármaco cuya forma activa es el oseltamivir carboxilato, este inhibe la actividad de las neuraminidasas evitando la liberación de viriones de influenza.....	27
Figura 12. Estructura química de la ivermectina.	29
Figura 13. Efecto de la Ivermectina sobre THP-1.....	46
Figura 14. CC ₅₀ de la IVM sobre THP-1.	46
Figura 15. Efecto del Oseltamivir sobre las THP-1.	47
Figura 16. Efecto del Oseltamivir sobre la actividad de las neuraminidasas.....	49
Figura 17. Análisis cuantitativo para el ensayo sobre la actividad de la NEU..	50
Figura 18. Efecto de la combinación de Ivermectina y Oseltamivir sobre las THP-1.....	51
Figura 19. Formación de placas en células BHK-21 por efecto citopático causado por DENV-2 NG C.	52
Figura 20. Detección de la infección por Dengue mediante Microscopía de Fluorescencia..	53
Figura 21. Porcentaje de células infectadas respecto al conteo total.	53
Figura 22. Detección de la infección por RT-PCR.	54
Figura 23. Efecto de los tratamientos de IVM y OSV de manera individual y en combinación a las 12 hpi.	56
Figura 24. Efecto de los tratamientos de IVM y OSV de manera individual y en combinación a las 24 hpi. Los resultados muestran el promedio de 3 ensayos independientes.....	57
Figura 25. Efecto de los tratamientos individuales y en combinación de Ivermectina y Oseltamivir a las 12 y 24 hpi.....	59
Figura 26. Efecto de los tratamientos individuales y en combinación de Ivermectina y Oseltamivir a las 12 y 24 hpi.....	60
Figura 27. Efecto de los tratamientos individuales y en combinación de Ivermectina y Oseltamivir a las 12 y 24 hpi sobre la secreción de TNF- α	61

Figura 28. Efecto de los tratamientos individuales y en combinación de Ivermectina y Oseltamivir a las 12 y 24 hpi sobre la secreción de IL-6.	62
--	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes para la síntesis de ADNc.	38
Tabla 2. Condiciones para síntesis de ADNc.	38
Tabla 3. Mezcla de reacción para la primera amplificación.....	39
Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para PCR anidada de DENV-2.	39
Tabla 5. Condiciones para PCR anidada de DENV-2.....	39
Tabla 6. Secuencias de oligonucleótidos de la proteína C de DENV-2 (qPCR).....	40
Tabla 7. Mezcla de reacción para qPCR.	40
Tabla 8. Condiciones para qPCR.	41
Tabla 9. Secuencias de oligonucleótidos para TNF- α (qPCR).....	41
Tabla 10. Secuencias de oligonucleótidos para IL-6 (qPCR).	41
Tabla 11. Secuencias de oligonucleótidos para GAPDH.....	42

ABREVIATURAS

DENV	Virus Dengue
IVM	Ivermectina
OSV	Oseltamivir
Neu-1	Neuraminidasa 1
TLR	Receptor tipo Toll
NS	Proteína No Estructural
OMS	Organización Mundial de la Salud
DGE	Dirección General de Epidemiología
DNG	Dengue No Grave
DCSA	Dengue Con Signos de Alarma
DG	Dengue Grave
IFN	Interferón
IL	Interleucina
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
RE	Retículo Endoplásmico
PRR's	Receptores de Reconocimiento de Patrones
PAMP's	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
LPS	Lipopolisacárido
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato

1. Resumen

La infección por el virus del Dengue (DENV) es una de las enfermedades arbovirales con mayor presencia a nivel mundial, considerándose un problema de salud pública. El cuadro clínico de la enfermedad es bastante variado, pudiendo abarcar desde un estado febril hasta un amplio rango de manifestaciones que pueden poner en riesgo la vida de los pacientes.

Actualmente no existe un tratamiento específico para la enfermedad, por lo que es crucial la búsqueda de farmacoterapias que modulen la replicación viral y respuesta inflamatoria, un factor clave en la progresión a formas severas. En este sentido, dos fármacos fueron de interés en este proyecto. La ivermectina (IVM) ha demostrado interferir en la replicación del DENV al inhibir la integración de proteínas no estructurales en el núcleo celular. Por su parte, el oseltamivir (OSV) ha presentado actividad para inhibir la neuraminidasa 1 (Neu-1) al actuar sobre vías de señalización que dan como producto la liberación de citocinas inflamatorias. Aunque por separado ninguno de los tratamientos ha demostrado eficacia clínica, se propuso que su combinación pudiera ser más efectiva, al tener acción tanto sobre la replicación viral como la respuesta inflamatoria desregulada.

Se encontró que la IVM evaluada de forma individual interfiere con la replicación viral únicamente a las 12 horas post infección (hpi), sin que su efecto se mantenga hasta las 24 hpi. Por su parte, el tratamiento combinado de IVM y OSV no mostró ningún efecto sobre la replicación viral. No obstante, notablemente la IVM presentó potencial antiinflamatorio al inhibir la secreción de TNF- α e IL-6, lo que sugiere una nueva brecha de investigación orientada a elucidar el mecanismo mediante el cual ejerce este efecto. Asimismo, el efecto antiinflamatorio también se observó tanto el tratamiento combinado con OSV como en el tratamiento con OSV de forma individual. Sin embargo, no se demostró un efecto potenciado con la combinación de los tratamientos.

2. Abstract

Dengue infection is one of the most common arboviral diseases worldwide and is growing as a global health concern. The infection exhibits a wide range of clinical manifestations, with some patients developing life-threatening complications. Currently, there is no approved treatment for this illness. For this reason, it is essential to investigate molecules or compounds with the potential to act as pharmacotherapies for this disease. For this reason, we aimed to investigate two drugs. Some studies have reported that ivermectin (IVM) interferes with Dengue replication by inhibiting the nuclear import of nonstructural proteins. On the other hand, it is known that neuraminidase (Neu) participates in cellular transduction by TLR to produce inflammatory cytokines, and oseltamivir (OSV) has been shown to inhibit this enzyme. Although these drugs have not shown clinical efficacy alone, in this study, we propose that the combination of OSV and IVM could be more effective by inhibiting viral replication and dysregulated inflammatory response.

We found that IVM individually interferes with Dengue replication only at 12 hpi, but not at 24 hpi. Combined treatment of IVM and OSV didn't show effectiveness on viral replication. Even though, interestingly IVM showed antiinflammatory potential by inhibiting TNF- α and IL-6 secretion. These breaks new grounds research to elucidate the mechanism of IVM as an antiinflammatory. We also found this effect using the combined treatment with OSV and OSV individually.

3. Introducción

El dengue es una enfermedad ampliamente distribuida a nivel mundial que tiene como agente etiológico al virus del dengue (DENV). Este padecimiento se transmite de manera vectorial a través de la picadura de mosquitos hembra del género *Aedes*. Principalmente son mosquitos de especie *aegypti*, sin embargo, en algunos casos puede ser por *albopictus* (Bhatt et al., 2021a). El DENV pertenece al género Flavivirus, familia *Flaviviridae* y su genoma se compone por una cadena de ARN de polaridad positiva (Adikari et al., 2020). Se han descrito cuatro serotipos para el DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) y todos ellos pueden provocar manifestaciones clínicas (Calisher et al., 1989; Khan et al., 2023) . Dichas manifestaciones presentan un amplio espectro que va desde un cuadro febril y malestar generalizado hasta un cuadro grave que afecta a diferentes órganos (Roy & Bhattacharjee, 2021). Esta severidad se atribuye a que hay una respuesta inflamatoria exacerbada que desencadena la producción excesiva de citocinas. En esta respuesta participan diversas células inmunitarias, por ejemplo, los macrófagos que son células blanco del virus, pero además son importantes productoras de citocinas. (Malavige et al., 2020).

Puesto que el dengue no posee un tratamiento específico, es importante la búsqueda de farmacoterapias que permitan mediar la respuesta inflamatoria con el objetivo de que no se manifieste un cuadro severo de la enfermedad. Particularmente, se ha demostrado que la ivermectina (IVM), un fármaco antiparasitario, posee potencial antiviral *in vitro* contra el DENV al inhibir la integración de la proteína no estructural, NS3 y NS5 al núcleo de la célula huésped inhibiendo la replicación viral (Denolly et al., 2023; Palacios-Rápalo et al., 2023a). Por otro lado, se sabe que la activación de TLR4 aumenta la actividad de las neuraminidasas que participan en la regulación de citocinas inflamatorias. Inhibidores de la neuraminidasa 1 (Neu-1) como el oseltamivir (OSV) han sido probados para mediar la acción de estas enzimas, encontrándose una disminución en la producción de estas moléculas (Amith et al., 2010; G. Y. Chen et al., 2014a). Por tal motivo, en este proyecto se combinó el OSV e IVM con el fin de evaluar su efecto en la reducción de la infección y la regulación de la respuesta inmune generada por el DENV en el macrófago.

4. Marco Teórico

4.1. Epidemiología

El DENV es una enfermedad ampliamente distribuida a nivel global. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) su incidencia se ha incrementado notablemente durante las últimas dos décadas; por tal motivo representa un problema de salud pública (Organización Mundial de la Salud, 2023). Si bien durante los primeros años de la pandemia por COVID-19 (2019 a 2021) no se registró un pico de casos, para el 2023 se observó un repunte en todo el mundo, teniendo una notificación de un máximo histórico de más de 6.5 millones de casos y más de 7300 muertes asociadas con la enfermedad. Inclusive, el DENV se ha extendido a regiones donde anteriormente no estaban afectadas por el mismo, por ejemplo, se han documentado casos en el sur del continente europeo, Estados Unidos y Nepal (Kretschmer et al., 2023; B. D. Pandey & Costello, 2019). Esto se debe principalmente a la diseminación del vector (en este caso, el mosquito del género *Aedes*) posiblemente como consecuencia del cambio climático. No obstante, la expansión económica y urbanización continua con el incremento de la migración de personas también provocan que los serotipos del virus se diseminen a lugares donde no había incidencia previa (Pathak & Mohan, 2019).

Aunque el DENV se encuentra distribuido en más de 120 países, se presenta una mayor incidencia de casos en regiones tropicales y subtropicales como El Caribe, Australia, América Central, algunas regiones de América del Sur, el centro y sureste asiático, así como algunas regiones de África (Khan et al., 2023) (Figura 1).

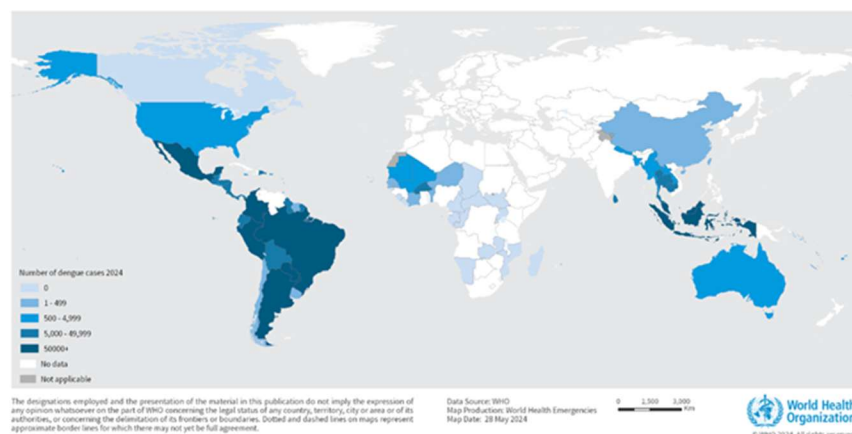


Figura 1. Distribución de casos de dengue a nivel mundial, datos de la OMS 2024 (Organización Mundial de la Salud, 2024).

De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS) cerca de 500 millones de personas en las Américas están en riesgo de contraer infección por DENV. En 2024 se registraron cerca de 13 millones de casos, representando un aumento del 300 % si se compara con lo reportado en 2023 (Organización Panamericana de la Salud, 2025). Los países más afectados en ese año fueron Brasil con 2,376,522 casos, Argentina con 549,000, Perú con 188,326 y Bolivia con 133,779. Las tasas de incidencia acumulada más elevadas se registraron en las subregiones del Cono Sur con 862 casos por 100,000 habitantes, la subregión andina con 268 casos por 100,000 habitantes y México con 59 casos por 100,000 habitantes. Para 2024 se reportó una incidencia acumulada de 1284 casos por cada 100, 000 habitantes, lo que representó un incremento de 209% en comparación con el 2023 durante el mismo periodo y 387% con respecto al promedio de los últimos 5 años (Organización Panamericana de la Salud, 2025). Cabe mencionar que, para esta semana en México se registraron cerca de 86, 000 casos de la enfermedad, siendo la cifra más alta en comparación con otros países de América. Es relevante mencionar que el DENV es el arbovirus con mayor número de casos en la Región de las Américas y sus picos epidémicos se producen de manera repetitiva cada tres a cinco años.

De acuerdo con datos de 2025, 16 países en la región de las Américas han reportado la circulación del virus. En el caso de Brasil, Costa Rica, El Salvador, México, Panamá y Puerto Rico los cuatro serotipos de DENV se encuentran circulando simultáneamente (Figura 2) (Organización Panamericana de la Salud, 2025).



Figura 2. Distribución geográfica de los serotipos de dengue en la Región de las Américas (Organización Panamericana de la Salud, 2025).

4.1.1. El Dengue en México

En México circulan los cuatro serotipos de DENV, aunque actualmente, de acuerdo con el Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica a cargo de la Dirección General de Epidemiología (DGE), el que tiene mayor circulación en la población es el serotipo 3, seguido por el 2 (Secretaría de Salud, 2026). Sin embargo, esto no se ha mantenido de manera constante, si nos remontamos hace 5 años el serotipo más prevalente era el 2 seguido del 1 (Briseno-Ramírez et al., 2025).

Las infecciones por dengue tienen un patrón cíclico en el que hay periodos de alta transmisibilidad y periodos de baja transmisibilidad. Y después pasar, en el caso desde hace cuatro décadas, ha aumentado significativamente en el país. Y terminar con, para el cierre del 2024, por los últimos tres años en el país, en el 2023 hubo tanto, 2024 tanto, 2025 tanto. Y se puede ver que estamos en una actualmente de baja transmisibilidad. Algo así.

Desde hace 4 décadas el DENV ha aumentado significativamente en el país (Briseno-Ramírez et al., 2025). Si bien, hasta hace algunos años la incidencia de casos era predominante sólo en algunos estados, en especial en zonas costeras, la realidad es que la enfermedad se encuentra ahora distribuida en todo el país.

No obstante, las infecciones por dengue presentan un patrón cíclico en el que existe un repunte de casos cada 4 a 6 años, por ello hay periodos de alta y baja transmisibilidad. De acuerdo con datos de la Secretaría de Salud en México para el cierre de 2024 se reportaron cerca de 125 mil casos de la enfermedad, una cifra bastante alta comparada con el cierre de 2023 donde se reportaron cerca de 22 mil casos (Secretaría de Salud, 2025). Además, es importante mencionar que desde hace 4 décadas el DENV ha aumentado significativamente en el país.

En este contexto, es relevante destacar que la población más afectada por el DENV en México ya sea como dengue no grave (DNG) o dengue con signos de alarma (DCSA) y dengue grave (DG), son personas jóvenes entre 10 y 19 años. Esta tendencia ya se había observado en países asiáticos y algunos en América hace algunas décadas (Verhagen & de Groot, 2014), sin embargo, en México se ha hecho más notoria en los últimos veinte años. Incluso un estudio llevado a cabo en 2014 muestra como durante la década de los 90 existe una mayor incidencia en poblaciones adultas (24-64 años), mientras que desde 2005 se observa un aumento en la incidencia de casos en poblaciones jóvenes (Torres-Galicia et al., 2014). Cabe mencionar que la incidencia de esta enfermedad es similar para ambos géneros.

4.2. El Virus del Dengue: Estructura y Genoma

El DENV pertenece a la familia *Flaviviridae* género *Flavivirus*. Es un virus cuyas partículas maduras tienen un tamaño cercano a 50 nm de diámetro (Kuhn et al., 2002), sin embargo, cuando se encuentra en su forma inmadura el diámetro es de aproximadamente 60 nm. Su material genético se compone por una cadena de ARN en sentido positivo con una longitud aproximada de 11 kilobases y se encuentra cubierto por una cápside proteica con estructura icosaédrica que se envuelve en una capa lipídica proveniente de la célula huésped (Khan et al., 2023; Nanaware et al., 2021). Además, el ARN del DENV posee sólo un marco de lectura abierto (ORF) que se encuentra flanqueado tanto en 5' como 3' por regiones no codificantes (UTR). Este ORF va a codificar para una poliproteína que será la precursora de 10 proteínas maduras, de las cuales 7 son no estructurales y 3 son estructurales (Harapan et al., 2020).

4.2.1. Proteínas Estructurales

En el extremo 5' se codifican las 3 proteínas estructurales del DENV: cápside (C) proteína de membrana (M) y proteína de envoltura (E). Estas proteínas como su nombre indica, se ven

involucradas en la composición de la partícula viral que incluye la formación de la cápside para que pueda contener el ARN, así como la formación de la envoltura y maduración (Nanaware et al., 2021) (Figura 3A).

La proteína C es homodimérica y se encuentra estructurada por 100 residuos de aminoácidos conteniendo 4 regiones α -hélice y un dominio intrínseco N-terminal. Su función es la formación de la cápside para envolver el material genético del virus. La proteína de membrana M es sintetizada como una proteína precursora denominada “prM” que se encuentra presente en la partícula viral inmadura y a través de proteasas celulares es escindida para generar a la proteína madura M. PrM contiene dos fracciones: el dominio “pr” y el “M” y se conforma por 166 residuos de aminoácidos, su función es actuar como una cubierta para proteger la fusión prematura de la proteína E antes de la liberación de la partícula viral (Filomatori et al., 2026). Por último, la proteína E es una glicoproteína conformada por 495 residuos de aminoácidos, en el virión maduro se encuentra en forma de 90 homodímeros que yacen planos contra la superficie del virus formando una cubierta proteica lisa. Su estructura presenta tres dominios: DI, DII y DIII y dos residuos glicosilados de asparagina (N67 y N153) involucrados en el contacto con la célula hospedera (Li & Kang, 2022; Poggianella et al., 2015). Esta proteína se encarga de mediar la fusión del virus con la célula huésped y es la responsable de la determinación del tropismo y virulencia (Meng et al., 2015).

4.2.2. Proteínas No Estructurales

El ORF del DENV codifica para 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, y NS5) (Figura 3B) (Singh et al., 2025).

NS1 es una proteína con un peso que oscila los 50 kDa, es sintetizada por células infectadas por el DENV como monómero, pero al asociarse a balsas en la membrana del retículo endoplásmico liso (REL) se dimeriza. Puede ser enviada al sitio de replicación viral o ser secretada en forma de hexámero a la superficie celular o el torrente sanguíneo, donde durante la fase aguda de la enfermedad circula y puede utilizarse como marcador diagnóstico (Glasner et al., 2018). Se sabe que está involucrada en el complejo de replicación viral (un ensamblaje multiproteico que se une a membranas y es necesario para la síntesis de ARN), se ha propuesto que se asocia a NS4A/NS4B participando en eventos tempranos de la replicación, así como favorecer la liberación de las partículas virales, sin embargo, los mecanismos exactos son desconocidos. En su forma

secretada, posee un papel importante en la respuesta inmune y patogénesis al interactuar con proteínas del complemento favoreciendo la activación en el endotelio e incrementando la permeabilidad vascular (H.-R. Chen et al., 2018).

NS2A es una proteína hidrofóbica transmembranal de aproximadamente 22 kDa que participa en la replicación y el ensamblaje de las partículas virales. Se ha demostrado que recluta el ARN nascente, proteínas estructurales y proteasas al sitio de ensamblaje (Xie et al., 2019).

NS2B es una proteína integral de membrana de 14 kDa que consta de tres dominios hidrofóbicos y un hidrofílico, su porción C-terminal es responsable del sitio de reconocimiento con NS3. NS2B actúa como un cofactor de NS3 y el complejo formado por ambas proteínas se ve implicado en la evasión de la respuesta inmune mediante la escisión del factor 3 regulador de interferón (IRF-3). El complejo NS2B/NS3 interactúa con las mitocondrias y provoca la escisión de las membranas asociadas a las mitocondrias (MAM's), esto conduce la fragmentación de este organelo y contribuye a la patogénesis de la enfermedad (Starvaggi et al., 2024).

La proteína NS3 (70 kDa) tiene varias funciones: en su región N- terminal compuesta por 180 aminoácidos posee un dominio con actividad proteasa, mismo que requiere de NS2B como cofactor. De igual manera, la región entre los residuos de aminoácidos 180-618 presenta funciones de helicasa, necesaria para la replicación del ARN (Harapan et al., 2020).

NS4A es una proteína transmembranal de 16 kDa que desempeña un papel en la remodelación de la membrana del retículo endoplásmico (RE) para que se forme el complejo de replicación viral. De igual manera, NS4B se encuentra dentro del complejo de replicación e interactúa con NS1, NS2B y NS4A, permitiendo que NS3 y NS5 puedan encargarse de la replicación del genoma (Goh et al., 2024; Wang et al., 2022).

Por su parte la proteína NS5 tiene 900 residuos de aminoácidos y es la proteína más conservada en los cuatro serotipos del DENV. En su extremo N-terminal posee actividad de metiltransferasa y guanidiltransferasa, necesaria para la metilación del extremo 5' del ARN genómico. En su extremo C-terminal se encuentra un dominio de polimerasa dependiente de ARN (RdRp), por lo que tiene actividad en el proceso de replicación viral. NS5 también se une con NS3 en sus proximidades para formar el complejo replicasa cuando ésta desenrolla el ARN de doble cadena que permite que NS5 utilice el ARN monocatenario como sustrato (El Sahili & Lescar,

2017). Además, se ha demostrado que induce la transcripción y secreción de IL-8 e inhibe la respuesta de IFN- α , a través de la degradación de STAT1 y 2 (Goh et al., 2024).

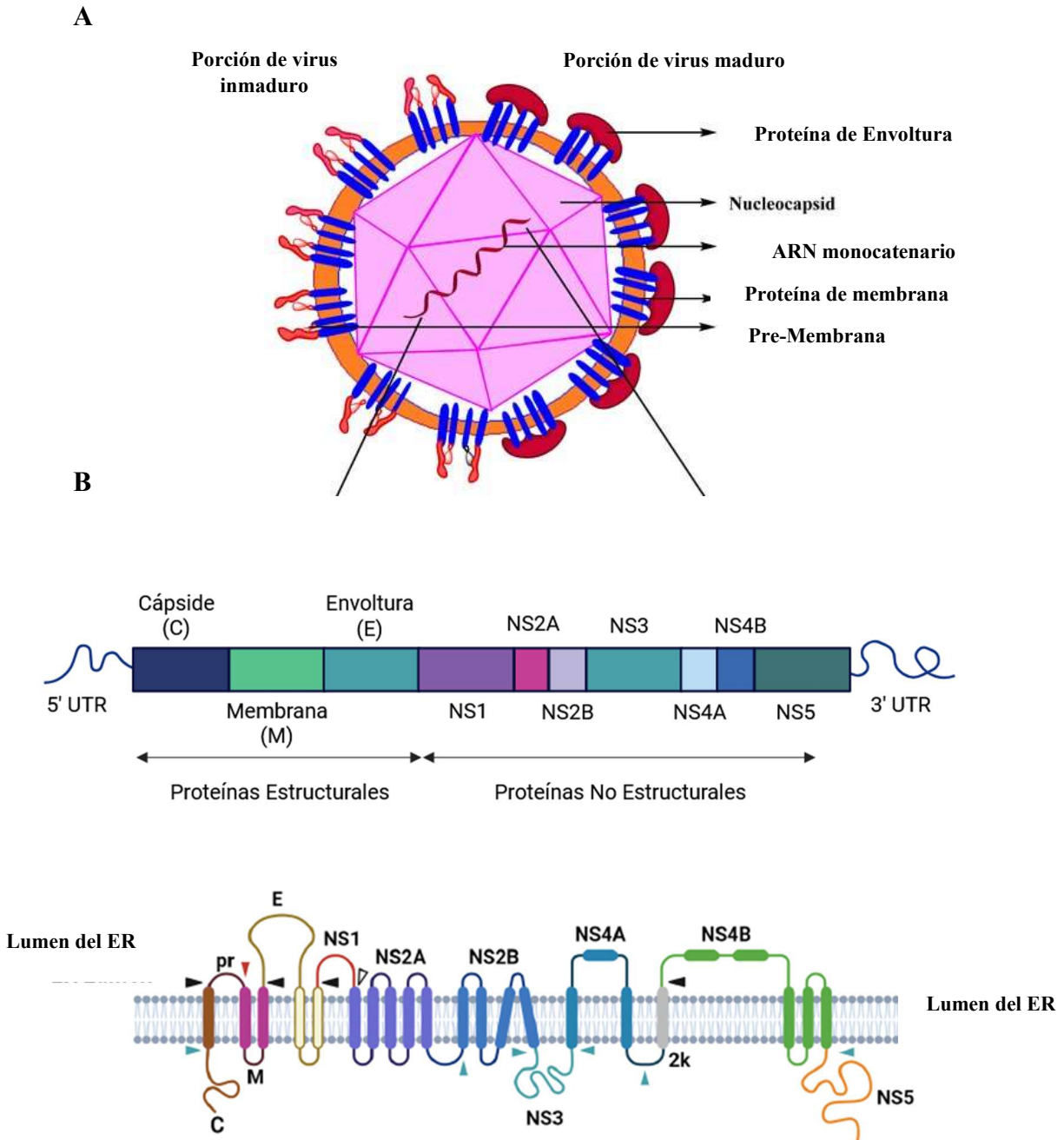


Figura 3. Estructura conformacional y genómica del virus Dengue (Dharmapalan et al., 2022; Goh et al., 2024). A) Estructura conformacional de las proteínas estructurales del virus dengue en su forma madura e inmadura. La cápside icosaédrica contiene el ARN viral y está formada por múltiples copias de la proteína de C. La superficie de partículas inmaduras está compuesta por las proteínas prM y E asociadas a la membrana. La estructura madura contiene la forma madura de la prM. B) El ARN viral es traducido como una poliproteína y procesada por proteasas celulares y virales.

4.2.3. Ciclo de replicación

El ciclo de replicación del DENV comienza cuando mosquitos hembra del género *Aedes* buscan alimentarse de sangre para poder poner sus huevos y que estos maduren. Si la hembra está ya infectada, el virus es inyectado en la piel del humano a través de la secreción de las glándulas salivales del mosquito (Mukherjee et al., 2019). Una vez dentro del organismo el DENV es capaz de unirse a una gran variedad de moléculas, que le permite ampliar su capacidad para infectar a diversas células dentro las cuales se incluyen, pero no se limitan a células epiteliales, queratinocitos, células de Langerhans, fibroblastos, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células endoteliales, hepatocitos y linfocitos B y T (Figura 4) (Duangkhae et al., 2018; Nanaware et al., 2021).

A través de diferentes estudios se ha demostrado que el DENV se puede unir a varios receptores, entre los que se encuentran los receptores de manosa y CD14 en monocitos y heparán sulfato en macrófagos. De igual manera, en líneas celulares como HepG2 y Huh7, que son utilizadas como modelo de hepatocito, se ha descrito una alta afinidad por el receptor de laminina y claudina, respectivamente (Cruz-Oliveira et al., 2015; Nanaware et al., 2021). Sin embargo, el virus también puede entrar a la célula por inmunocomplejos a través del receptor para anticuerpos Fc (De La Guardia & Lleonart, 2014). La molécula responsable de interaccionar con estos receptores es la proteína E. Por su parte, mientras se da esta interacción, la PrM facilita la unión viral al receptor de la célula huésped. En la mayoría de los casos, según se ha reportado, la entrada del DENV se produce por endocitosis dependiente de clatrina. Una vez que el virus entra a la célula se envuelve en un endosoma recubierto por dicha proteína E en el interior de la célula, el endosoma experimenta diferentes estadios de maduración. Entre ellos se encuentra el endosoma temprano cuyo pH es básico, sin embargo, algunas enzimas celulares lo reconocen y se unen a él para generar una disminución de pH y crear un ambiente acidificado. Esto conlleva a que la proteína E y la M sufran cambios conformacionales y que la envoltura viral se fusione con la membrana del endosoma ocasionando el desensamblaje de la cápside en el citoplasma donde el virus libera su material genético (Nanaware et al., 2021b; Tuiskunen Bäck & Lundkvist, 2013).

Cuando el ARN se libera en el citoplasma es traslocado al RE rugoso donde sirve de molde para la síntesis de proteínas y la síntesis de nuevas copias de material genético. Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual el genoma del DENV es traslocado al RE rugoso,

se cree que la maquinaria del citoesqueleto, que está en constante modificación se ve involucrada en dicha traslocación. El ARN viral es traducido en una única poliproteína que se escinde por el complejo proteico NS2b/NS3 y proteasas celulares. Una vez que se sintetizan las proteínas no estructurales, estas necesitan acoplarse en una región sobresaliente del RE rugoso para formar el denominado “complejo de replicación”. Dicha región es necesaria para que el proceso de replicación del ARN se lleve de manera adecuada, a continuación, se describe como es que se genera su formación. (Harapan et al., 2020; Nanaware et al., 2021; Sinha et al., 2024).

El extremo C terminal de la proteína NS3 tiene tres propiedades enzimáticas: ARN trifosfatasa, nucleósido trifosfatasa y helicasa. La NS3 forma un complejo con la proteína NS5 y participa en la replicación mediante el desenrollamiento del ARN viral. En particular, se conoce que NS3 y NS5 primero necesitan ser traslocadas al núcleo de la célula para poder ejercer su función de manera óptima. Si bien este proceso no se encuentra descrito, se tiene evidencia de que estas proteínas tienen presencia nuclear durante momentos tempranos en la infección (Palacios-Rápalo et al., 2021; Tay et al., 2013). La traducción y maduración de las proteínas virales provoca cambios conformacionales en la membrana del RE con la finalidad de formar membranas enroscadas y empaquetados vesiculares que se conectan con el citoplasma a través de una estructura similar a un poro para suministrar nucleótidos. Dichos paquetes contienen NS5, NS3, otras proteínas NS además de los factores del huésped que catalizan la replicación del ARN formando el complejo de replicación. El ARN que se sintetiza se puede utilizar para nuevas rondas de traducción o para la encapsidación en nuevos viriones, además una cadena intermediaria de ARN con polaridad negativa sirve como molde para la síntesis de nuevas cadenas de ARN con polaridad positiva. El genoma replicado y las proteínas traducidas se ensamblan formando una partícula vírica inmadura en el RE, esta se somete a un proceso de maduración mediada por furina en la red del trans-Golgi (TGN), donde cambia de morfología espiculada a una lisa (forma madura); durante la maduración el dominio Pr se escinde del PrM, y M permanece en la partícula madura como proteína transmembranal. Por último, el virus maduro es exocitado de la célula infectada completando el ciclo de infección (Figura 5)(Harapan et al., 2020; Sinha et al., 2024; Tuiskunen Bäck & Lundkvist, 2013).

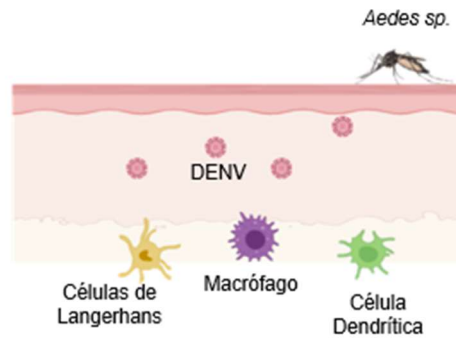


Figura 3. Comienzo del ciclo de replicación del virus Dengue. Mosquitos hembra del género *Aedes* transmiten el DENV al alimentarse de sangre. Una vez en el organismo, el DENV infecta a diversas células, dentro las que se incluyen células inmunitarias como macrófagos, células de Langerhans y dendríticas.

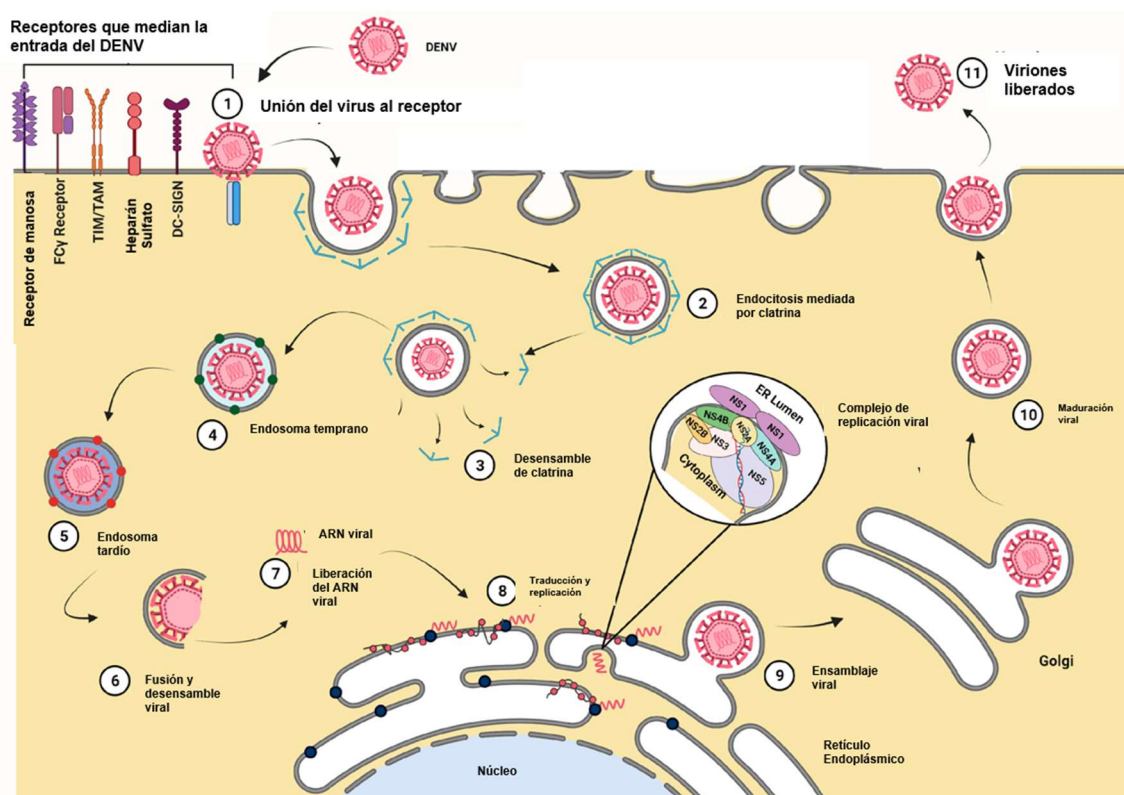


Figura 4. Ciclo de replicación del virus Dengue. Dengue 1) DENV se puede unir a diferentes receptores en la célula. 2) Se internaliza por endocitosis a través de la vía de clatrina en un endosoma. 3) La clatrina se desensambla del endosoma para formar un endosoma temprano. 4) El endosoma tiene un pH de 6.5. 5) El interior del endosoma experimenta una acidificación al disminuir el pH. 6) El cambio de pH provoca cambios conformacionales ocasionando que la envoltura se fusione con la membrana de la célula huésped. 7) Se desensambla la cápside en el citoplasma y se libera el material genético en el citoplasma. 8) El ARN sirve como molde para la traducción y replicación en el RE. El complejo de replicación se forma por diferentes proteínas no estructurales. 9) El genoma replicado y las proteínas se ensamblan para formar una partícula viral inmadura. 10) La partícula inmadura sufre cambios debido a la proteína furina en la Red Trans-Golgi. 11) El virus se libera de la célula por exocitosis completando su ciclo infeccioso. Tomado y modificado de Nanaware et al., 2021 (Nanaware et al., 2021)

4.3. Manifestaciones Clínicas de la Enfermedad

Aproximadamente el 70 a 80% de las infecciones por DENV son asintomáticas, sin embargo, cuando hay manifestaciones clínicas los pacientes pueden experimentar diferentes cuadros de la enfermedad, que van desde la fiebre hasta falla multiorgánica (Paz-Bailey et al., 2024; Zerfu et al., 2023). En general la infección por DENV puede cursar tres fases: fase febril, fase crítica (que puede o no presentarse) y fase de recuperación, estas se resumen en la Figura 6. No obstante, de acuerdo con los lineamientos más recientes para el diagnóstico, tratamiento y prevención del dengue de la OMS (2009), la enfermedad se clasifica en Dengue no grave (DNG) o dengue sin signos de alarma, Dengue con signos de alarma (DCSA) y Dengue Grave (DG) (World Health Organization, 2009).

4.3.1. Dengue No Grave

El DNG se caracteriza por la fase febril de la enfermedad y tiene una duración entre 2 y 7 días. Durante este periodo, las personas presentan fiebre alta ($\geq 38.5^{\circ}\text{C}$) acompañada de dolor muscular, articular y retrocular, vómito, náusea, además de manifestaciones mucocutáneas como rash, eritema facial y petequias. Si los pacientes no presentan más síntomas, avanzan a la fase de recuperación, no obstante, algunas personas pueden experimentar la fase crítica durante el 4° a 6° día de la enfermedad (Paz-Bailey et al., 2024).

4.3.2. Dengue con Signos de Alarma

El DNG puede evolucionar a DCSA, en esta fase la fiebre ha desaparecido, pero los pacientes presentan vómito constante, dolor abdominal agudo, letargo o desasosiego, sangrado de encías o nariz, hepatomegalia, aumento de los valores de hematocrito acompañado de la disminución de plaquetas y comienzan a acumularse fluidos (Paz-Bailey et al., 2024; World Health Organization, 2009). Como en el estadio anterior, los pacientes pueden recuperarse o el padecimiento puede avanzar a una fase más severa.

4.3.3. Dengue Grave

Los pacientes que no mejoran en la fase previa desarrollan DG. En esta fase hay una severa extravasación del plasma que a su vez provoca una hemoconcentración, esta se caracteriza por un aumento de hasta más del 20% en los niveles de hematocrito además de leucopenia y trombocitopenia. La extravasación del plasma puede ocasionar un estado de shock y aumenta el

riesgo de desarrollo de hemorragia, particularmente en el tracto gastrointestinal. Al no tener una irrigación óptima, se puede llegar a un estado de deterioro multiorgánico, acidosis metabólica y coagulación intravascular diseminada (Tejo et al., 2024).

Durante la fase de recuperación, empieza a presentarse una reabsorción del fluido extravascular que se asocia con una mejora en el estado clínico de los pacientes, los cuales también llegan a desarrollar una erupción (en ocasiones con prurito) generalizada que se conoce como “erupción de recuperación” ocasionada por la liberación de histamina por los mastocitos. De igual manera, se ha descrito que algunos de los pacientes adultos pueden padecer fatiga severa, episodios depresivos e insomnio y persistir con síntomas como cefalea, dolor muscular y articular (Paz-Bailey et al., 2024; Tejo et al., 2024).

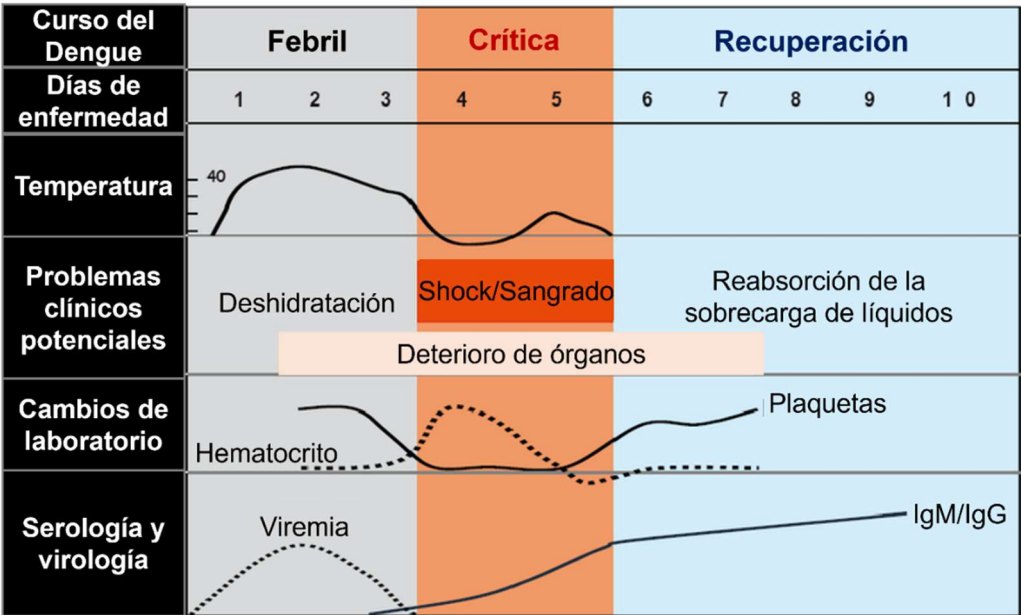


Figura 5. Etapas de la enfermedad del Dengue. (World Health Organization, 2009).

4.3.4. Tratamiento

Actualmente, la enfermedad del DENV no cuenta con un tratamiento profiláctico o terapéutico específico, entonces ante la ausencia de este, algunas guías médicas y el manual para el manejo clínico de la OMS (2012) se centra en la clasificación de grupos A, B y C. Los pacientes del grupo A son personas con DNG sin comorbilidades o circunstancias sociales difíciles. Este grupo pueden manejar la enfermedad desde su hogar mediante la administración de paracetamol por vía oral, la ingesta abundante de líquidos y descanso (Paz-Bailey et al., 2024; World Health Organization, 2012).

Por otra parte, el grupo B representa a pacientes con comorbilidades (embarazo, diabetes, asma, hipertensión, falla renal, edad temprana o avanzada), personas con situaciones sociales precarias y aquellas que padecen DCSA. Este grupo debe ser referido a un hospital para un adecuado monitoreo y en caso de presentar DCSA, se administran soluciones cristaloides por vía intravenosa como solución salina al 0.9 % o Ringer lactato. Para el grupo C el tratamiento es muy similar al grupo B, sin embargo, los pacientes son trasladados al área de cuidados intensivos donde se les administran soluciones cristaloides y, en caso de presentar hemorragia severa, se pueden realizar transfusiones (Paz-Bailey et al., 2024; Tejo et al., 2024; World Health Organization, 2012).

4.3.5. La Respuesta Inmune durante la Infección por Dengue

Durante la infección por DENV, tanto componentes de la inmunidad innata como adaptativa participan con el objetivo de contrarrestarla. Cuando el DENV es introducido a través de la piel, algunas células residentes que pertenecen al sistema inmune tienen un primer encuentro con el virus. Algunas de estas incluyen a macrófagos y células dendríticas. Su reclutamiento al sitio de entrada del DENV está mediada por señales quimioatrayentes y su migración contribuye al inicio de una respuesta inflamatoria. Estas células pueden reconocer al DENV debido a que presentan receptores de reconocimiento de patrones (PRR's) que específicamente reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) del virus (por ejemplo, el ARN) (Fernandes-Santos y Azeredo 2022).

La interacción entre los PRR's y PAMP's permite el inicio de una cascada de señalización que culmina en la activación factores de transcripción como IRF-3, IRF-7 (Factores de Regulación de Interferón), NF- κ B y AP-1. Estos factores promueven la expresión y secreción de interleucinas (IL's) como IL-6, IL-8, TNF- α e IL-1 β , así como Interferones de tipo I (IFN α y IFN β). La unión de IFN's a sus receptores (IFNAR) conlleva a la activación de cinasas JAK-1 y Tyk-2 que a su vez fosforila a STAT-1 y 2 y permiten la inducción de genes estimulados por interferón (ISG's) que presentan funciones antivirales al interferir en el ciclo replicativo y generar así un estado antiviral (E. Yang & Li, 2020). De igual forma, tras la unión de IFN's a sus receptores, se conduce la producción de la cinasa PKR, la cual al activarse fosforila al factor eIF2a promoviendo así su unión irreversible con eIF2B, impidiendo su participación para la síntesis de proteínas virales. PKR también fosforila I κ B permitiendo así la liberación de NF- κ B, que al translocarse al núcleo promueve la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF- α (Flint et al., 2020). Sin

embargo, al igual que otros virus, el Dengue ha desarrollado distintas estrategias para evadir la respuesta antiviral, por ejemplo, inhibiendo la expresión y acción de los IFN α/β . Particularmente, se ha descrito que la proteína NS2B3 participa en la degradación de STING, mismo que se encarga de fosforilar a IRF-316, NS5 puede degradar a STAT2 y NS2A, NS4A y NS4B inhiben la activación de STAT1 (Lee et al., 2022).

La liberación de mediadores inmunológicos tanto citocinas como IL-6, TNF- α , IL-1 β y quimiocinas como IL-8 y CCL-5 establece un microambiente inflamatorio y promueve el reclutamiento de diferentes células entre las que se encuentran: células cebadas, monocitos, neutrófilos, linfocitos NK y linfocitos T, cada una con respectivas funciones. Por ejemplo, las células cebadas se encuentran en la piel y mucosas, que representan la primera línea de defensa durante la infección por DENV. Se sabe que estas células están involucradas en el proceso inflamatorio, cuando son estimuladas durante la infección por DENV producen y secretan diferentes mediadores inmunológicos como citocinas, quimiocinas, histamina y prostaglandinas. A pesar de que esto se relaciona con funciones protectoras, también se ha asociado con la severidad de la enfermedad pues se ha demostrado que pacientes con DG presentan niveles elevados de histamina en el plasma, proteasas y factor de crecimiento endotelial (VEGF) que se asocian con el aumento de la permeabilidad y fuga vascular (Wan et al., 2018).

Por otra parte, los linfocitos NK participan para limitar la diseminación viral debido a su actividad citotóxica contra células que han sido infectadas, además de la producción de IFN- γ que puede activar a células dendríticas y macrófagos (Zuo & Zhao, 2021). Los neutrófilos también son reclutados al sitio de infección por DENV y de acuerdo con algunos estudios, se ha propuesto que pueden formar NETs (trampas extracelulares de neutrófilos), mismas que juegan un papel crucial ante la infección por patógenos (Muralidharan & Reid, 2021). La inducción de la formación de NETs se ha asociado al dominio III de la proteína E del DENV, de acuerdo con un estudio llevado a cabo en modelo murino, al bloquear la interacción de este dominio con los neutrófilos, se suprime la formación de netosis (Lien et al., 2021). Sin embargo, es importante resaltar que la producción excesiva de NETs puede conducir a procesos inflamatorios descontrolados. Particularmente en un estudio llevado a cabo por (Opasawatchai et al., 2019), se encontró que en pacientes con DG existía una cantidad más elevada de componentes de NETs. Resaltando la funcionalidad de los neutrófilos, en ese estudio se observó que en pacientes con DENV en fase aguda se presentaba un

aumento de CD66b en dichas células, el cual es un marcador de activación de granulocitos y participa en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la degranulación, mismas que poseen actividad antiviral.

Por otra parte, algunos estudios sugieren que la activación excesiva del complemento está asociada a las fases críticas de la enfermedad; se ha descrito que los pacientes que cursan estos estadios tienen niveles circulantes menores de la proteína C3, C4 y el factor del complemento (FB), que es indicativo de un consumo constante. Además, las proteínas C3a y C5a tienen propiedades vasoactivas, que pudieran estar ligadas a la extravasación del plasma que se presenta en pacientes con DG (Carr et al., 2020). La activación del complemento en la infección por DENV, así como en otros flavivirus está relacionada a la proteína NS1; el mecanismo propuesto sugiere que en infecciones secundarias los anticuerpos IgG contra esta proteína da lugar a la formación de inmunocomplejos (por ejemplo, con la proteína c1q) que activan la cascada de complemento para producir los péptidos del complemento C3a y C5a, opsoninas y el complejo de ataque a membrana (MAC).

Mientras las células del sistema inmune innato tratan de contrarrestar la infección, los linfocitos B se activan por antígenos del DENV, lo que puede llevar a la producción de anticuerpos de clase IgM, seguido por IgG; Cabe mencionar que esta última respuesta producida es específica para el serotipo de la infección primaria. Estos anticuerpos tienen como blancos principales a las proteínas NS1, E y PrM. Además, tras la infección las células dendríticas migran hacia los ganglios linfáticos donde pueden activar a linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ (Bhatt et al., 2021).

De acuerdo con diferentes estudios, se han identificado epítomos del DENV capaces de inducir una respuesta específica de las células CD4⁺ y CD8⁺. Particularmente, los CD4⁺ reconocen con mayor frecuencia péptidos de la cápside, seguido de los provenientes de proteína de la envoltura, NS3, NS2A/B y NS5; mientras que la respuesta de los CD8⁺ se dirigen en mayor medida a la NS3, y en menor grado a las proteínas de la cápside, NS5, NS4A/B (Tian et al., 2019). Esto conduce a los CD8⁺ a secretar perforinas y granzimas (respuesta citotóxica), aunque también producen citocinas proinflamatorias.

Por otro lado, los CD4⁺ activos se diferencian en linfocitos cooperadores Th1,2,9 etc., linfocitos T cooperadores foliculares (T_{fh}) y linfocitos T reguladores (T_{reg}). Los linfocitos Th1 se ven involucrados en la producción de IFN- γ , TNF- α e IL-2, los Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-10 e

IL-13, estos a través de la acción de TGF- β e IL-4 pueden diferenciarse a Th9, los cuales se expanden con la ayuda de TNF- α y se encargan de secretar IL-9 (J. Chen et al., 2019).

Por su parte, los T_{fh} (que se encuentran en órganos linfoides secundarios) son importantes para ayudar a los linfocitos B a generar anticuerpos con afinidad específica para el serotipo que esté infectando la célula. Durante la infección aguda por DENV las células T_{fh} se expanden y son activadas durante la fase crítica de la enfermedad. Por último, los T_{reg} median la inflamación a través de la secreción de TGF- β e IL-10 (Cenerenti et al., 2022; Tian et al., 2016).

4.3.6. Mecanismos de inmunopatogénesis

No todas las personas que se contagian por DENV llegan a presentar un cuadro grave, incluso como se mencionó anteriormente, muchos de los casos son asintomáticos. A pesar de que los mecanismos por los cuales la infección por DENV puede ocasionar sintomatología grave no se encuentran completamente elucidados, se ha propuesto que una compleja interacción del virus, la genética y la respuesta inmunitaria del huésped contribuyen a que se desencadene la patogénesis de la enfermedad (Sinha et al., 2024).

Si bien muchos factores inmunológicos están relacionados en la protección ante esta infección, el DG está asociado a una elevada producción de mediadores inflamatorios generados por la activación exacerbada de la respuesta inmune. Con base a ello, algunos de los mecanismos que se proponen para tratar de explicar la patogénesis de la enfermedad son el aumento de la infección dependiente de anticuerpos (ADE) por sus siglas en inglés, la reacción cruzada de los linfocitos T y un fenómeno que puede ocurrir a partir de estos dos que se conoce como “tormenta de citocinas”. (Nanaware et al., 2021; Teo et al., 2023).

4.3.6.1. Aumento de la Infección Dependiente de Anticuerpos (ADE)

El aumento dependiente de anticuerpos (ADE) es un fenómeno inmunológico que se asocia con un incremento en la severidad de la enfermedad en múltiples infecciones virales, no solo por DENV. La causa fundamental de este fenómeno se relaciona con los serotipos del virus. A pesar de que estos se encuentran ampliamente relacionados, cada uno de ellos generará una respuesta inmune específica en el huésped, es decir que los anticuerpos IgG que se produzcan solo serán capaces de neutralizar para el serotipo que infectó al huésped durante una infección primaria. Si se llegara a presentar una infección secundaria por un serotipo diferente, los anticuerpos generados

anteriormente no podrán neutralizar la segunda infección (Teo et al., 2023). Dicho esto, el ADE puede tener lugar a través de dos mecanismos: ADE extrínseco e intrínseco. En el primer mecanismo, el complejo anticuerpo-virus se une a los receptores $Fc\gamma$ ($Fc\gamma R$) presentes en células inmunes como monocitos y macrófagos, infectándolos de manera más eficaz provocando una replicación masiva y un aumento en la carga viral. Por su parte, el ADE intrínseco describe las funciones efectoras mediadas por el Fc, manifestándose con la liberación de mediadores inflamatorios, la disminución de la respuesta inmune innata y el fomento de la proliferación viral (Aynekulu Mersha et al., 2024; Sawant et al., 2023).

4.3.6.2. Reactividad Cruzada Mediada por Linfocitos T

Por otra parte, también se ha propuesto que durante una infección secundaria por un determinado serotipo pueden dominar linfocitos T con reactividad cruzada que se generaron contra un serotipo específico durante una infección primaria, este fenómeno que se conoce como “pecado antigénico original”. Este acontecimiento sugiere que durante una infección secundaria por DENV, la expansión de linfocitos T de memoria que ya existían por la infección primaria posee una menor avidez y conduce a una respuesta diferente de la que se originó por el antígeno inicial. Si bien no se tiene un control viral efectivo, se produce una respuesta inmune aberrante que conduce al fenómeno de la tormenta de citocinas. Esta respuesta de linfocitos T está correlacionada con fases críticas por la infección por DENV, donde se producen en gran medida $TNF-\alpha$ e $IFN-\gamma$, estas en conjunto con otras citocinas se ven involucradas en la potenciación de la inflamación y la alteración de la permeabilidad vascular (Figura 7). Esta hipótesis está respaldada por algunos estudios donde se ha observado que los linfocitos T específicos para cierto serotipo de DENV se encuentran con mayor frecuencia en pacientes con DG en comparación de pacientes con DNG (Elong Ngono & Shresta, 2019; Mapalagamage et al., 2022; Rivino, 2018).

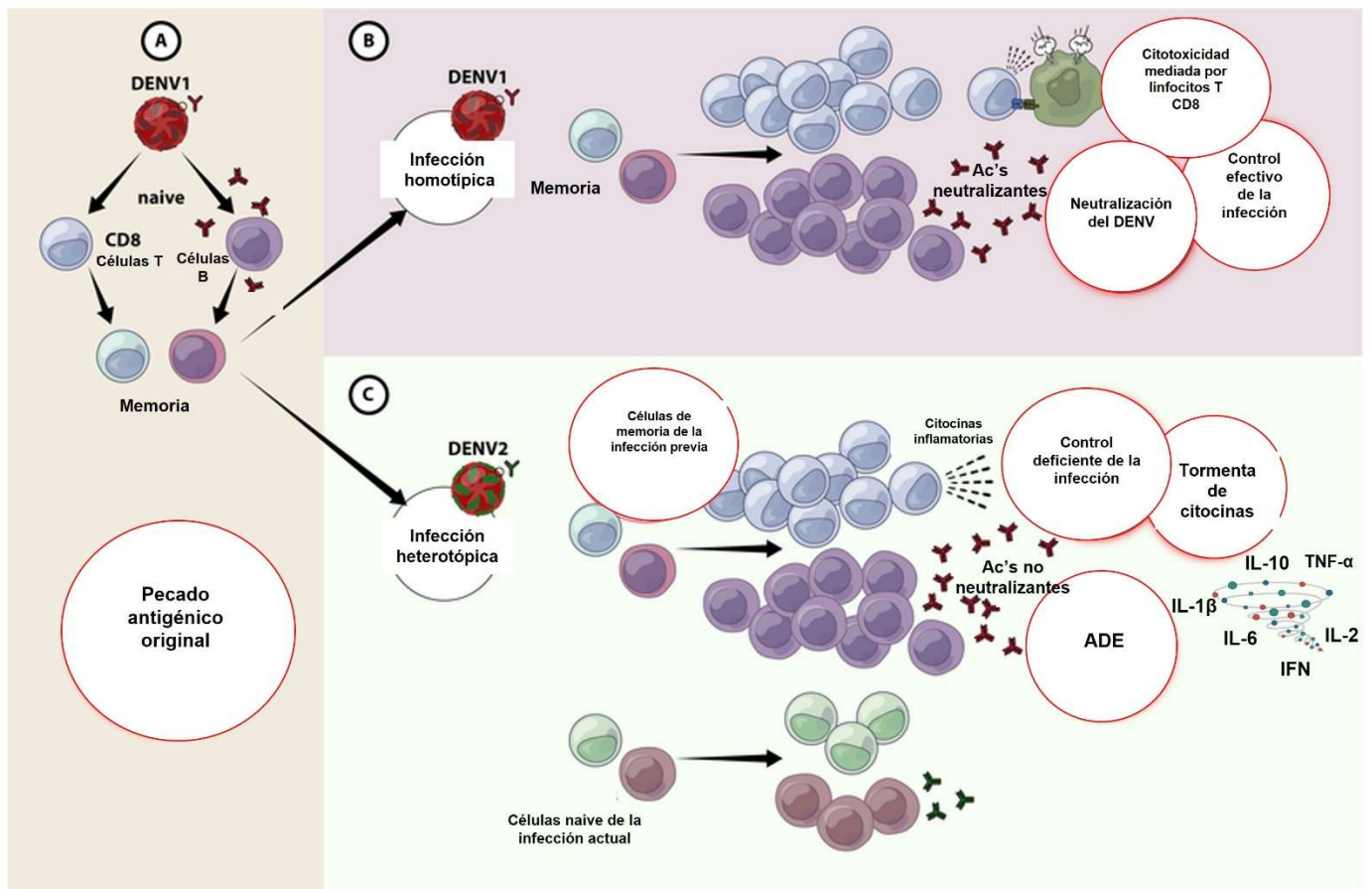


Figura 7. Reactividad cruzada por linfocitos T.

4.3.7. Tormenta de citocinas

Si bien los linfocitos T trabajan en conjunto con otros componentes del sistema inmunitario para contrarrestar la infección por DENV, en algunos pacientes algunas de estas respuestas se encuentran desreguladas y pueden provocarles un daño a través del fenómeno conocido como “tormenta de citocinas”. Este fenómeno se caracteriza por la producción exacerbada de citocinas como IL-1, IL-6, IL-2, IL-10, TNF- α , IFN- α e IFN- γ , y puede ser observado durante el dengue con signos de alarma o dengue grave. La tormenta de citocinas se produce como resultado del desequilibrio entre las respuestas Th1 y Th2. La sobreproducción de IL-10 que se genera con el objetivo de suprimir la acción por citocinas inflamatorias, termina por disminuir la actividad de los interferones (Nanaware et al., 2021; Srikiatkachorn et al., 2017).

Por otra parte, las citocinas pueden inducir la producción y liberación de más citocinas y otros mediadores lo que conlleva a que se forme una red compleja de interacciones dando como resultado el incremento de un gran número de diferentes mediadores. Por ejemplo, los macrófagos producen especies reactivas de nitrógeno tras la liberación de factores citotóxicos, esto a su vez estimula la respuesta de los linfocitos Th2 (Nanaware et al., 2021). Además, junto con los monocitos activados, los macrófagos a través del TLR4 conducen la aparición de la tormenta de citocinas al producir TNF- α e IL-1 β . Esto provoca que se activen otras vías de señalización como p38/JNK y JAK/STAT permitiendo la producción de IL-6 (Kong Yong et al., 2022; Masood et al., 2018). La liberación de todos estos mediadores está asociada al daño endotelial, fuga vascular y daño hepático, que a la vez conlleva a problemas de coagulación, sangrado y en conjunto falla multiorgánica (Figura 8)(Malavige & Ogg, 2024).

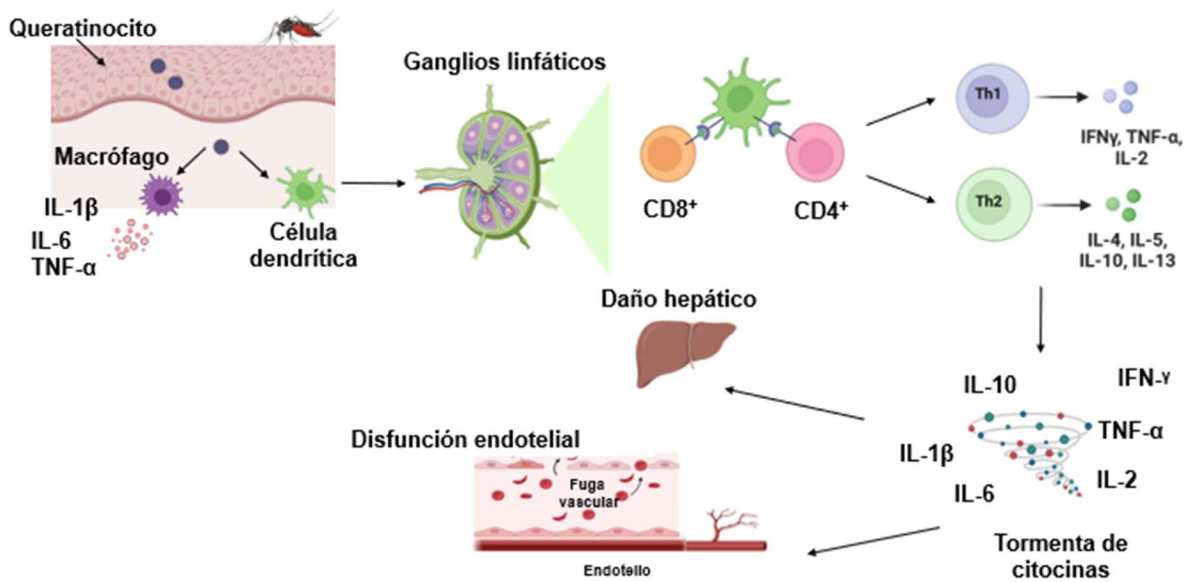


Figura 6. Esquema general de la producción de citocinas durante la infección por DENV. (Imagen realizada en BioRender)

4.3.8. Mediadores de la respuesta inmune

Algunos estudios han descrito la presencia elevada de mediadores como TNF- α , IL-6, IFN's, IL-8, IL-10, IL-1 β , TGF- β 1, por mencionar algunos, en las formas severas de la enfermedad (Jiravejchakul et al., 2025; Sood et al., 2020). Estos mediadores pueden influir de forma directa o indirecta en algunos de los signos y manifestaciones que se presentan en dichos cuadros.

En particular, la alta producción de TNF- α altera las uniones estrechas entre las células endoteliales permitiendo así la fuga vascular y por ende la disfunción del endotelio. Con relación a esto, otros mediadores como neuraminidasas y la catepsina L también son generados durante la infección y estos contribuyen a la degradación del ácido siálico, un componente importante del glicocáliz endotelial. Un estudio llevado a cabo por (Puerta-Guardo et al., 2019) donde se evaluó el efecto de la proteína NS1 de diferentes flavivirus sobre el ácido siálico de distintos tipos de células endoteliales, reveló que la NS1 de Dengue tiene un efecto mayor en la degradación de este glicano en comparación con el resto de los flavivirus (Figura 9).

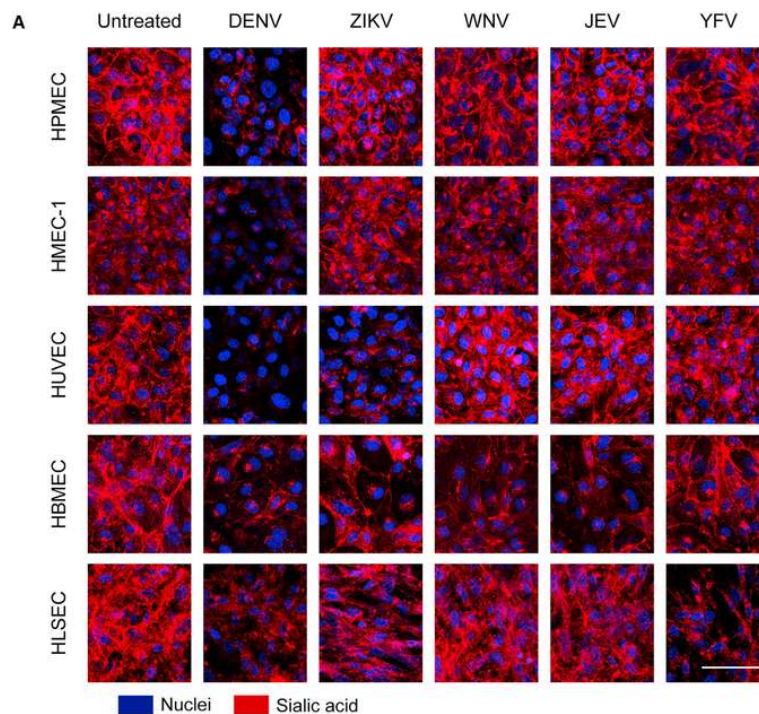


Figura 7. Efecto de NS1 de flavivirus sobre células endoteliales. El virus de Dengue genera una mayor degradación en comparación con el resto de los flavivirus. Imagen tomada de (Puerta-Guardo et al., 2019)

A su vez, la IL-6 también se ve involucrada en el cambio de la permeabilidad vascular al aumentar la secreción de mediadores como fosfolipasa A2 (Masood et al., 2018). Así mismo, un estudio llevado a cabo por Imad et al., 2020 (Imad et al., 2020) sugiere que durante la infección por DENV el sistema endotelial se activa y se produce IL-6 en altos niveles, lo que se asocia a hemorragias y a daño en el hígado que culmina en hepatitis. Esta citocina también participa en la inducción de la fiebre y la inflamación. Se ha demostrado que puede aumentar los niveles de la proteína C reactiva y afectar la cascada de coagulación ya que disminuye la producción del Factor XII, el cual se encarga de iniciar este proceso por la vía intrínseca (Id & Getawa, 2021).

Por otra parte, otra citocina identificada en pacientes con cuadros severos de la enfermedad es la IL-1 β . Este mediador actúa como inductor pirógeno, iniciador de la inflamación o bien puede estimular también la producción de otros mediadores. Además, se tiene evidencia que la IL-1 β en conjunto con TNF- α también incrementa la permeabilidad vascular. Particularmente, en un estudio *in vivo* se demostró que IL-1 β inducía fuga vascular en ratones además de generarles daño en tejido hepático y bazo (Pan et al., 2019). Tratando de explicar un posible mecanismo, en un estudio *in vitro* se demostró que la IL-1 β disminuye los niveles de VE-cadherina en células endoteliales, provocando una disrupción en estas células. Otros estudios sugieren que provoca que las plaquetas produzcan mayores cantidades de óxido nítrico, lo que podría correlacionarse con la hemorragia y fuga vascular (Mendonca et al., 2022)

En pacientes con DG también se han encontrado altos niveles de citocinas antiinflamatorias, como IL-10. Sin embargo, se ha descrito que dependiendo de las variaciones genéticas de este mediador se pueden presentar diferentes efectos, por una parte, una mayor acción protectora, pero por la otra efectos asociados a la patogénesis (Duc Anh et al., 2025). Particularmente, en este aspecto, la alta producción de IL-10 se ha asociado a apoptosis de linfocitos T y un mayor número de linfocitos atípicos (Jiravejchakul et al., 2025). También, algunos estudios plantean que este mediador puede afectar la respuesta de los IFN's tipo I y por lo tanto provocar que la carga viral persista por más tiempo (Tsai et al., 2013).

5. Antecedentes

Durante una respuesta inmune primaria, el DENV es reconocido por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR's) que se encuentran presentes en células como macrófagos, células de Langerhans y células dendríticas. Dentro de los PRR's se encuentran los receptores tipo Toll (TLR), que se encargan de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) virales para desencadenar una determinada respuesta inmunológica (Fernandes-Santos & de Azeredo, 2022; Kayesh et al., 2021). Se han descrito 13 miembros de TLR en mamíferos, de los cuales solo 10 han sido identificados en el ser humano; estas moléculas al interactuar con ciertos ligandos de patógenos activan cascadas de señalización que culminan en la producción de mediadores inmunológicos. Se sabe que los TLR endosomales (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) se encargan de reconocer ácidos nucleicos como ARN de una cadena o doble, así como DNA y están asociados con las infecciones virales. No obstante, se ha sugerido que más de un TLR puede estar involucrado en el reconocimiento del DENV (Fernandes-Santos & de Azeredo, 2022; Luan et al., 2024). De acuerdo con diferentes reportes, en algunos pacientes con DNG se ha encontrado la expresión de TLR3 y TLR9 en células dendríticas (Torres et al., 2013), mientras que en pacientes con DG se ha reportado la expresión de TLR4 y TLR7 (de Kruif et al., 2008).

De manera general, el mecanismo propuesto para la activación de los TLR sugiere que su asociación con proteínas Siglec (que se encargan de unir ácido siálico) impide su dimerización y por lo tanto no se activan. No obstante, cuando el TLR reconoce un agonista, un complejo enzimático compuesto por Neu-1 y una metaloproteasa ejercen su acción para desencadenar señales con el objetivo de iniciar una respuesta inflamatoria. Particularmente, Neu-1 migra hacia la membrana celular donde remueve residuos de ácido siálico en enlaces α -2,3 asociados a residuos β -galactosil causando la separación de proteínas Siglec de los TLR y por lo tanto permitiendo su dimerización. Este conjunto de procesos permite que se induzca una cascada de señalización iniciada por MyD88 que culmina con la activación de NF- κ B que a su vez habilita la producción de citocinas inflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Figura 10) (Abdulkhalek & Szewczuk, 2013; Amith et al., 2010; G. Y. Chen et al., 2014). Por este motivo, el efecto de la Neu-1 en la activación de la respuesta inmune la convierte en un potencial blanco terapéutico en enfermedades donde la producción de citocinas inflamatorias ejerza un daño a los pacientes. De acuerdo con algunos estudios, fármacos como el OSV ha mostrado potencial para inhibir la Neu-1 y así inhibir

vías de señalización que a su vez evitan la producción de citocinas inflamatorias (Amith et al., 2009; O'Shea et al., 2014).

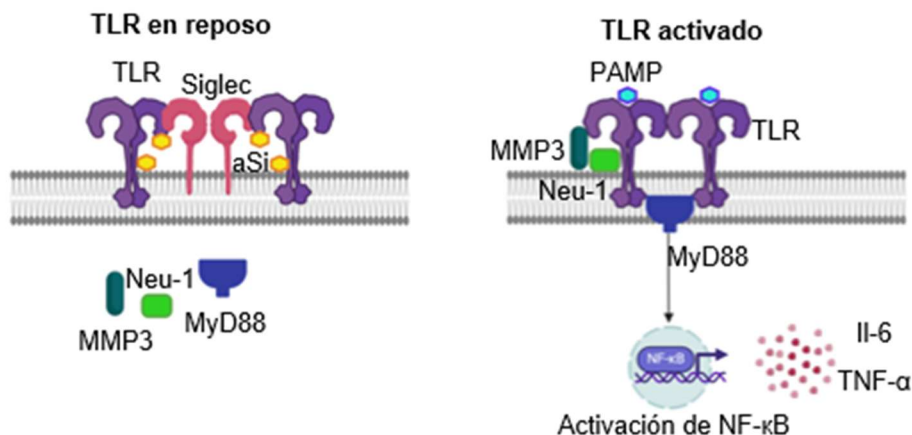


Figura 8. Esquema general de la activación del TLR. El TLR en reposo se encuentra asociado a moléculas que reconocen ácido siálico y por lo tanto no puede dimerizarse y desencadenar una respuesta. Sin embargo, cuando está activado, un complejo enzimático que involucra a la neuraminidasa 1, se encarga de translocarse a la superficie celular para remover los residuos de ácido siálico y permitir la dimerización del TLR desencadenando la liberación de citocinas inflamatorias. (Imagen realizada en Bio-Render).

5.1. Oseltamivir

Químicamente el OSV es un etil éster que puede estar conjugado a un grupo fosfato y tiene un peso molecular de 410.4 g/mol. Esta molécula es utilizada como tratamiento de la infección por el virus de la influenza. El OSV se administra de forma oral como un profármaco en su estructura de oseltamivir fosfato, y cuando se metaboliza por enzimas hepáticas es transformado a su forma activa (oseltamivir carboxilato). Su mecanismo de acción radica en la unión e inhibición del sitio activo de las neuraminidasas que se encuentran en la superficie de los viriones; estas proteínas son importantes para la entrada viral en las células no infectadas, para la liberación de partículas virales recién formadas y para la propagación de los viriones en el organismo (Figura 11).

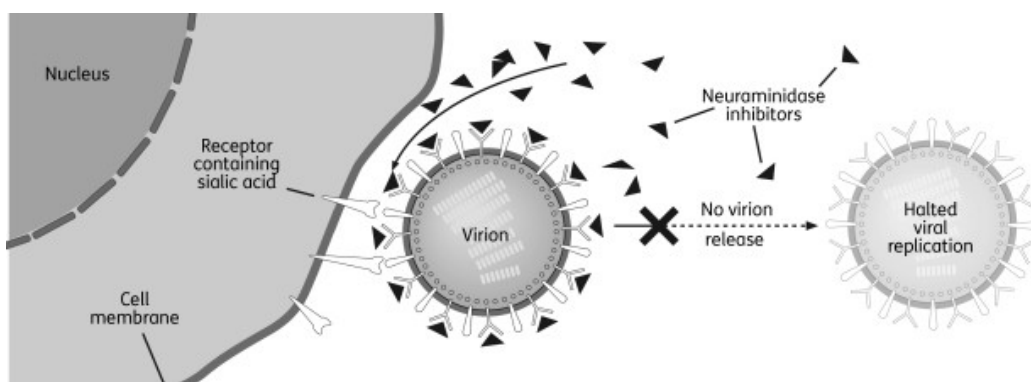
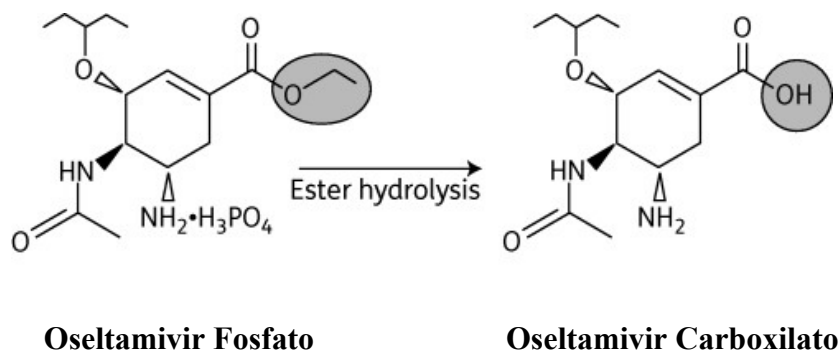


Figura 9. Mecanismo de acción del oseltamivir. El oseltamivir es un profármaco cuya forma activa es el oseltamivir carboxilato, este inhibe la actividad de las neuraminidasas evitando la liberación de viriones de influenza.

5.1.1. Efecto del Oseltamivir y la Producción de Citocinas Inflamatorias

A pesar de que el OSV es un fármaco que inhibe las neuraminidasas del virus de la influenza, algunos estudios han demostrado que también puede inhibir las neuraminidasas celulares. De acuerdo con los estudios de Abdulkhalek y colaboradores, OSV fosfato inhibe la actividad de Neu-1 cuando células dendríticas y monocitos de ratón son estimuladas con LPS. La unión de este ligando con TLR4 aumenta la actividad de sialidasas, particularmente Neu-1 y Neu-3 provocando la producción de citocinas inflamatorias como IL-5, IL-12-p40 y TNF, la inhibición de la Neu-1 por OSV reduce la producción de dichas citocinas. De igual manera, se ha demostrado que el OSV fosfato inhibe la activación de NF- κ B en macrófagos de ratón y en consecuencia la producción de citocinas inflamatorias, así como óxido nítrico (Amith et al., 2010).

En estudios realizados por el mismo grupo de trabajo, se ha demostrado que la unión de ligandos como LPS a TLR-4 aumenta la actividad de sialidasas, en su mayoría Neu-1 y Neu-3 que

se encuentran en la membrana de células dendríticas y macrófagos. La Neu-1 retira los residuos 2,3-sialil asociados a galactosa permitiendo la dimerización de TLR-4 y por consiguiente la activación de la metaloproteinasa 9 (MMP-9). Específicamente, la actividad de estas sialidasas aumenta la producción de IL-6, IL-12-p40, y TNF inducida por LPS; además, se observó una inhibición de su actividad por Tamiflu® (Oseltamivir fosfato) reduciendo la producción de estas citocinas, en la respuesta a LPS (Abdulkhalek et al., 2011; Abdulkhalek y Szewczuk, 2013).

5.2. Ivermectina

La IVM es un medicamento semisintético derivado de las avermectinas (Figura 12) que se utiliza para el tratamiento de enfermedades parasitarias como oncocercosis, strongiloidiasis, tricuriasis, entre otras (Crump & Omura, 2011). No obstante, en la actualidad se encuentra reposicionado para el tratamiento de lesiones inflamatorias asociadas a la rosácea (Cardwell et al., 2016).

El mecanismo de acción antiparasitario de la IVM radica en su unión selectiva a los canales de cloruro que se activan por glutamato en células musculares y nerviosas de los helmintos. Esta unión provoca un aumento de la permeabilidad de la membrana celular a los iones cloruro y por lo tanto se da lugar a una hiperpolarización de la célula provocando la parálisis y muerte de los parásitos. De igual manera actúa como agonista del ácido gamma-aminobutírico (GABA) activando canales de cloro sensibles alternando la transmisión neurosináptica mediada por este neurotransmisor en el sistema nervioso central (Martin et al., 2021).

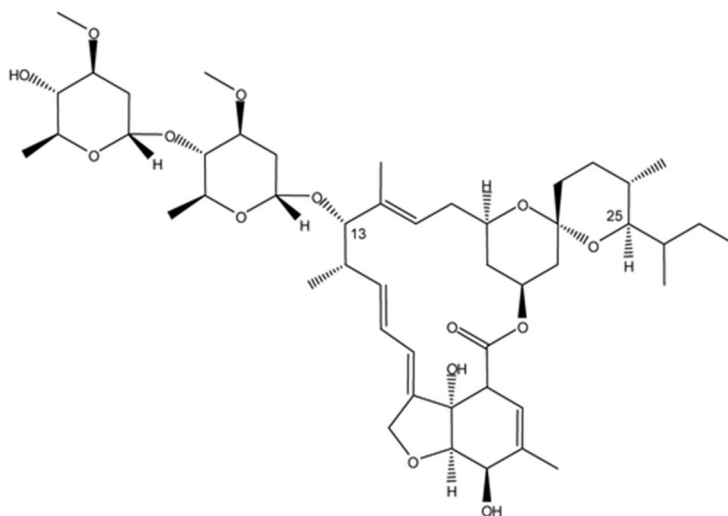


Figura 10. Estructura química de la ivermectina.

En estudios *in vitro* se ha demostrado el potencial antiviral de la IVM ante virus como el VIH, Chikungunya y flavivirus incluyendo DENV (S. N. Y. Yang et al., 2020). Por ejemplo, se ha reportado que la IVM actúa inhibiendo la importación de NS5 debido a la inhibición de las importinas nucleares IMP α / β 1 desencadenando una disminución de la replicación viral. Este hecho es relevante ya que a pesar de que la NS5 de DENV desempeña un papel importante en la replicación viral en el citoplasma de la célula huésped, se ha descrito que su presencia en el núcleo celular es indispensable durante etapas específicas de la replicación viral (Mastrangelo et al., 2012). Asimismo, otros autores han demostrado que la IVM también actúa sobre la vía de la IMP α / β 1 para impedir el transloque de la proteína NS3 al núcleo alterando la replicación del DENV (Palacios-Rápalo et al., 2023a). Por último, se ha encontrado que la IVM también inhibe la secreción de la NS1 hacia el medio extracelular a través de la alteración de su plegamiento en el RE; existen proteínas chaperonas que actúan con NS1 como la GRp78 que se encuentra de manera abundante durante la infección por DENV y que actúan a través de la activación de la respuesta a proteínas no plegadas (UPR). La IVM bloquea el transporte de factores de transcripción necesarios para UPR impidiendo así la regulación de GRp78 y por lo tanto la secreción de NS1 (Denolly et al., 2023).

A pesar de que se tiene esta evidencia antiviral de la IVM *in vitro*, en el único estudio clínico que se ha reportado hasta el momento, no se observó el mismo resultado. En el ensayo llevado a cabo por (Suputtamongkol et al., 2021) se evaluó el efecto de la IVM en pacientes con DENV y que cursaban manifestaciones clínicas de riesgo y severas para ver si se observaba alguna mejoría en ellos. Sin embargo, lo que observaron fue que las muestras de suero de pacientes que recibieron el tratamiento con IVM presentaban una disminución de la NS1, más no se veía una mejora en el cuadro clínico de la enfermedad.

Es conocido que la IVM fue de gran interés durante la pandemia por COVID-19, sin embargo, su uso genera controversias puesto que actualmente no se encuentra aprobado por regulaciones sanitarias para el tratamiento de infecciones virales. A pesar de ello, varios estudios clínicos mostraron que en los pacientes tratados con IVM la carga viral disminuía, y en algunos casos, aunque se presentaban síntomas de la enfermedad, no se tenía que intubar a los pacientes (Awad et al., 2022).

5.3. Tratamiento Combinado de Ivermectina y Oseltamivir

A pesar de que la IVM y el OSV son medicamentos que actualmente funcionan como tratamientos aprobados por instituciones sanitarias correspondientes y que se pueden describir como agentes inocuos, estos al igual que otros fármacos podrían presentar interacciones cuando son evaluados en combinación.

En la práctica clínica es de utilidad utilizar diferentes bases de datos para evaluar las posibles interacciones entre medicamentos. Ejemplos de ellas son Micromedex y Multum MediSource Lexicon (MMSL) (Fung et al., 2017). Al buscar posibles interacciones entre OSV e IVM no se encuentra información que indique alguna de ellas en estas bases de datos. Además, actualmente no se tienen estudios *in vitro*, *in vivo* o ensayos clínicos donde se evalué la interacción o posible toxicidad que generen estos fármacos. Sin embargo, en un análisis *in silico* donde se evaluó la combinación de ivermectina, oseltamivir y otros fármacos, se sugiere que cuando se utilizan en conjunto hay una buena inhibición de una proteasa viral de SARS-CoV-2 y se propone que dichas combinaciones pudieran ser utilizadas en la terapia por la enfermedad (Arouche et al., 2021).

6. Justificación

De acuerdo con datos de la OMS, se estima que cerca de 500 millones de personas en América están en riesgo de contraer dengue convirtiendo a esta infección en un problema de salud pública. En México, en las últimas décadas el número de casos se ha incrementado notablemente. A pesar de que el índice de mortalidad no es alto comparado a otros patógenos, una de las repercusiones de esta enfermedad radica en el impacto económico, acorde a Laserna et al, 2018 (Laserna et al., 2018) el costo anual promedio para el dengue en 2018 fue de más de USD 3.000 millones (tomando datos de varios países de América Latina). Además, de acuerdo con datos del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) la carga económica del DENV en México oscila los 170 millones de dólares anuales. Los costos directos están representados por la inversión monetaria al Sistema de Vigilancia Epidemiológica además de los casos de los pacientes hospitalizados. La hospitalización de pacientes por infección del DENV se debe a que presentan alteraciones sistémicas mediadas en gran parte por la producción de citocinas inflamatorias. Destacando que la infección por DENV no posee un tratamiento específico, es importante llevar a cabo estudios que permitan proponer posibles farmacoterapias que logren mediar la respuesta inflamatoria evitando así que no se presenten las manifestaciones graves de la enfermedad. Asimismo, este proyecto hace relevante la reposición de fármacos mediante la evaluación de dos medicamentos que son utilizados para el tratamiento de otras enfermedades y que actualmente se encuentran aprobados por las regulaciones sanitarias correspondientes. El reposicionamiento de fármacos es esencial para buscar terapias eficaces para otras enfermedades que permitan reducir los costos y plazo de desarrollo de medicamentos.

7. Hipótesis

El tratamiento combinado de ivermectina/oseltamivir disminuirá la replicación viral y la secreción de TNF- α e Il-6 en las células THP-1 infectadas por virus dengue.

8. Objetivos

8.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de la combinación de ivermectina/oseltamivir en la infección y secreción de citocinas TNF- α e IL-6 sobre células THP-1 infectadas por virus dengue.

8.2. Objetivos Particulares

1. Determinar la toxicidad de la combinación de ivermectina y oseltamivir sobre células THP-1 diferenciadas a macrófago.
2. Determinar el efecto de la combinación de ivermectina y oseltamivir sobre el porcentaje de infección en células THP-1 diferenciadas a macrófago.
3. Evaluar el efecto de la combinación de ivermectina/oseltamivir sobre la expresión y secreción de IL-6 y TNF- α en células infectadas.

9. Metodología

9.1. Cultivo y Diferenciación de células THP-1

Las células THP-1 (ATCC TIB 202) se crecieron en medio RPMI-1640 Advanced (Gibco) complementado con 100 mM de Glutamina y 3% de suero fetal bovino (SFB), se cultivaron en un ambiente al 5% CO₂ y a 37°C, sin agitación.

La diferenciación de las células se llevó a cabo en placas de cultivo de 24 pozos. En cada pozo se colocaron cubre objetos redondos previamente esterilizados, y se sembró una densidad 1.2×10^5 células por pozo en un volumen de 0.5 mL de medio RPMI advanced suplementado con 3% de SFB y forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) 10 nM. Las células se incubaron durante 72 h en una atmósfera con 5% CO₂ a 37 °C, sin agitación durante 72 horas.

9.2. Determinación de la Citotoxicidad de los fármacos por el Ensayo de MTT

Para el ensayo de MTT, primero se realizó un análisis para determinar el número de células que se tenían que sembrar en una placa de 96 pozos. Existen diferentes protocolos que sugieren un número determinado de células dependiendo la tasa de duplicación de las células, sin embargo, la línea celular de THP-1 una vez que está diferenciada ya no se duplica. Para la prueba se sembraron desde 4×10^3 hasta 6.4×10^4 células por pozo en un volumen de 100 µL para diferenciarlas con PMA 10 nM por 72 h. Posterior a la diferenciación, se siguió la metodología descrita por (Freshney, 2016) con algunas modificaciones: se realizó un lavado con PBS y se añadieron 100 µL de RPMI Advanced y 20 µL del reactivo de MTT (5 mg/mL). La placa se incubó en resguardo de la luz a 37°C por 4 h. Pasado el tiempo de incubación, se retiró el medio con el reactivo de MTT y se añadieron 100 µL de DMSO y 25 µL del Buffer de Sorensen. Se incubó la placa a temperatura ambiente por 10 minutos para después leer la densidad óptica a 570 nm en un lector de microplaca (BioTek, Epoch). Se realizaron triplicados en tres ensayos independientes.

Una vez que se determinó el número de células a sembrar por pozo, se procedió con el ensayo de toxicidad con los fármacos de interés. Para ello se prepararon soluciones stock de IVM al 0.05 M en etanol al 70% y OSV 0.01 M. Se sembraron 3×10^4 cel/pozo en una placa de 96 para posteriormente diferenciarlas como se ha descrito anteriormente. Posterior a la diferenciación se colocaron por separado cada uno de los tratamientos de interés, en el caso de la IVM se realizaron diluciones a partir del stock y con medio RPMI para tener concentraciones

finales de 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 1 y 5 μM en 200 μL por pozo. Como vehículo (control negativo) se utilizó etanol al 0.01%. En el caso de OSV se utilizaron concentraciones de 0.1, 0.5, 1, 5, 10 y 50 μM y como vehículo el medio RPMI solo. Cómo control positivo de muerte celular se utilizó DMSO al 10%. El tratamiento con los fármacos fue de 72 h y después de este tiempo se siguió la metodología descrita en el párrafo anterior para añadir el reactivo de MTT. Se realizaron triplicados en tres ensayos independientes.

9.3. Evaluación del efecto del Oseltamivir sobre la actividad de Neuraminidasa

La evaluación de actividad de enzimas neuraminidasas se realizó por medio de microscopia de epifluorescencia siguiendo la metodología de Abdulkhalek et al., 2011. Las células se diferenciaron siguiendo las condiciones del apartado 6.1, en cajas de 24 pozos sobre cubreobjetos. Para realizar el análisis, las células diferenciadas se colocaron en arresto con medio RPMI advanced sin suero fetal bovino 3 horas antes del ensayo.

Los cubre objetos con las células diferenciadas se extrajeron de las cajas y se colocaron sobre portaobjetos con las células adheridas hacia abajo. Previamente sobre los portaobjetos se colocaron los reactivos de la siguiente forma:

Ensayo	Reactivo				
	PBS	4-MUNANA	LPS	DANA	OSV
Control	4 μL	2 μL			
Control Positivo con LPS	2 μL	2 μL	2 μL		
LPS y tratamiento con DANA		2 μL	2 μL	2 μL	
LPS y tratamiento con OSV		2 μL	2 μL		2 μL

Los reactivos se colocaron conforme sería analizada cada muestra bajo el microscopio.

El sustrato 4-MUNANA es hidrolizado por las neuraminidasas, generando el fluoróforo libre 4-metilumbeliferil, que tiene una emisión de fluorescencia de 450 nm (color azul) después de una excitación a 365 nm. Las imágenes fueron tomadas entre 1 y 5 minutos después, utilizando microscopio de epifluorescencia (Zeiss Imager objetivo 20X), y las imágenes se analizaron con el programa Axio imager. Para hacer un análisis más cuantitativo se utilizó el software Image J para estimar la Intensidad Media de Fluorescencia.

9.4. Expansión del Dengue 2 cepa Nueva Guinea

El virus Dengue serotipo 2 de la cepa Nueva Guinea C (DENV-2 NG) fue donado por el Dr. Salvador Hernández del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). Los ratones BALB/c fueron donados por el CISEI (Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas) del INSP. Para la expansión del stock viral se utilizó el protocolo descrito en el “Manual de las técnicas de laboratorio para el estudio de los Virus del Dengue” del Instituto Pedro Kouri del 2005, para aislar virus a partir de cerebros de ratones neonatos infectados, por punción intracraneal. Para esto, inicialmente, se desinfectaron con etanol al 70%, las cabezas de ratones BALB/c de 1-3 días de nacidos se inocularon por punción intracraneal 20 μ L del virus. Posteriormente, los ratones fueron observados diariamente durante 5 días hasta que comenzaron a presentar síntomas de infección (caracterizado generalmente por un cuadro encefálico, que comprende erizamiento del pelo, marcha en punta de patas, ausencia de leche en vientre, temblores, parálisis en las patas) causados por el efecto citopático en tejido cerebral.

Cuando los ratones mostraron síntomas de parálisis (4 a 5 días post inoculación), se procedió a sacrificarlos y se almacenaron a -70°C . Los ratones se sumergieron en etanol al 70% y posteriormente se recuperó el tejido cerebral por medio de una jeringa. Los cerebros se homogenizaron y centrifugaron a 13000 rpm por 1 hora a 4°C . El sobrenadante fue filtrado en membrana de $0.2\mu\text{m}$ y se realizaron alícuotas, las cuales se mantuvieron a -70°C hasta su uso.

9.5. Titulación del Stock Viral

Para la titulación del stock viral se utilizó el ensayo de formación de placas en monocapas confluentes de células BHK-21 (ATCC CCL-10), siguiendo la metodología descrita en el Manual de las técnicas de laboratorio para el estudio de los Virus del Dengue del Instituto Pedro Kouri del 2005.

Las células se sembraron a una concentración de 2.5×10^5 cel/pozo en placas de 24 pozos utilizando medio DMEM (Gibco) suplementado con SFB al 10%. Una vez que las células alcanzaron un $>90\%$ de confluencia (aproximadamente 24 h), se lavaron 2 veces con PBS Dulbecco (Gibco) y se procedió a añadir las diluciones seriadas del stock viral (200 μ L), las cuales

se prepararon en PBS Dulbecco con SFB al 0.5%. Las placas fueron incubadas por 4 horas a 37° C en atmósfera de 5% de CO₂. Al término de este lapso, se retiró el inóculo viral y se hizo un lavado con PBS Dulbecco. Se añadió el medio Overlay (500 µL) que consistió en Carboximetilcelulosa al 0.8%, DMEM 2x (Gibco) y SFB al 2%. Las placas se incubaron por 5 días. Por último, se fijaron las células con formaldehído al 4%, y fueron teñidas con Cristal Violeta al 1%.

El título viral se expresó mediante la siguiente fórmula acorde con (Flint et al., 2020):

$$\frac{PFU}{mL} = \frac{\# \text{ placas}}{mL \text{ de inóculo} \times \text{factor de dilución}}$$

9.6. Infección de las células THP-1 con Virus Dengue

Las células THP-1 se incubaron y diferenciaron. Después de 72 horas de diferenciación se retiró el medio, se lavó con PBS Dulbecco (Sigma Aldrich) dos veces y se colocó el virus en PBS Dulbecco a una MOI de 1. Se incubó por 2 h a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente se retiró el inóculo viral y se volvió a lavar con PBS Dulbecco. Finalmente se agregó medio RPMI-Advanced con 3 % SFB. La infección se dejó por 12, 24 y 48 h.

9.7. Inmunotinción para Detección de Infección

Se diferenciaron 2×10^5 células en cubreobjetos, y se infectaron según lo descrito en el apartado 9.6. Posteriormente se fijaron con una solución 1:1 de metanol acetona (previamente enfriada a -20°C) durante 20 minutos. Se lavaron dos veces con PBS y se añadió Tritón 0.5% en PBS dejando incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. Se volvió a lavar 2 veces con PBS y se bloqueó por 1 h con albúmina sérica bovina (BSA) al 1 % en PBS. Posteriormente se lavó 2 veces con PBS y se colocó el α -Dengue (Santa Cruz) diluido 1:50 en PBS por 2 h a 37°C. Nuevamente se hicieron lavados con PBS y se colocó el anticuerpo secundario α -Ratón PE diluido 1:100 en PBS por 2 h a resguardo de la luz. Finalmente se lavó con PBS, se retiraron los cubreobjetos y se colocaron en un portaobjetos a los que previamente se les añade 10 µL de medio de montaje (Dapi-Fluoromount-GTM), dejando secar por 5 minutos. El análisis se realizó en un microscopio de fluorescencia (Nikon) con un objetivo 20X y el programa analizador de imágenes NIS-Elements-ND2.

9.8. RT-PCR anidada para Detección de Infección

Se pusieron a diferenciar 1.5×10^6 en placas Petri de cultivo y se infectaron como se describió anteriormente. Una vez culminado el tiempo de infección (24, 28 o 72 h) se procedió a extraer el ARN. Este procedimiento se realizó por la técnica de columna. Se utilizó el kit de FAVORGEN FavorPrep™ Tissue Total RNA Mini Kit. El ARN extraído se cuantificó en un lector de microplaca (BioTek, Epoch) y se analizó su integridad al correr un gel de agarosa al 1% con buffer TAE a 120 V por 20 minutos. Una vez que se obtuvo un ARN con buena integridad se realizó la síntesis de ADN complementario (cADN). Se utilizó el kit Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis (catálogo K1622), a continuación, en la Tabla 1 se indican los reactivos y las cantidades necesarias para la mezcla de reacción.

Tabla 1. Componentes para la síntesis de ADNc.

Componentes	Cantidad
Templado ARN	2 µg
Random primer	1 µL
H ₂ O libre de nucleasas	Completar a 12 µL
Volumen total	12 µL
Buffer de reacción	4 µL
RiboBlock RNasa	1 µL
dNTP 10 mM	2 µL
Enzima TR	1 µL
Volumen Total	20 µL

Estos componentes se sometieron a las siguientes condiciones:

Tabla 2. Condiciones para síntesis de ADNc.

Temperatura °C	Tiempo (min)
25	5
42	60
70	5

Una vez sintetizado el ADNc se procedió a seguir la metodología de (Lanciotti et al., 1992) con algunas modificaciones. Se utilizó el PCRBIO Taq Mix Red (PCR BIOSYSTEMS) y se

realizaron dos rondas de amplificación. Para la primera ronda se utilizó la mezcla de reacción en las cantidades descritas de la Tabla 3, los oligonucleótidos D1 y D2 de la Tabla 4 y las condiciones de la Tabla 6. El producto resultante se diluyó 1:100 en agua libre de nucleasas y fue sometido a una segunda ronda de amplificación a las mismas condiciones de la Tabla 5 y se utilizaron los mismos componentes de la Tabla 4 manteniendo el oligonucleótido D1 pero sustituyendo D2 por TS2. Cabe mencionar que las secuencias de los oligonucleótidos también fueron tomadas de lo reportado por (Lanciotti et al., 1992).

Tabla 3. Mezcla de reacción para la primera amplificación.

Componentes	Cantidad
Buffer 2x PCRBIO	5 µL
D1 10 µM	0.4 µL
D2 10 µM	0.4 µL
ADNc	4.2 µL

Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para PCR anidada de DENV-2.

Nombre	Secuencia
D1	5'-TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G-3'
D2	5'-TTG CAC CAA CAG TCA ATG TCT TCA GGT TC-3'
TS2	5'-CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG-3'

Los oligonucleótidos fueron elaborados en la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Tabla 5. Condiciones para PCR anidada de DENV-2.

	Temperatura °C	Tiempo (s)	Ciclos
Inicio	95	60	1
Desnaturalización	95	15	35
Alineamiento	55	30	
Extensión	72	60	
Final	72	420	1

9.9. Evaluación del Tratamiento de Ivermectina y Oseltamivir sobre la replicación de DENV-2.

Para evaluar el efecto del tratamiento de IVM y OSV sobre la replicación de DENV-2 se realizó un ensayo de qPCR con el objetivo de determinar el número de copias virales en presencia o ausencia de los tratamientos. Se utilizó el kit de qPCR GreenMaster highROX de Jena Bioscience (cat. PCR-374S). En primera instancia, se realizó una curva estándar a partir del plásmido pJETL2/blunt que expresa la proteína C del virus (151 bp) y el cual fue donado por la Dra. Rosa María del Ángel del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (Cinvestav) del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

Las secuencias de los oligonucleótidos fueron proporcionadas por el grupo de trabajo de la Dra. Rosa María. Estos se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 6. Secuencias de oligonucleótidos de la proteína C de DENV-2 (qPCR).

Nombre	Secuencia
Sentido	5'-CAA TAT GCT GAA ACG CGA GA-3'
Anti-sentido	5'-TGCT GTTG GTG GGA TTG TTA -3'

Las curva estándar se realizó por duplicado a partir de 10^2 copias del plásmido y culminado en 10^8 . Para cada reacción se utilizaron las siguientes cantidades tomando en cuenta las indicaciones del inserto del Kit.

Tabla 7. Mezcla de reacción para qPCR.

Componentes	Cantidad
Buffer 2x qPCR GreenMaster	5 μ L
S 10 μ M	0.4 μ L
AS 10 μ M	0.4 μ L
ADN	1 μ L
Agua libre de nucleasas	3.2 μ L
Total	10 μ L

La reacción se llevó a cabo en el equipo CFX-96 Real Time PCR de Bio-Rad con base a las siguientes condiciones:

Tabla 8. Condiciones para qPCR.

	Temperatura °C	Tiempo (s)	Ciclos
Inicio	95	120	1
Desnaturalización	95	10	40
Alineamiento	60	30	

El cálculo para el número de copias virales se realizó mediante un análisis de regresión lineal en el software Graphpad prism tomando los resultados de la curva estándar.

9.10. Evaluación del Tratamiento de Ivermectina y Oseltamivir sobre la expresión de ARNm de TNF- α e IL-6

Para cada reacción de PCR se utilizaron las mismas cantidades descritas en la Tabla 3, sólo cambiando para los oligonucleótidos correspondientes para cada una de las citocinas. Los oligonucleótidos para TNF- α se tomaron de la página web de proveedores de insumos genómicos Origene. En el caso de IL-6, las secuencias fueron tomadas de (Conceição et al., 2010). No obstante, para ambas citocinas, las secuencias fueron analizadas en BLAST del NCBI y SnapGene para corroborar su alineación con el producto de interés correspondiente.

Las secuencias de oligonucleótidos se muestran en las siguientes tablas.

Tabla 9. Secuencias de oligonucleótidos para TNF- α (qPCR).

Nombre	Secuencia
TNF Sentido	5'- CTC TTC TGC CTG CTG CAC TTT G-3'
TNF Anti-sentido	5'- ATG GGC TAC AGG CTT GTC ACT C -3'

Tabla 10. Secuencias de oligonucleótidos para IL-6 (qPCR).

Nombre	Secuencia
IL6 Sentido	5'- TGT GAA AGC AGC AAA GAG GCA CTG-3'
IL6 Anti-sentido	5'- ACA GCT CTG GCT TGT TCC TCA CTA -3'

Para la amplificación de TNF- α se siguieron las mismas condiciones que se describieron en la Tabla 8. En el caso de IL-6 sólo se cambió la temperatura de alineación a 64°C.

La cuantificación de ambos genes de las citocinas se realizó de manera relativa con base a la expresión del gen endógeno GAPDH mediante la fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$. La secuencia de los oligonucleótidos empleados se muestra en la siguiente tabla. Estas fueron proporcionadas amablemente por el grupo de trabajo del Dr. Óscar Peralta del INSP.

Tabla 11. Secuencias de oligonucleótidos para GAPDH.

Nombre	Secuencia
GAPDH Sentido	5'- CAG GGC TGC TTT TAA CTC TGG TAA-3'
GAPDH Anti-sentido	5'- GGG TGG AAT CAT ATT GGA ACA TGT -3'

9.11. Evaluación del Tratamiento de Ivermectina y Oseltamivir sobre la producción de TNF- α e IL-6 mediante Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzima (ELISA).

9.11.1. TNF- α

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la producción de TNF- α en los macrófagos infectados se utilizó un kit de ELISA específico para TNF- α humana (Human TNF- α ELISA MAXTM Deluxe, Biolegend®). Lo primero que se realizó fue reconstituir el estándar liofilizado en BSA 1% en PBS pH 7.3, se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos y se vortexeó durante unos segundos para hacer alícuotas y almacenarlas a -70°C.

En una placa de 96 pozos, se dejó incubando el anticuerpo de captura toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se retiró el anticuerpo y se realizaron 4 lavados con 300 μ l de PBS pH 7.3/Tween 0.05% eliminando la mayor cantidad de líquido mediante golpes firmes sobre una toalla absorbente. Se agregaron 100 μ l de BSA 1 % en PBS pH 7.3 para bloquear la placa y se incubó durante 1 hora. Durante este tiempo se realizaron las diluciones correspondientes para la proteína estándar con el objetivo de tener una curva desde 7.8 a 500 pg/mL. Las muestras problema también fueron diluidas acorde con lo mencionado en el inserto del kit quedando en una dilución 1: 100.

Transcurrido el tiempo, se retiró el BSA y se repitieron los 4 lavados con PBS/Tween; se colocaron las diluciones de la proteína estándar en orden descendente por duplicado y las muestras diluidas correspondientes a las 3 réplicas de los ensayos. Se dejaron incubando durante 2 horas, y

se volvió a lavar 4 veces. Posteriormente se agregaron 100 µl del anticuerpo de detección (diluido 1:200) y se dejó incubando por 1 hora. Después se retiró el anticuerpo y se repitieron los lavados. Se agregaron 100 µl de la avidina-HRP (diluida 1:1000) y se dejó incubando durante 30 minutos. Transcurrido este período, se hicieron 5 lavados con una duración de 1 min cada uno. Se agregaron 100 µl de TMB y se dejó incubando durante 15 minutos más en la oscuridad. Finalmente, se adicionaron 100 µl de la solución de paro (H_2SO_4 2N) y se leyó la absorbancia a 450 y 570 nm en un lector de placas (Epoch, BioTek).

El análisis de resultados se realizó mediante regresión lineal utilizando el software de GraphPad Prism.

9.11.2. IL-6

Para la evaluación del efecto de los tratamientos sobre la producción de IL-6 se utilizó un kit de ELISA específico para IL-6 humana (Human IL-6 Standard ABTS ELISA Development Kit, PEPROTECH). Lo primero que se realizó fue reconstituir el estándar liofilizado en agua estéril, se vortexeó durante unos segundos para hacer alícuotas y almacenarlas a -20°C .

En una placa de 96 pozos, se dejó incubando el anticuerpo de captura toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se retiró el anticuerpo y se realizaron 4 lavados con 300 µl de PBS pH 7.2/Tween 0.05% eliminando la mayor cantidad de líquido mediante golpes firmes sobre una toalla absorbente. Se agregaron 100 µl de BSA 1 % en PBS pH 7.2 para bloquear la placa y se incubó durante 1 hora. Durante este tiempo se realizaron las diluciones correspondientes para la proteína estándar con el objetivo de tener una curva desde 24 a 1500 pg/mL. Se utilizó BSA 0.01% en PBS pH 7.2/Tween 0.05% como diluyente. Las muestras problema también fueron diluidas quedando en una dilución 1:1.

Transcurrido el tiempo, se retiró el BSA y se repitieron los 4 lavados con PBS/Tween; se colocaron las diluciones de la proteína estándar en orden descendente por duplicado y las muestras diluidas correspondientes a las 3 réplicas de los ensayos. Se dejaron incubando durante 2 horas, y se volvió a lavar 4 veces. Posteriormente se agregaron 100 µl del anticuerpo de detección (diluido 1:100) y se dejó incubando por 2 horas. Después se retiró el anticuerpo y se repitieron los lavados. Se agregaron 100 µl de la avidina-HRP (diluida 1:2000) y se dejó incubando durante 30 minutos. Transcurrido este período, se hicieron 5 lavados con una duración de 1 min cada uno. Se agregaron

100 μ l de ABTS y se dejó incubando durante 15 minutos más en la oscuridad. Finalmente, se leyó la absorbancia a 405 y 650 nm en un lector de placas (Epoch, BioTek).

10. Resultados

10.1. Determinación de la Citotoxicidad de los fármacos por el Ensayo de MTT

A pesar de que los fármacos de interés en este proyecto se encuentran aprobados para el tratamiento de ciertas enfermedades, no existen reportes sobre la toxicidad de IVM u OSV en la línea celular THP-1. Por esta razón, se realizó una evaluación de la citotoxicidad con el objetivo de establecer un rango de concentraciones seguras que permitiera continuar con los ensayos posteriores.

En particular, con el tratamiento con IVM, la viabilidad celular se mantuvo por encima del 90% hasta la concentración de 0.1 μM , sin observarse diferencia significativa en comparación con el control (Vehículo EtOH 0.01%) (Figura 13). A partir de 0.5 μM se presentó una diferencia significativa, no obstante, en esta concentración la viabilidad aún se mantiene en un 82%, lo cual, desde una perspectiva biológica, indica que el fármaco no presenta toxicidad a esa concentración (ISO 10993-5, 2009; Segeritz & Vallier, 2017). Cabe mencionar que para corroborar la sensibilidad de las células a otros compuestos, se utilizó como control positivo DMSO al 10%, mediante el cual la viabilidad celular disminuyó un 70%.

Con base en estos resultados, se realizó un análisis de regresión lineal mediante el software GraphPad Prism 8.0 para determinar la concentración citotóxica media (CC_{50}) (Figura 14) obteniéndose un valor de 1.9 $\mu\text{M} \pm 0.3$.

Los valores de CC_{50} reportados por otros grupos son variables, dado que el efecto de la IVM depende en gran medida del linaje celular empleado, tal cual lo exponen en su estudio Wald et al., 2022 (Wald et al., 2022). A pesar de que no existen reportes del efecto de ivermectina en las células THP-1, este fármaco se ha evaluado sobre diversas líneas, por ejemplo, en Calu 3 donde se obtuvo una CC_{50} de 3.1 μM (Jitobaom et al., 2022) y en Vero-E6, con un valor de 10 μM (Mastrangelo et al., 2012), por mencionar algunas.

En el caso del OSV, la viabilidad celular se mantuvo por encima del 90% en un rango de concentraciones de 0.1 hasta 1 μM . (Figura 15). Sin embargo, a partir de 5 μM se observó una disminución de la viabilidad hasta el 76%. A diferencia de la IVM, en el caso de OSV no se observó una disminución por debajo del 50% en la máxima concentración evaluada (50 μM). Por ello, no fue posible calcular un valor de CC_{50} para este fármaco, lo que requeriría el ensayo probando concentraciones superiores. Sin embargo, dado que el propósito de esta prueba fue

determinar un rango de concentraciones seguras para estudios posteriores, y no caracterizar la toxicidad del OSV, no se evaluaron concentraciones más elevadas.

En la literatura se encuentran estudios de toxicidad del OSV sobre células como MDCK, en estos se reporta una CC_{50} por encima de 500 μM (Kutkat et al., 2022), sin embargo, este tipo de estudios no se encuentran reportados para las THP-1.

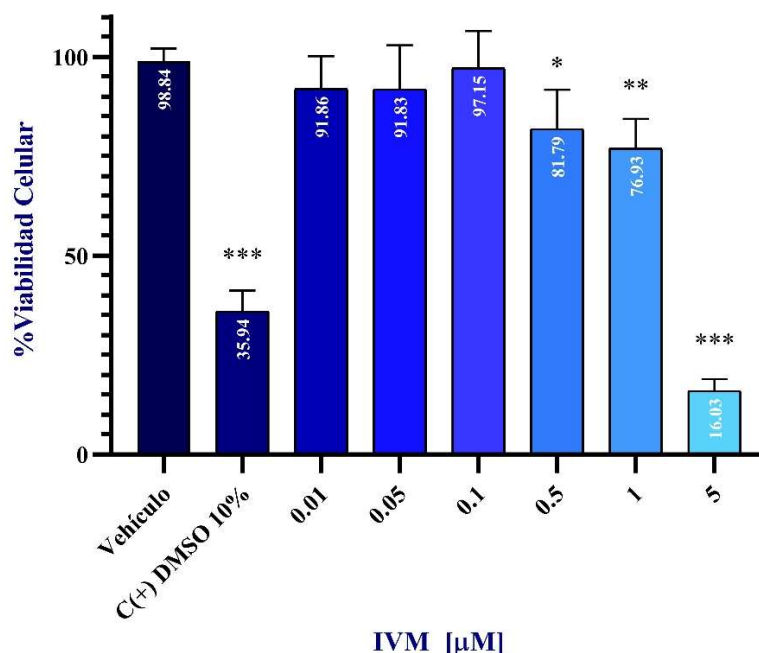


Figura 11. Efecto de la Ivermectina sobre THP-1. Los resultados se muestran como promedio $\pm$ DE, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0001$. La diferencia estadística se muestra con respecto a las células no tratadas.

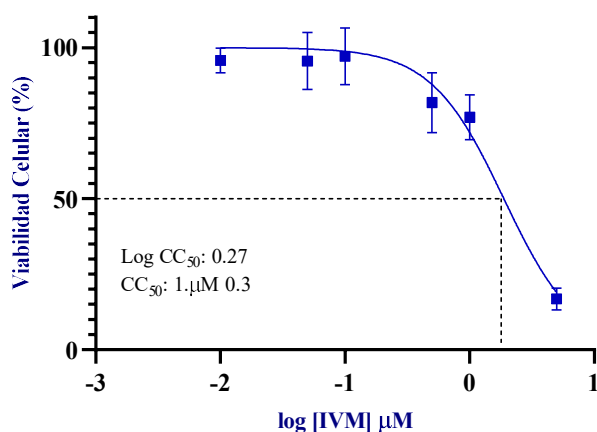


Figura 12. CC_{50} de la IVM sobre THP-1.

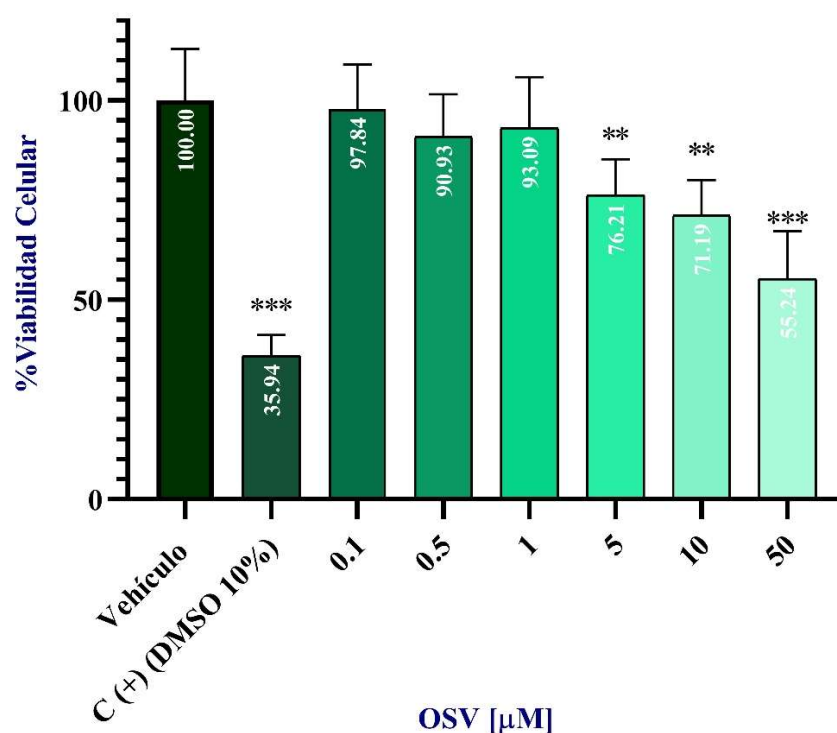


Figura 13. Efecto del Oseltamivir sobre las THP-1. Los resultados se muestran como promedio $\pm$ DE, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0001$. La diferencia estadística se muestra con respecto a las células no tratadas.

Una vez determinadas las concentraciones seguras para la evaluación de los fármacos, era necesario determinar si su combinación podía incrementar la toxicidad, dado que en ensayos posteriores serían evaluados de manera conjunta. No obstante, para definir las concentraciones a emplear en dicha combinación, era necesario conocer la concentración a partir de la cual el OSV ejerce su actividad inhibitoria sobre la Neu, con la finalidad de establecer un rango de concentraciones para la evaluación combinada de los fármacos. Los resultados correspondientes a este ensayo se presentan a continuación.

10.2. Evaluación del efecto del Oseltamivir sobre la actividad de Neuraminidasa

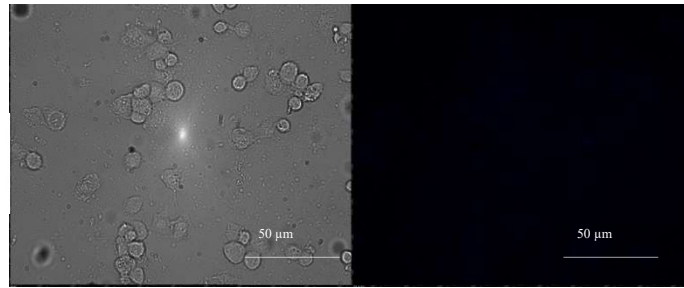
Para determinar la actividad de neuraminidasas, se empleó la técnica descrita por Abdulkhalek et al., 2011. En este ensayo las células se colocaron en contacto con el sustrato para Neu: 4-MUNANA, el cual, al ser hidrolizado por la Neu en la superficie celular, libera el fluoróforo (4-Methylumbelliferyl), generando la fluorescencia en el medio extracelular. De esta manera, una mayor actividad enzimática se traduce en una mayor intensidad de coloración azul en el medio extracelular. El ensayo se realizó en diferentes tiempos; no obstante, se presentan las imágenes correspondientes al pico máximo de actividad, observado a los 5 minutos.

En la Figura 16, panel A, correspondiente a células sin tratamiento y sin estimulación con LPS, no se observó actividad de Neu, evidenciado por la ausencia de coloración azul en el medio. En el panel B, que muestra células estimuladas con LPS, se apreció un cambio de coloración en el medio extracelular. Además, en las células estimuladas con LPS y tratadas con el inhibidor químico de Neu: DANA (Panel C), la reacción desapareció y no se observó coloración azul en el medio. Lo anterior coincide con lo reportado por Cruz (2017) (Cruz, 2017), si bien en dicho estudio el pico máximo de actividad se registró a los 3 minutos; el efecto inhibitorio también se observó al utilizar OSV a una concentración de 1 μ M (Panel D).

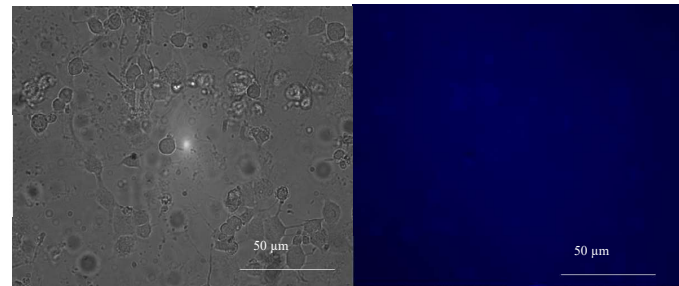
Con el fin de obtener valores cuantitativos que permitieran analizar con mayor precisión los cambios en la intensidad de fluorescencia asociados a la actividad de Neu, se analizaron las imágenes mediante el software de ImageJ. Con base en este análisis, la Figura 17 presenta los valores de intensidad media de fluorescencia (IMF) en función de los tratamientos aplicados. Se observó una fluorescencia significativamente mayor en las células estimuladas con LPS sin tratamiento adicional, en comparación con los controles tratados con DANA y con OSV a 1 μ M. Asimismo, se evaluó si una concentración más elevada del fármaco, que no redujera la viabilidad por debajo del 80%, resultaba más efectiva en la inhibición enzimática. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos con 1 y 2.5 μ M de OSV.

Campo claro

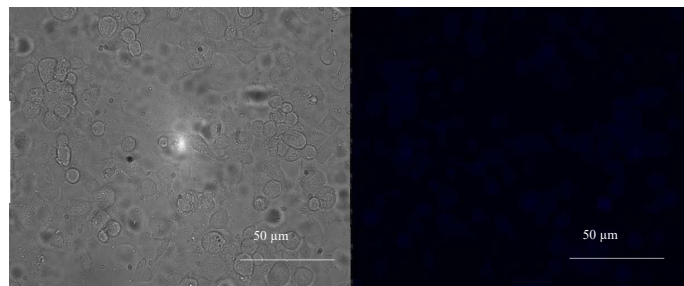
A) Control



B) LPS



C) DANA + LPS



D) OSV 1 μM + LPS

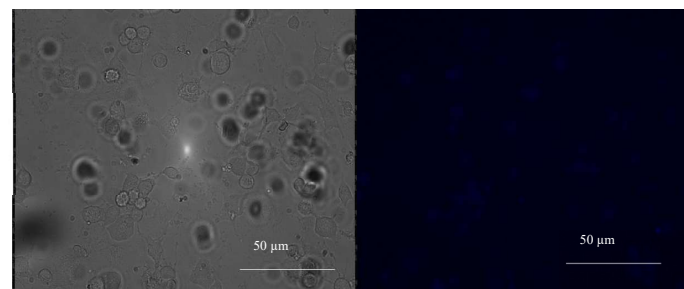


Figura 14. Efecto del Oseltamivir sobre la actividad de las neuraminidasas. A) Células sin estimulación con LPS. B) Células estimuladas con LPS sin tratamiento. C) Células estimuladas con LPS y con el inhibidor DANA. D) Células estimuladas con LPS y con OSV 1 μM.

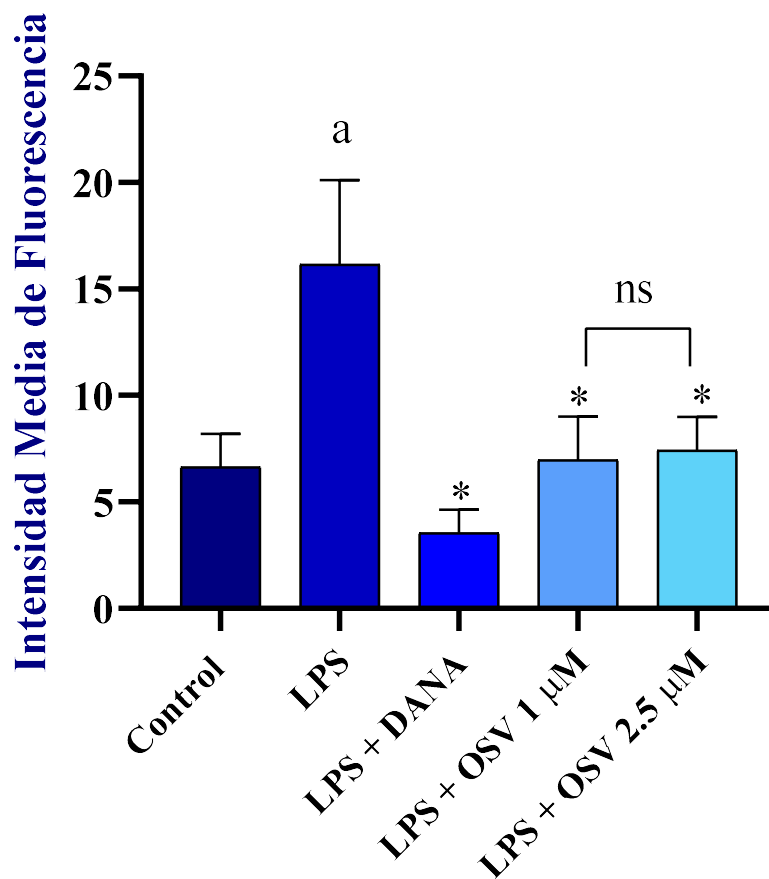


Figura 15. Análisis cuantitativo para el ensayo sobre la actividad de la NEU. Los resultados se muestran como promedio $\pm$ SD, $p < 0.05$. La diferencia estadística se muestra con respecto al LPS (*) y con el control (a).

Una vez determinada la concentración a la cual el OSV ejercía un efecto sobre la Neu, fue posible evaluar el efecto tóxico en combinación con IVM. Se evaluaron concentraciones de IVM desde 0.01 hasta 0.5 μ M de IVM con 1 μ M de OSV. Se observó que la viabilidad celular se mantuvo por encima del 80% hasta 0.05 de IVM en conjunto con 1 μ M de OSV (Figura 18).

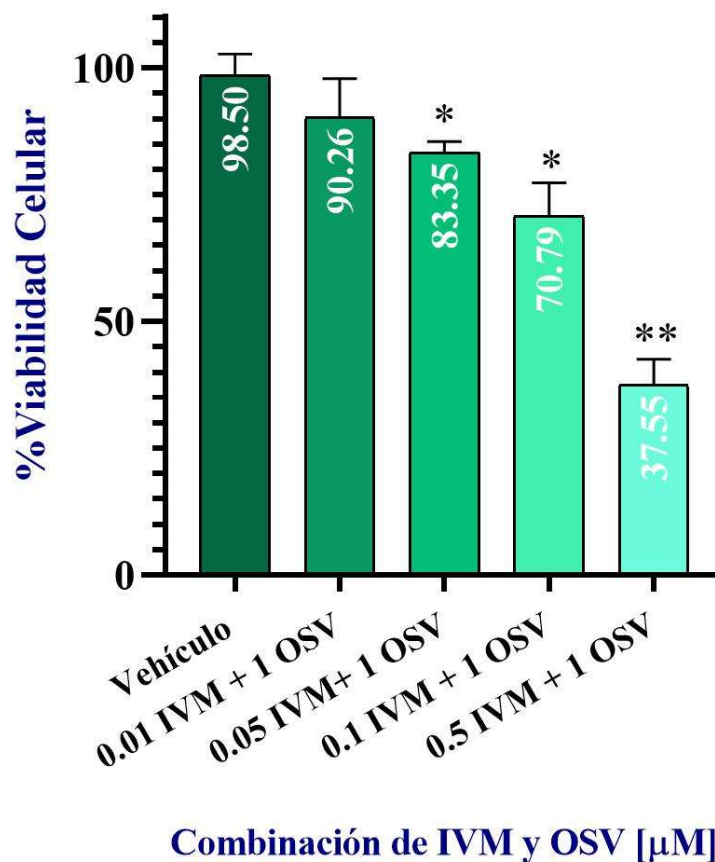


Figura 16. Efecto de la combinación de Ivermectina y Oseltamivir sobre las THP-1. Los resultados se muestran como promedio $\pm$ SD, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0001$. La diferencia estadística se muestra con respecto a las células no tratadas

10.3. Expansión del Dengue 2 y Titulación del Stock Viral

Una vez obtenido el stock viral de los cerebros de ratón infectados; se requería conocer su capacidad infectiva para poder realizar los ensayos posteriores. Por ello, se realizó el ensayo de formación de placas en monocapas confluentes en células BHK-21 (descrito en el apartado de Metodología) y como se observa en la Figura 19, el stock viral DENV-2 NG indujo la lisis al infectar las células. Mediante el cálculo antes descrito se determinó que el título viral fue de 1.5×10^7 UFP/mL.

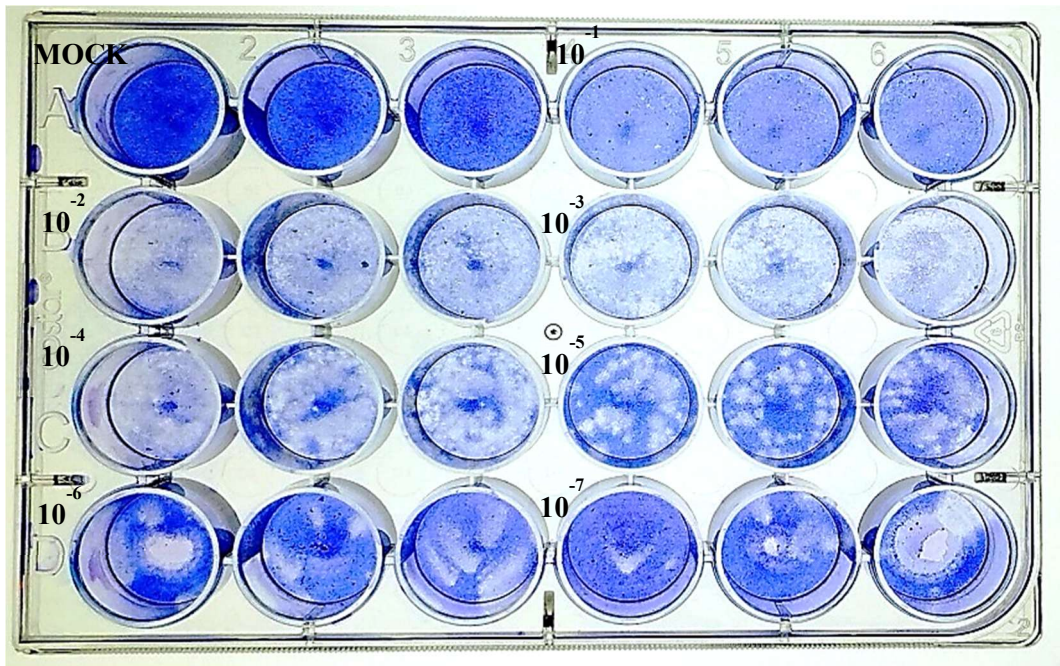


Figura 17. Formación de placas en células BHK-21 por efecto citopático causado por DENV-2 NG C.

10.4. Detección de la infección por DENV-2 en macrófagos.

Los ensayos de infección en células diferenciadas se realizaron a 12, 24 y 48 h. Para la detección del virus se emplearon dos técnicas experimentales: microscopía de fluorescencia y RT-PCR anidada. En la primera de ellas, se utilizó un anticuerpo primario dirigido contra proteínas virales, seguido de un anticuerpo secundario que estaba acoplado a ficoeritrina (PE). Como se observa en la Figura 20, las células que están infectadas mostraron una fluorescencia en la región espectral roja, mientras que en las células no infectadas (MOCK) no presentaron señal positiva en dicho espectro. El análisis de las imágenes mostró que, a las 48 hpi, el 58% de las células presentaban evidencia por la infección del virus. (Figura 21).

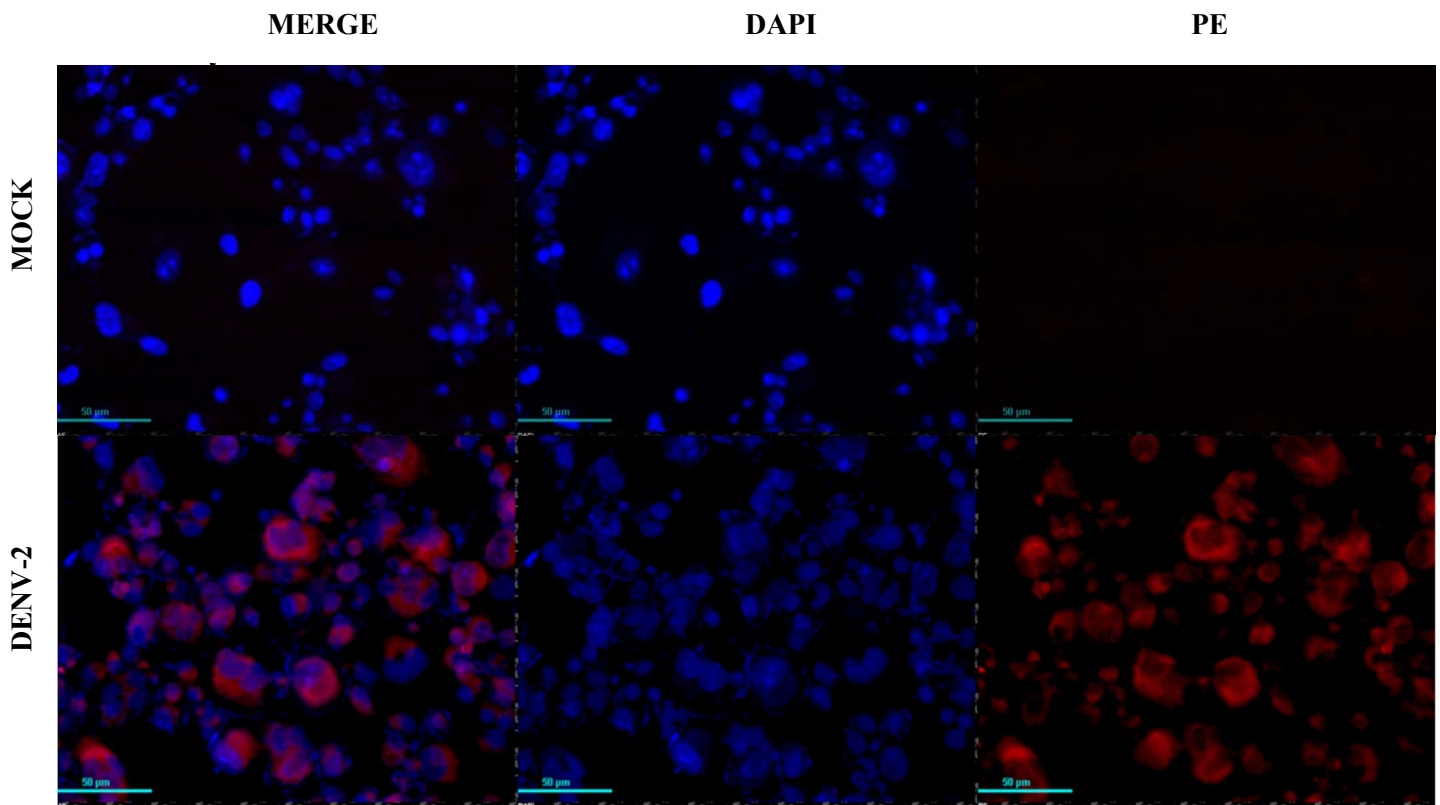


Figura 18. Detección de la infección por Dengue mediante Microscopía de Fluorescencia. MOCK (células sin infectar) y DENV-2 (células infectadas); los núcleos se tiñeron con DAPI (color azul), anti-DENV con PE en rojo y Merge sobreposición. La coloración roja indica la presencia de proteínas del virus.

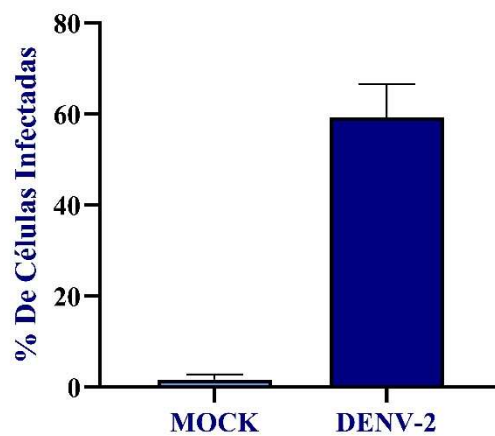


Figura 19. Porcentaje de células infectadas respecto al conteo total. Se hizo un conteo total de células (n=200) en cada campo para cada condición; además se contaron las células de coloración roja y se obtuvo el porcentaje de células fluorescentes tanto en el MOCK (células sin infectar) como en los macrófagos infectados con el virus.

Por otra parte, en el ensayo de RT-PCR, los oligonucleótidos D1 y D2 utilizados en la primera amplificación, permitieron que se amplifica la secuencia correspondiente al gen de la proteína NS1. En la segunda ronda, se amplificó un fragmento de menor tamaño perteneciente al mismo gen, con una longitud aproximada de 119 pb de (Lanciotti et al., 1992). Tal como se observa en la Figura 22, en los macrófagos infectados con el DENV-2 se detectó una banda del tamaño esperado en los tiempos evaluados, comprendidos entre las 12 y las 48 hpi.

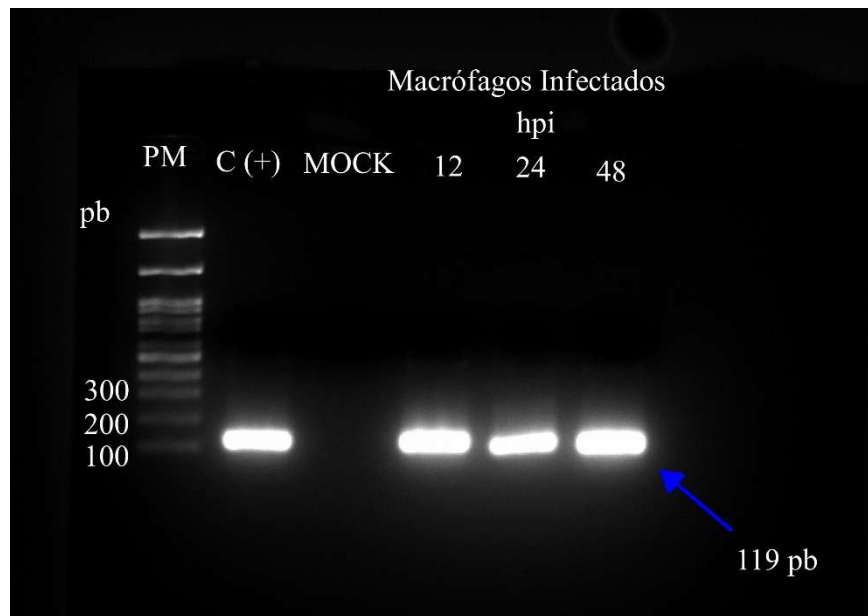


Figura 20. Detección de la infección por RT-PCR. Imagen representativa de la electroforesis de los productos del PCR anidado para detectar infección por DENV-2. El producto final es de 119 pb.

Una vez confirmada la infección en los macrófagos, se evaluó el efecto de IVM y OSV sobre la replicación del virus y la producción de citocinas. Inicialmente, se contempló el uso de la RT-PCR punto final, dado que las condiciones experimentales ya habían sido estandarizadas. Sin embargo, los resultados mediante esta técnica no fueron concluyentes, debido a la alta variabilidad obtenida en el análisis densitométrico de las bandas entre réplicas, así como a la ausencia de cambios evidentes al comparar los grupos tratados contra el vehículo (Anexo 1). De la misma manera, en el caso del ensayo destinado a evaluar la expresión de TNF- α e IL-6, la RT-PCR punto final tampoco arrojó resultados concluyentes; pese a contar con las condiciones estandarizadas, la variación en cada réplica fue considerablemente alta, y además se presentaron problemas técnicos durante la electroforesis (Anexo 2).

Por estas razones, se optó por evaluar el efecto de los tratamientos mediante qPCR. Los resultados obtenidos con esta técnica se presentan a continuación.

10.5. Evaluación del Tratamiento con Ivermectina y Oseltamivir sobre la Replicación de DENV-2

Los fármacos de interés fueron evaluados tanto de forma individual en como en combinación. A las 12 hpi, se observó una disminución de la carga viral, la cual pasó de aproximadamente de 50,000 copias (Vehículo) a 2,000 copias virales en los grupos tratados con concentraciones individuales de 0.05 y 0.5 μM de IVM. Esta reducción resultó estadísticamente significativa (Figura 23). Cabe señalar que, en el caso particular de la IVM, se evaluó una concentración superior (0.5 μM) a las empleadas en el ensayo de combinación con OSV, las cuales se habían establecido con base en pruebas previas de citotoxicidad. En dicho ensayo de combinación, se estableció el uso de 0.05 μM de IVM con 1 μM de OSV; no obstante, se buscó examinar el efecto inhibitorio de la IVM a la concentración más alta que no fuera tóxica. Previamente determinada en el ensayo de MTT en células THP-1. A pesar de ello, la concentración de 0.5 μM de IVM no mostró una reducción mayor en el número de copias virales en comparación con la concentración de 0.05 μM . Si bien estos efectos fueron evidentes a las 12 hpi, en el ensayo realizado a las 24 hpi no se encontró una disminución significativa de la carga viral con ninguna de las concentraciones de IVM evaluadas (Figura 24). Tanto a las 12 hpi como a las 24 hpi, el tratamiento con OSV de forma individual o combinado con IVM, no modificó el número de copias virales en relación con las células no tratadas.

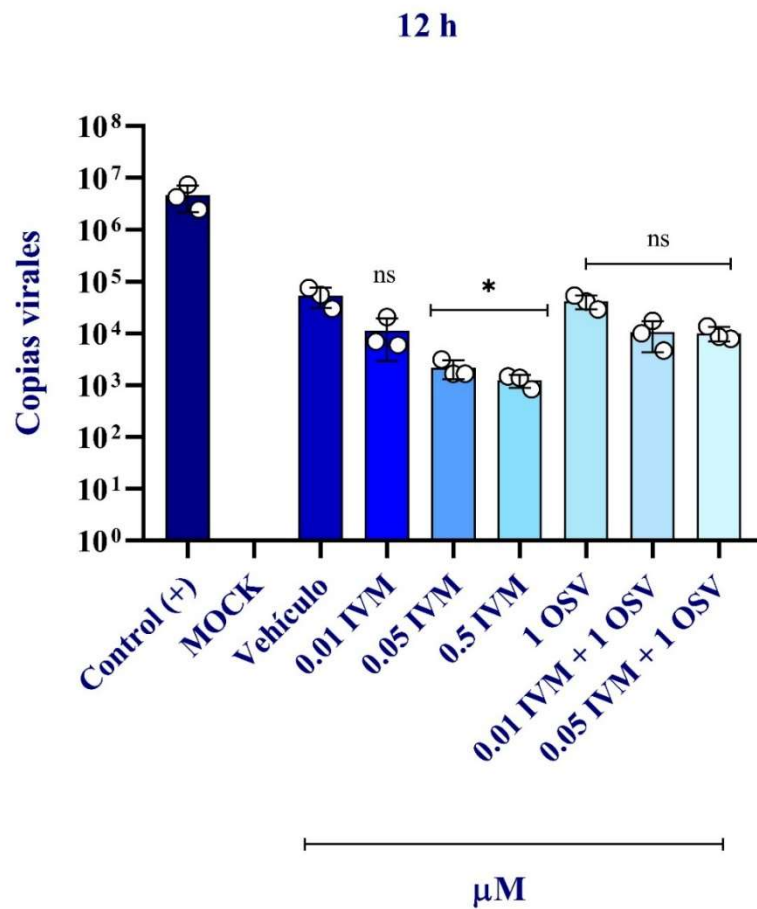


Figura 21. Efecto de los tratamientos de IVM y OSV de manera individual y en combinación a las 12 hpi. La diferencia estadística (*) se muestra con respecto al vehículo (células no tratadas) $p < 0.05$. Los resultados muestran el promedio de 3 ensayos independientes $\pm$ DE. ANOVA de una vía con pos-hoc de Tukey para comparaciones múltiples.

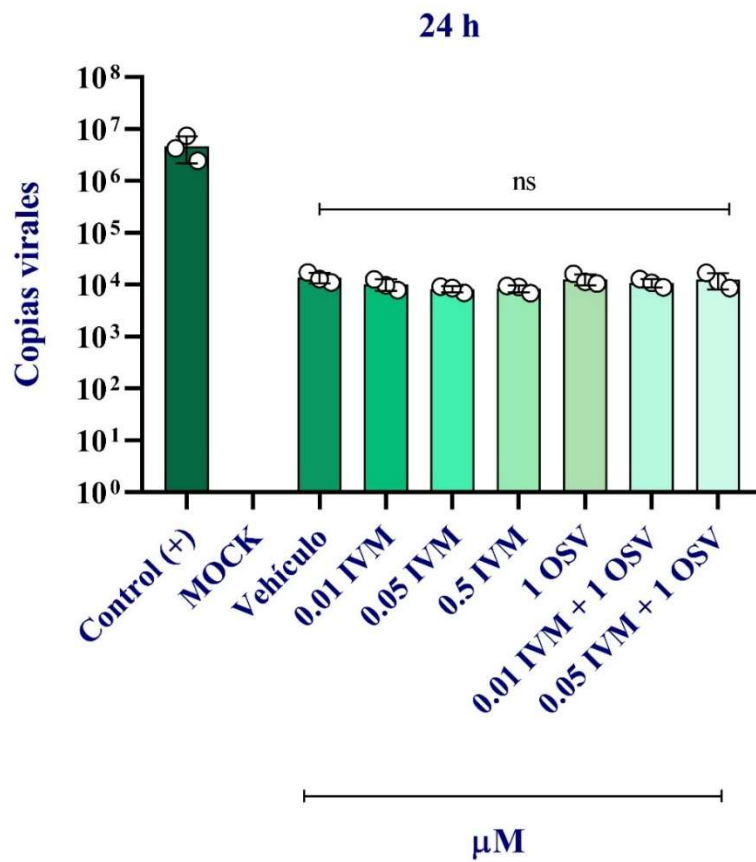


Figura 22. Efecto de los tratamientos de IVM y OSV de manera individual y en combinación a las 24 hpi. Los resultados muestran el promedio de 3 ensayos independientes.

10.6. Evaluación del Tratamiento con Ivermectina y Oseltamivir sobre la Expresión de TNF- α e IL-6.

La expresión de IL-6 y de TNF- α se analizó por qPCR realizando un análisis de expresión relativa y utilizando como referencia la expresión del gen constitutivo GAPDH. En el caso particular de TNF- α , a las 12 hpi se observó que tanto el control de inflamación (LPS) como las células infectadas sin tratamiento (Vehículo) presentaron un aumento en la expresión del gen de esta citocina. Por el contrario, el tratamiento con un fármaco antiinflamatorio (Indometacina) mostró una disminución en la expresión génica. Con el fin de verificar las concentraciones óptimas de este fármaco para poder utilizarlo como control, se incluyeron en el gráfico dos concentraciones (15 y 30 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 25). No obstante, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas concentraciones. En todos los tratamientos evaluados, tanto individuales como combinados, se mostró una disminución en la expresión de TNF- α . Adicionalmente, se observó que dicha disminución fue más pronunciada cuando los fármacos fueron administrados de forma individual, mientras que fue menor en los tratamientos combinados; sin embargo, en estos últimos la diferencia estadística se mantuvo con respecto al control.

Este comportamiento, tanto para los tratamientos individuales como para los combinados, también se observó a las 24 hpi. No obstante, en el caso del tratamiento con indometacina a 15 $\mu\text{g/mL}$ y en la combinación de los fármacos, la disminución no fue estadísticamente significativa.

Cabe destacar que la reducción en la producción de TNF- α fue notoria en todos los grupos evaluados a las 24 hpi en comparación con lo observado a las 12 hpi, lo cual era de esperarse dado que la secreción de esta citocina ocurre en las primeras horas del proceso inflamatorio. Aunque a las 24 hpi se detectó un aumento tanto en el grupo tratado con LPS como en el vehículo, dicho incremento fue considerablemente menor que el observado a las 12 hpi.

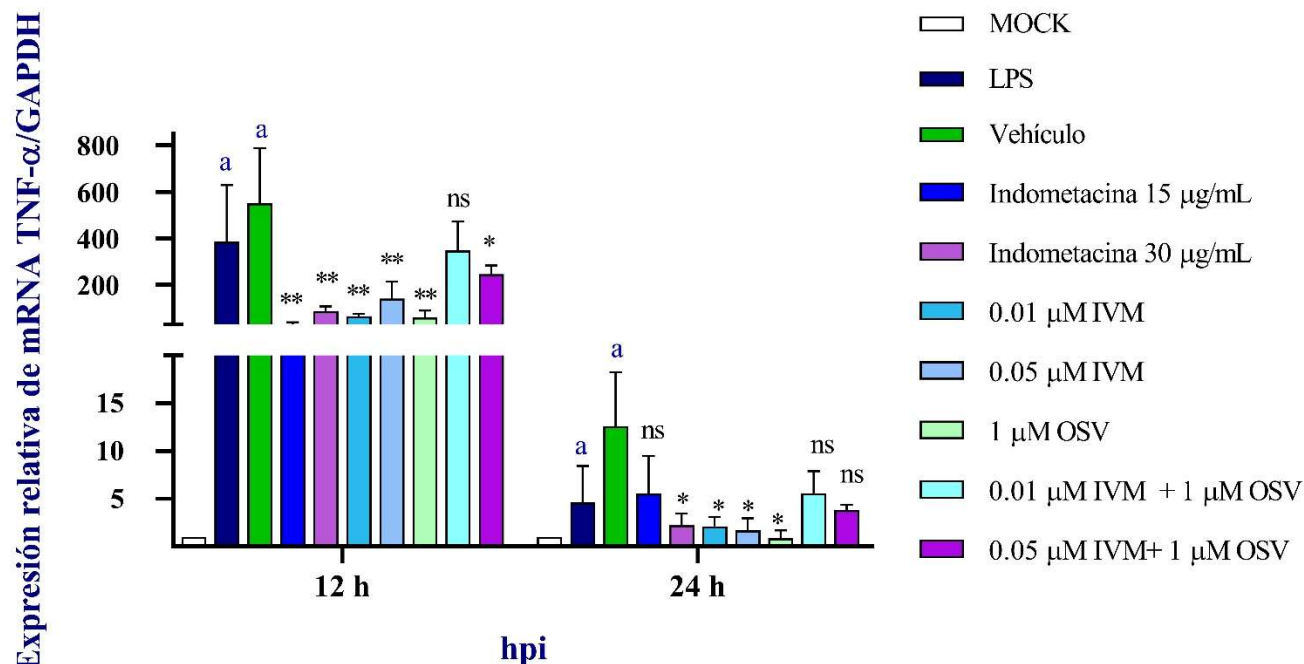


Figura 23. Efecto de los tratamientos individuales y en combinación de Ivermectina y Oseltamivir a las 12 y 24 hpi. Las diferencias estadísticas se muestran con respecto al MOCK (a) y al Vehículo (*, ns). * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

En el caso de IL-6 se observó un patrón diferente. La expresión de esta citocina es mucho mayor a las 24 hpi. En este caso, el estímulo con LPS tuvo la misma intensidad de respuesta que la infección con el virus. Se observó una disminución con los tratamientos de forma individual, sin embargo, esto no fue estadísticamente significativo. A las 24 hpi, ninguno de los tratamientos, individuales o combinados mostraron una disminución significativa (Figura 26).

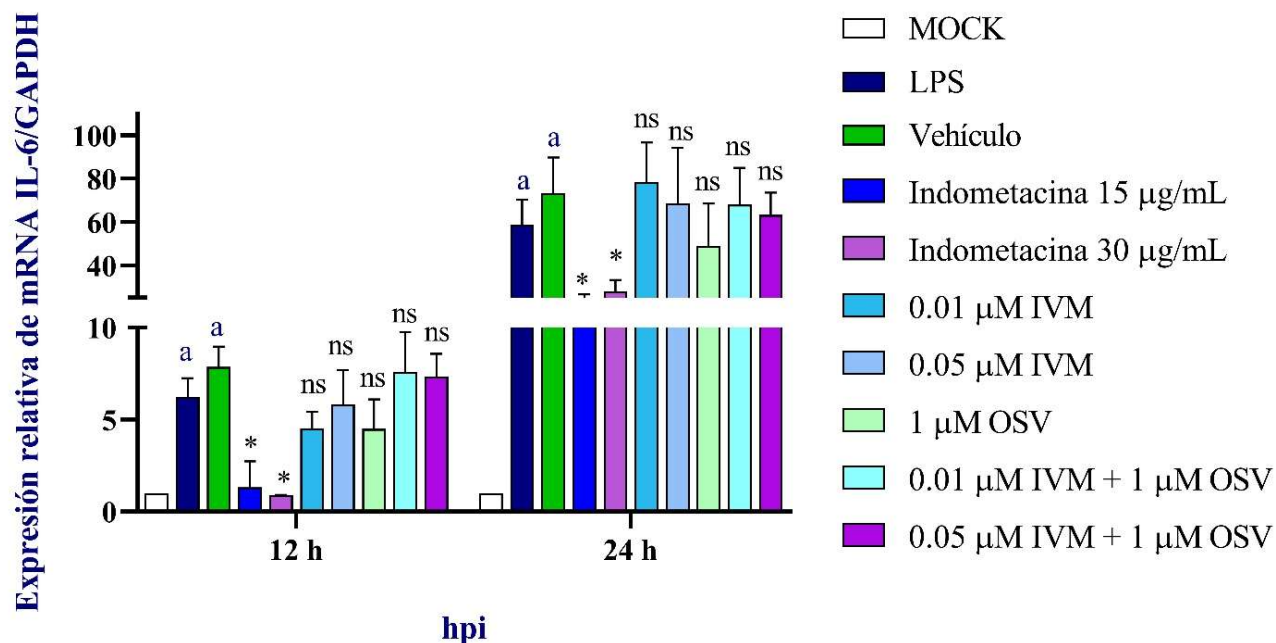


Figura 24. Efecto de los tratamientos individuales y en combinación de Ivermectina y Oseltamivir a las 12 y 24 hpi. Las diferencias estadísticas se muestran con respecto al MOCK (a) y al Vehículo (*, ns). * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

10.7. Evaluación del Tratamiento con Ivermectina y Oseltamivir sobre la secreción de TNF- α e IL-6.

Por otra parte, se cuantificó la secreción de TNF- α e IL-6 por la técnica de ELISA. En el caso de TNF- α , como era de esperarse, se observó un aumento en la secreción con el estímulo de LPS comparado con las células sin estimular tanto a las 12 como a las 24 hpi (Figura 27), lo cual fue un indicativo de que el sistema funcionaba de manera adecuada. Sin embargo, al igual que con el ensayo de expresión de ARNm, este aumento es menos notorio a las 24 hpi. Cabe mencionar que en la literatura se reportan valores variables de TNF- α secretado por las células THP-1 ante el estímulo con LPS; que van desde 0.5 (Floris et al., 2020) hasta 10 ng/mL (Vargas-Hernández et al., 2020), estas variaciones dependen en gran parte de las condiciones de diferenciación y de crecimiento de las células THP-1 (T. Liu et al., 2023). De igual forma, las células infectadas con DENV secretaron más TNF- α en comparación con las células sin infectar (MOCK) tanto a las 12 como a las 24 hpi. Al igual que en el ensayo de expresión, la secreción de TNF- α fue mayor a las 12 hpi. Particularmente, en este tiempo se observó que con cada uno de los tratamientos evaluados

hubo una disminución en la secreción de TNF- α , lo cual siguió un patrón similar al ensayo de expresión. Sin embargo, a las 24 hpi el efecto inhibitorio no se sostuvo.

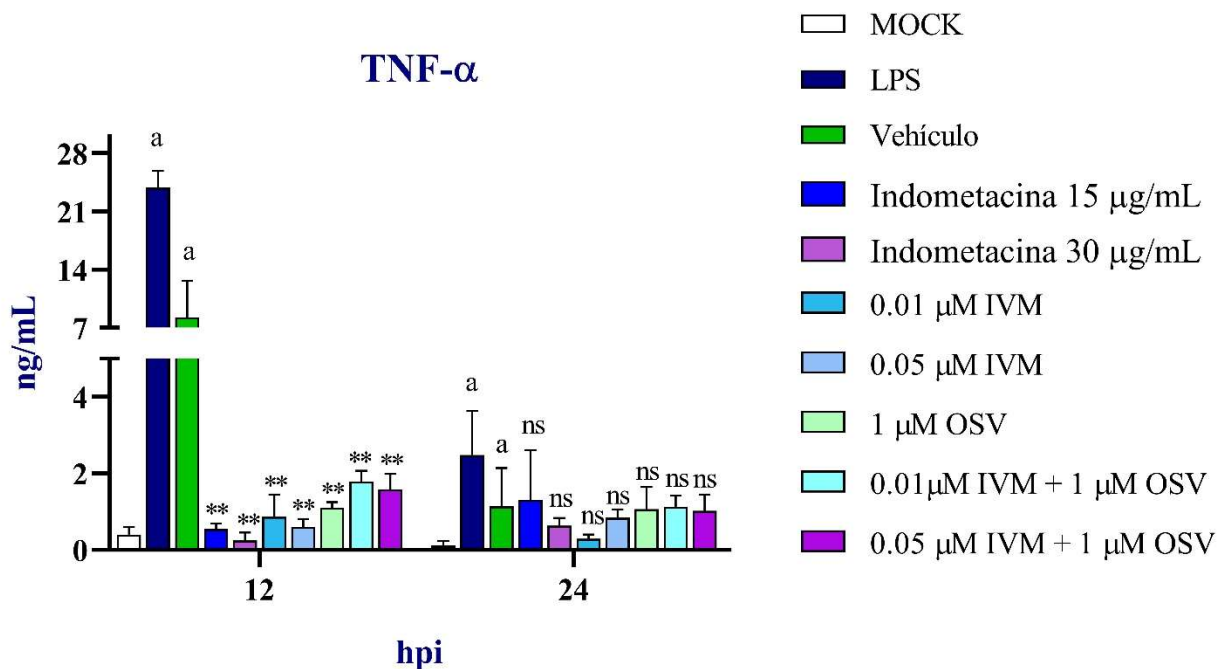


Figura 25. Efecto de los tratamientos individuales y en combinación de Ivermectina y Oseltamivir a las 12 y 24 hpi sobre la secreción de TNF- α . Las diferencias estadísticas se muestran con respecto al MOCK (a) y al Vehículo (**p < 0.005).

De la misma manera que con TNF- α , en el caso de IL-6 se observó un aumento en la secreción de esta citocina ante el estímulo de LPS y en las células infectadas con el virus tanto a las 12 como a las 24 hpi en comparación con las células que no fueron estimuladas ni infectadas (Figura 28). Sin embargo, no se observó diferencia en la cantidad secretada de la citocina a los tiempos evaluados. A pesar de esto, con cada uno de los tratamientos evaluados se encontró una disminución significativa o incluso la inhibición completa de la secreción, tanto a las 12 como 24 hpi.

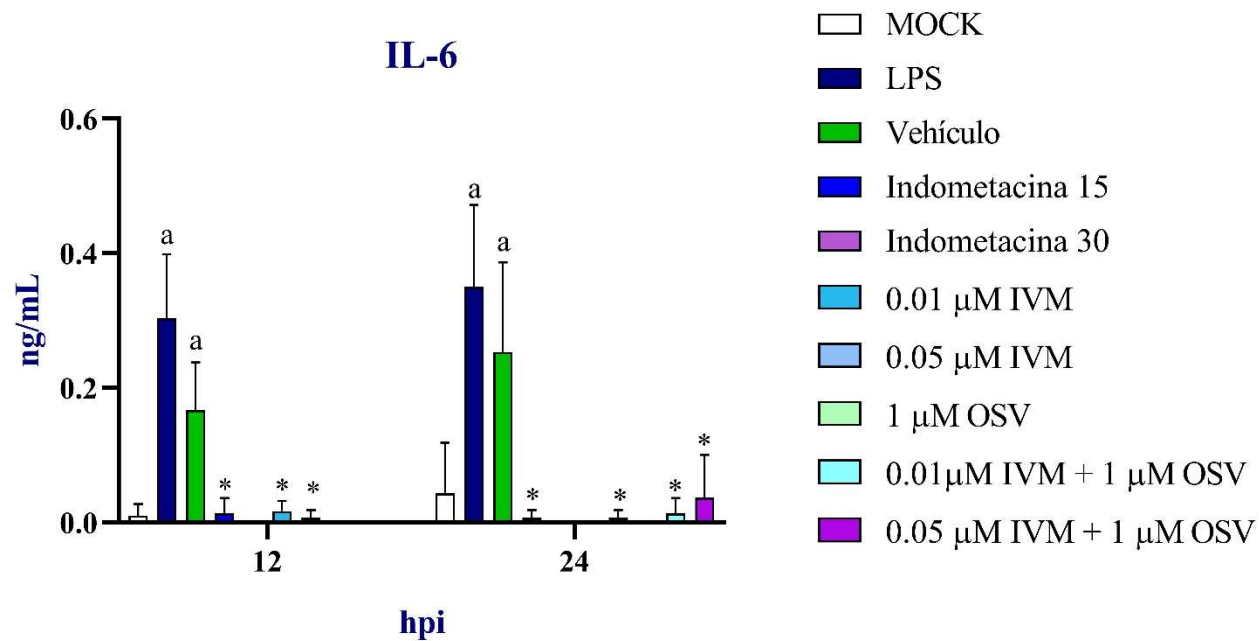


Figura 26. Efecto de los tratamientos individuales y en combinación de Ivermectina y Oseltamivir a las 12 y 24 hpi sobre la secreción de IL-6. Las diferencias estadísticas se muestran con respecto al MOCK (a) y al Vehículo (* $p < 0.05$).

11. Discusión

El Dengue es una de las enfermedades arbovirales de mayor relevancia a nivel global considerándose desde hace décadas un problema de salud pública. De acuerdo con un estudio realizado en 2025, se estima que alrededor de 6 millones de personas en el mundo residen en zonas de riesgo para contraer dengue y otras enfermedades por Flavivirus (Lim et al., 2025). Si bien la mayoría de las infecciones por DENV son asintomáticas, una proporción de pacientes llega a desarrollar complicaciones graves que conducen a la muerte. La tasa de letalidad para la enfermedad varía de país a país entre 0.05 hasta 1.1.% con un manejo clínico adecuado (OMS, 2024), sin embargo, el incremento reciente de casos representa una inversión monetaria considerable para la atención y prevención, y la pérdida de la productividad (Tayal et al., 2023).

Las estrategias preventivas actuales para la enfermedad incluyen el control vectorial, campañas de concientización y la vacunación (Procopio et al., 2024). No obstante, las vacunas disponibles que se encuentran aprobadas por la FDA y recomendadas por la OMS (Dengvaxia y Qdenga) presentan limitaciones considerables como efectividad variable según el serotipo, acceso limitado a la población y, en el caso de Dengvaxia, su uso es seguro solo en personas que han contraído la infección (Anumanthan et al., 2025).

A pesar de que existe la necesidad de un tratamiento antiviral eficaz, su desarrollo ha sido complejo debido a la patogénesis multifactorial de la enfermedad, pues a pesar de que se conoce que en esta intervienen factores virales, inmunes y del mismo huésped; hoy en día siguen existiendo incógnitas con respecto al porqué la infección puede progresar a fases graves (Obi et al., 2021; Rakotoarimanana et al., 2026). De igual forma, a pesar de que se han propuesto candidatos antivirales contra el DENV, muy pocos han escalado a ensayos clínicos debido a problemas de eficacia, toxicidad y estabilidad (Kim et al., 2024). En este contexto, el reposicionamiento de fármacos se ha empleado como una alternativa más rápida y económica (Tuci et al., 2025). En este estudio se evaluó la combinación de IVM, un antiparasitario con propiedades anti-Flavovirales (Mastrangelo et al., 2012) y OSV, un antiviral utilizado en el tratamiento de la influenza para el que se ha propuesto una actividad moduladora en la secreción de citocinas inflamatorias (Abdulkhalek & Szewczuk, 2013; Amith et al., 2010; Baghaie et al., 2026; Y. Chen et al., 2025) con el objetivo de inhibir la replicación viral y modular la respuesta inflamatoria.

Los resultados indicaron que la combinación de ambos fármacos no fue superior al tratamiento con IVM. En los ensayos de qPCR para evaluar la replicación viral, la combinación no redujo la carga viral con ninguna de las concentraciones probadas (Figuras 23 y 24), mientras que la IVM retrasó eficazmente la replicación. Este hallazgo contrasta lo de un estudio previo dónde se reportó una mayor eficacia de la IVM combinada con atorvastatina en un modelo murino con infección cerebral por DENV (Palacios-Rápalo et al., 2023b) . Cabe mencionar que su interés fue analizar el efecto combinado con un inhibidor de la síntesis de colesterol, ya que se ha descrito el papel que puede tener tanto el transporte de NS3 al núcleo celular (Segatori et al., 2021) como en la entrada mediada por receptores de anticuerpo (Puerta-Guardo et al., 2010).

Por otra parte, la IVM de forma individual redujo en un 96% las copias virales a las 12 hpi a concentraciones de 0.05 y 0.5 μM (Figura 23). Sin embargo, a las 24 hpi la reducción fue solo del 14 % (Figura 24). En otros estudios realizados en células VERO, se ha descrito una inhibición del 50 % a las 24 hpi con una concentración de 0.5 μM de IVM (Yang et al., 2020b). Otros estudios también han demostrado que la IVM disminuye la replicación del DENV, sin embargo, lo hicieron por técnicas diferentes a qPCR (Denolly et al., 2023; Madhry et al., 2023).

A pesar de encontrar este contraste con lo reportado en la literatura, es importante considerar las condiciones de los ensayos que se realizaron en este estudio. En primer lugar, el modelo *in vitro* utilizado de THP-1, ya que, si bien es un modelo que permite la replicación del virus, al momento del reconocimiento de antígenos virales, se activan cascadas de señalización que dan como resultado la producción de moléculas como interferones que van a contener la infección (Felipe Valdés-López et al., 2025). Esto puede explicar por qué a las 24 hpi se observa incluso una disminución en el número de copias virales de las células infectadas con respecto a las 12 hpi (Figura 23,24).

Otro de los puntos a considerar es el tiempo de adición del fármaco, así como la concentración utilizada. En algunos estudios se observa un efecto antiviral cuando las células son pretratadas con IVM entre 3 y 4 h antes de iniciar la infección (Fraser et al., 2014; Wagstaff et al., 2012). En este sentido Mastrangelo et al., 2012 (Mastrangelo et al., 2012) reportan que el tiempo de adición de la IVM es importante para poder observar un efecto antiviral contra flavivirus, destacando que debe añadirse dentro de las primeras horas tras la infección. Además, particularmente en nuestro estudio se utilizó una baja concentración de IVM en comparación con

otros reportes. Esto se debe a que en las THP-1 la IVM redujo la viabilidad celular a concentraciones mayores de 0.5 μ M (Figura 13). En otras investigaciones donde se evalúa el potencial antiviral de este fármaco sobre flavivirus, se utilizan concentraciones en un rango de 1 a 25 μ M (Cotrone et al., 2025; Mastrangelo et al., 2012; Tay et al., 2013; Wagstaff et al., 2012) o bien, incluso en algunos no mencionan la concentración exacta (Palacios-Rápalo et al., 2023b). Cabe señalar que ninguno de estos reportes se realizó sobre THP-1. En este sentido, (Wald et al., 2022) mencionan que el efecto tóxico de la IVM depende en gran medida del linaje celular empleado.

Aunque se ha reportado que la IVM tiene potencial antiviral sobre el DENV, su mecanismo de acción aún no se ha descrito por completo. Dos de las dianas terapéuticas que se han propuesto son la proteína NS5 y NS3 del virus (J. Liu et al., 2025; Rakotoarimanana et al., 2026). Estas proteínas son las más conservadas entre los 4 serotipos y juegan un rol importante en la replicación viral al actuar como ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp)/metiltransferasa y como helicasa, respectivamente (Ulgheri et al., 2025). Tanto NS3 como NS5 desempeñan su papel enzimático en el complejo de replicación que se sitúa en los compartimientos membranosos del RE; sin embargo, ambas pueden ser traslocadas al núcleo durante el ciclo de replicación (Palacios-Rápalo et al., 2021, 2023b). Ambas proteínas poseen señales de localización nuclear (NLS) que le permiten ser transportada al núcleo a través de los poros nucleares (NPC's) por moléculas especializadas denominadas importinas, siendo la vía de la importina $\alpha/\beta 1$ la que participa en el proceso (Cheng et al., 2024; Palacios-Rápalo et al., 2021). En este contexto, múltiples autores han descrito que la IVM inhibe esta vía (King et al., 2020; Wagstaff et al., 2012; S. Yang et al., 2020); Específicamente en el caso de DENV, se traduce a que la alteración en el transporte nuclear de NS3 y NS5 afecta la replicación del virus. Además, se ha mostrado que la IVM disminuye la actividad enzimática de NS3 para actuar como helicasa (Mastrangelo et al., 2012). No obstante, la importancia de la presencia nuclear de estas proteínas todavía se encuentra en debate. Esto se debe a que particularmente, se ha encontrado que pueden existir mutaciones en las NLS_{C terminal} de NS5 y como consecuencia su relocalización nuclear se ve afectada, haciendo que la proteína tenga mayor presencia en el citoplasma. De igual manera, pese a que la NS5 se encuentra altamente conservada entre los serotipos del DENV, se tiene evidencia de que esta proteína tiene mayor presencia nuclear en DENV-2 y 3, mientras que en DENV-1 y 4 predominantemente es citoplasmática (Cheng et al., 2024; Hannemann et al., 2013).

Así mismo, en los estudios realizados por (Cheng et al., 2024; Kumar et al., 2013) donde se evaluaron virus con mutaciones en las NLS de NS5, el ciclo replicativo del DENV no se vio afectado si la NS5 se encontraba o no en el núcleo. Se tiene evidencia de que la IVM sí inhibe la replicación viral de los cuatro serotipos e incluso aquellos virus con mutantes en la NLS de NS5 (Cheng et al., 2021; Tay et al., 2013). Esto abre la brecha a que posiblemente el efecto antiviral sobre el DENV de la IVM no sea exclusivamente por la inhibición del transporte nuclear. De igual manera, otro hallazgo interesante de las mutaciones de NLS de NS5, es que aumenta la secreción de IL-6, TNF- α e IL-8 en algunas líneas celulares infectadas con el virus (Cheng et al., 2021).

En este contexto, se ha propuesto que la presencia nuclear de NS5 es necesaria para modular la respuesta inmune y por lo tanto estaría involucrada en la patogénesis de la enfermedad o en la respuesta a la infección viral (Cheng et al., 2024; Rakotoarimanana et al., 2026). Además, de acuerdo con Kelley (Kelley et al., 2011) la proteína NS5 del DENV se correlaciona con una alta inducción de inmunomoduladores incluyendo IL-6, TNF- α e IL-8. Esto podría explicar por qué se observó una inhibición de la secreción de TNF- α e IL-6 con todos los tratamientos que emplearon IVM (Figura 26,27). En particular con TNF- α , se observó este efecto solo a las 12 hpi, sin embargo, hay que destacar que es secretada en un tiempo específico durante la infección. Este resultado reafirma lo que se había reportado anteriormente en el grupo de trabajo, indicando que TNF- α tiene un pico de secreción durante etapas tempranas de la infección en macrófagos (Flores, 2016). Así mismo Flores (2016) reporta que el pico máximo de secreción de IL-6 es hasta las 72 hpi. Sin embargo, debido a que este proyecto fue planteado para los eventos iniciales, no se estudiaron tiempos mayores a las 24 h. No obstante, la infección de las células o la estimulación con LPS provocan la expresión y secreción de IL-6 desde las 12 h y se incrementa a las 24 (Figura 27,28).

Estos hallazgos abren interrogantes sobre los mecanismos de acción de la IVM más allá de la inhibición de la importación nuclear de NS5. Un estudio *in silico* reciente demostró que este fármaco presenta afinidad directa por NS5, sugiriendo la formación de complejos proteína-fármaco independientes de la vía de las importinas α/β (Yaswanth et al., 2025).

Adicionalmente, se ha propuesto que la IVM posee propiedades antiinflamatorias no mediadas por la interacción con proteínas virales. En un modelo de macrófago murino, la IVM redujo la producción de TNF- α , IL-6 e IL-1 inducidas por la estimulación con LPS y además,

aumentó la supervivencia de ratones a los que se les había administrado LPS, sugiriendo un efecto protector en la inflamación (Zhang et al., 2008). El mecanismo propuesto por estos autores es que el fármaco inhibe la vía de NF- κ B al impedir que el factor p65/REL-A se transloque de manera adecuada al núcleo. Asimismo, en un modelo de cicatrización dérmica en ratas, la administración de IVM disminuyó la secreción de IL-1 α y TNF- α y favoreció la producción de TGF- β 1, el cual podría participar en la regulación negativa de la producción de mediadores inflamatorios (Sia et al., 2020).

En el ámbito clínico, la FDA aprobó en 2014 el uso de Ivermectina al 1% en formulación de crema (Soolantra) para el tratamiento de la rosácea, una enfermedad inflamatoria crónica que se caracteriza por eritema constante acompañado de pústulas y pápulas (Kaur et al., 2024). Un estudio clínico demostró que la aplicación tópica del medicamento mejoró los signos clínicos y síntomas de la enfermedad, observándose específicamente la disminución en la expresión génica de TNF- α (Schaller et al., 2017). No obstante, debido a la naturaleza de la enfermedad, en cuya patogénesis intervienen diversos factores inmunológicos y vasculares, así como la presencia de *Demodex folliculorum* (Maden, 2023), el papel exacto de la IVM sobre la enfermedad no resulta completamente claro, dado que el efecto terapéutico podría atribuirse a su acción antiparasitaria.

El interés de este proyecto fue combinar dos fármacos que actúan en vías diferentes, una de ellas al disminuir la replicación viral (con IVM) y otra que regulara la respuesta inmune para evitar una respuesta exacerbada (OSV). Los resultados mostraron que el OSV inhibe la secreción de TNF- α e IL-6 en macrófagos infectados con DENV, lo que confirma su posible uso como inmunoregulator. Sin embargo, la IVM por sí sola redujo eficazmente la secreción de citocinas, y su combinación con OSV no produjo un efecto sinérgico ni una mejora significativa. Es importante señalar que la correlación entre la expresión de ARNm y la proteína es aproximadamente del 40% debido a la estabilidad del transcrito y regulación post-traducciona de las proteínas (Koussounadis et al., 2015; Upadhy & Ryan, 2022). En un estudio realizado por Pandey et al., 2023 (Pandey et al., 2023) se demostró que la combinación de OSV con otro fármaco redujo eficazmente la expresión de TNF- α , IL-6 e IL-1 β en tejido pulmonar de ratones infectados con influenza, aunque dicho efecto se atribuyó principalmente a la actividad antiviral del OSV contra el virus. En contraste, el efecto antiinflamatorio del OSV observado en el presente estudio podría deberse a la inhibición de la Neu-1, dado que esta sialidasa participa en la vía de señalización de TLR-4 que

da como producto la liberación de citocinas inflamatorias (Amith et al., 2010; G. Y. Chen et al., 2014). La inhibición de neuraminidasas celulares, también se ha descrito cuando se utilizan otros antivirales como el zanamivir, que en particular inhibe a la Neu-3 (Puerta-Guardo et al., 2016). Además, se ha propuesto que la proteína NS1 del DENV y otros flavivirus aumenta la expresión de Neu-1, Neu-2 y Neu-3 durante las primeras horas post-infección (Puerta-Guardo et al., 2019); esto podría sugerir que el aumento de Neu-1 se ve involucrado en la alta producción de mediadores inflamatorios.

A pesar de que estos resultados no respaldan el uso de la combinación de IVM y OSV en la infección por DENV, representan una oportunidad para nuevas investigaciones donde se profundice elucidar el mecanismo de acción y uso de ambos fármacos más allá de sus dianas terapéuticas tradicionales.

12. Conclusiones

12.1. Conclusión General

El tratamiento combinado de ivermectina (IVM) y oseltamivir (OSV) no presenta efectividad sobre la replicación de DENV-2 en macrófagos. Esta combinación disminuye la secreción de TNF- α e IL-6 durante la infección por el virus, la diferencia entre el tratamiento individual o combinado con IVM representa una mejor respuesta que los tratamientos individuales.

12.2. Conclusiones Específicas

1. La IVM actúa como agente antiviral al disminuir las copias virales a concentraciones de 0.05 hasta 0.5 μ M en las primeras 12 hpi. No obstante, este efecto no se observa cuando se analiza la combinación de IVM con OSV. A las 24 hpi, ya no se observa efecto antiviral con ninguno de los tratamientos.
2. Tanto la IVM como el OSV, de manera individual y en combinación, disminuyen la secreción de TNF- α a las 12 hpi, que corresponde al tiempo mayor de secreción de esta molécula.
3. Ni la IVM ni el OSV, de manera individual o en combinación, disminuyen la expresión de IL-6 en los tiempos evaluados. Sin embargo, de manera individual y en combinación, disminuyen su secreción, lo que sugiere un efecto sobre la síntesis o la vía de secreción de esta citocina.

13. Perspectivas

1. Evaluar los sobrenadantes de las células infectadas tratadas con IVM mediante un ensayo de formación de placas para determinar su efecto sobre la producción de partículas virales infectivas.
2. Realizar estudios para confirmar la inhibición del importe de NS3 y NS5 al núcleo de la célula con IVM, así como el efecto en conjunto con OSV, con la finalidad de entender los efectos observados en este estudio.
3. Evaluar el efecto de IVM y OSV sobre la secreción de citocinas a tiempos más largos post infección.
4. Evaluar el efecto de ambos fármacos en la producción de TGF- β e IL-10 como potenciales inmunoreguladores.

14. Referencias

- Abdulkhalek, S., & Szewczuk, M. R. (2013). Neu1 sialidase and matrix metalloproteinase-9 cross-talk regulates nucleic acid-induced endosomal TOLL-like receptor-7 and -9 activation, cellular signaling and pro-inflammatory responses. *Cellular Signalling*, 25(11), 2093–2105. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.06.010>
- Adikari, T. N., Riaz, N., Sigera, C., Leung, P., Valencia, B. M., Barton, K., Smith, M. A., Bull, R. A., Li, H., Luciani, F., Weeratunga, P., Thein, T.-L., Lim, V. W. X., Leo, Y.-S., Rajapakse, S., Fink, K., Lloyd, A. R., Fernando, D., & Rodrigo, C. (2020). Single molecule, near full-length genome sequencing of dengue virus. *Scientific Reports*, 10(1), 18196. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75374-1>
- Amith, S. R., Jayanth, P., Franchuk, S., Finlay, T., Seyrantepe, V., Beyaert, R., Pshezhetsky, A. V., & Szewczuk, M. R. (2010). Neu1 desialylation of sialyl α -2,3-linked β -galactosyl residues of TOLL-like receptor 4 is essential for receptor activation and cellular signaling. *Cellular Signalling*, 22(2), 314–324. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.09.038>
- Amith, S. R., Jayanth, P., Franchuk, S., Siddiqui, S., Seyrantepe, V., Gee, K., Basta, S., Beyaert, R., Pshezhetsky, A. V., & Szewczuk, M. R. (2009). Dependence of pathogen molecule-induced Toll-like receptor activation and cell function on Neu1 sialidase. *Glycoconjugate Journal*, 26(9), 1197–1212. <https://doi.org/10.1007/s10719-009-9239-8>
- Anumanthan, G., Sahay, B., & Mergia, A. (2025). Current Dengue Virus Vaccine Developments and Future Directions. *Viruses*, 17(2), 212. <https://doi.org/10.3390/v17020212>
- Arouche, T. da S., Martins, A. Y., Ramalho, T. de C., Júnior, R. N. C., Costa, F. L. P., Filho, T. S. de A., & Neto, A. M. J. C. (2021). Molecular Docking of Azithromycin, Ritonavir, Lopinavir, Oseltamivir, Ivermectin and Heparin Interacting with Coronavirus Disease 2019 Main and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 3C-Like Proteases. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 21(4), 2075–2089. <https://doi.org/10.1166/jnn.2021.19029>
- Awad, H., Hassan, B., Dweek, S., Aboelata, Y., Rawas-Qalaji, M., & Ahmed, I. S. (2022). Repurposing Potential of the Antiparasitic Agent Ivermectin for the Treatment and/or Prophylaxis of COVID-19. *Pharmaceuticals*, 15(9), 1068. <https://doi.org/10.3390/ph15091068>
- Aynekulu Mersha, D. G., van der Sterren, I., van Leeuwen, L. P. M., Langerak, T., Hakim, M. S., Martina, B., van Lelyveld, S. F. L., & van Gorp, E. C. M. (2024). The role of antibody-dependent enhancement in dengue vaccination. *Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines*, 10(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s40794-024-00231-2>
- Bhatt, P., Sabeena, S. P., Varma, M., & Arunkumar, G. (2021a). Current Understanding of the Pathogenesis of Dengue Virus Infection. *Current Microbiology*, 78(1), 17–32. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02284-w>
- Bhatt, P., Sabeena, S. P., Varma, M., & Arunkumar, G. (2021b). Current Understanding of the Pathogenesis of Dengue Virus Infection. *Current Microbiology*, 78(1), 17–32. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02284-w>

- Briseno-Ramirez, J., De Arcos-Jiménez, J. C., López-Yáñez, A. M., Damián-Negrete, R. M., Vargas-Becerra, P. N., Salas-Salazar, L. K., Martínez-Melendres, B., Caballero-Quirarte, I., & Martínez-Ayala, P. (2025). Trends and cyclical patterns of dengue disease in Mexico: A 40-year time series analysis. *Annals of Epidemiology*, 112, 53–63. <https://doi.org/10.1016/J.ANNEPIDEM.2025.10.022>
- Calisher, C. H., Karabatsos, N., Dalrymple, J. M., Shope, R. E., Porterfield, J. S., Westaway, E. G., & Brandt, W. E. (1989). Antigenic Relationships between Flaviviruses as Determined by Cross-neutralization Tests with Polyclonal Antisera. *Journal of General Virology*, 70(1), 37–43. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-1-37>
- Cardwell, L. A., Alinia, H., Moradi Tuchayi, S., & Feldman, S. R. (2016). New developments in the treatment of rosacea - role of once-daily ivermectin cream. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 9, 71–77. <https://doi.org/10.2147/CCID.S98091>
- Carr, J. M., Cabezas-Falcon, S., Dubowsky, J. G., Hulme-Jones, J., & Gordon, D. L. (2020). Dengue virus and the complement alternative pathway. *FEBS Letters*, 594(16), 2543–2555. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13730>
- Cenerenti, M., Saillard, M., Romero, P., & Jandus, C. (2022). The Era of Cytotoxic CD4 T Cells. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.867189>
- Chen, G. Y., Brown, N. K., Wu, W., Khedri, Z., Yu, H., Chen, X., van de Vlekkert, D., D'Azzo, A., Zheng, P., & Liu, Y. (2014a). Broad and direct interaction between TLR and Siglec families of pattern recognition receptors and its regulation by Neu1. *ELife*, 3, 1–18. <https://doi.org/10.7554/elife.04066>
- Chen, G. Y., Brown, N. K., Wu, W., Khedri, Z., Yu, H., Chen, X., van de Vlekkert, D., D'Azzo, A., Zheng, P., & Liu, Y. (2014b). Broad and direct interaction between TLR and Siglec families of pattern recognition receptors and its regulation by Neu1. *ELife*, 3, 1–18. <https://doi.org/10.7554/elife.04066>
- Chen, H.-R., Lai, Y.-C., & Yeh, T.-M. (2018). Dengue virus non-structural protein 1: a pathogenic factor, therapeutic target, and vaccine candidate. *Journal of Biomedical Science*, 25(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0462-0>
- Chen, J., Guan, L., Tang, L., Liu, S., Zhou, Y., Chen, C., He, Z., & Xu, L. (2019). T Helper 9 Cells: A New Player in Immune-Related Diseases. *DNA and Cell Biology*, 38(10), 1040–1047. <https://doi.org/10.1089/dna.2019.4729>
- Cheng, C. X., Alvin Tan, M. J., Chan, K. W. K., Watanabe, S., Wang, S., Choy, M. M., Manuel, M., Victorio, C. B. L., Ong, J., Reolo, M., Chacko, A.-M., & Vasudevan, S. G. (2021). In Vitro and In Vivo Stability of P884T, a Mutation that Relocalizes Dengue Virus 2 Non-structural Protein 5. *ACS Infectious Diseases*, 7(12), 3277–3291. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00441>
- Cheng, C. X., Tan, M. J. A., Chan, K. W. K., Choy, M. M. J., Roman, N., Arnold, D. D. R., Bifani, A. M., Kong, S. Y. Z., Bist, P., Nath, B. K., Swarbrick, C. M. D., Forwood, J. K., & Vasudevan, S. G. (2024). Serotype-Specific Regulation of Dengue Virus NS5 Protein Subcellular Localization. *ACS Infectious Diseases*, 10(6), 2047–2062. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00054>
- Conceição, T. M., El-Bacha, T., Villas-Bôas, C. S. A., Coello, G., Ramírez, J., Montero-Lomeli, M., & Da Poian, A. T. (2010). Gene expression analysis during dengue virus infection in HepG2 cells

- reveals virus control of innate immune response. *Journal of Infection*, 60(1), 65–75.
<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2009.10.003>
- Cotrone, T. S., Kobylinski, K., Ponlawat, A., Im-Erbsin, R., Sunyakumthorn, P., Vanachayangkul, P., Poolpanichupatam, Y., Lohachanakul, J., Klungthong, C., Farmer, A., Fernandez, S., & Hunsawong, T. (2025). Ivermectin Inhibits Zika Virus Replication in Vitro But Does Not Prevent Zika Virus Infection in Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 112(3), 648–656. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.24-0183>
- Crump, A., & Omura, S. (2011). Ivermectin, “Wonder drug” from Japan: the human use perspective. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 87(2), 13–28. <https://doi.org/10.2183/pjab.87.13>
- Cruz, I. (2017). *CAMBIO DE ÁCIDO SIÁLICO EN MACRÓFAGOS INFECTADOS CON VIRUS DENGUE* [Tesis de Maestría]. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Cruz-Oliveira, C., Freire, J. M., Conceição, T. M., Higa, L. M., Castanho, M. A. R. B., & Da Poian, A. T. (2015). Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(2), 155–170. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu004>
- de Kruif, M. D., Setiati, T. E., Mairuhu, A. T. A., Koraka, P., Aberson, H. A., Spek, C. A., Osterhaus, A. D. M. E., Reitsma, P. H., Brandjes, D. P. M., Soemantri, A., & van Gorp, E. C. M. (2008). Differential Gene Expression Changes in Children with Severe Dengue Virus Infections. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(4), e215. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000215>
- De La Guardia, C., & Lleona, R. (2014). Progress in the Identification of Dengue Virus Entry/Fusion Inhibitors. *BioMed Research International*, 2014, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/825039>
- Denolly, S., Guo, H., Martens, M., Płaszczyc, A., Scaturro, P., Prasad, V., Kongmanas, K., Punyadee, N., Songjaeng, A., Mairiang, D., Pichlmair, A., Avirutnan, P., & Bartenschlager, R. (2023). Dengue virus NS1 secretion is regulated via importin-subunit $\beta 1$ controlling expression of the chaperone GRp78 and targeted by the clinical drug ivermectin. *MBio*, 14(5).
<https://doi.org/10.1128/mbio.01441-23>
- Duangkhae, P., Erdos, G., Ryman, K. D., Watkins, S. C., Falo, L. D., Marques, E. T. A., & Barratt-Boyes, S. M. (2018). Interplay between Keratinocytes and Myeloid Cells Drives Dengue Virus Spread in Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 138(3), 618–626.
<https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.10.018>
- Duc Anh, D., Vugrek, L., Trong The, N., Hafza, N., Nhat My, T., Thi Kieu Linh, L., Huy Loc, D., Schmidt-Chanasit, J., Linh Toan, N., Kremsner, P. G., Huu Song, L., & Velavan, T. P. (2025). Characterization of dengue patients in Vietnam: Clinical, virological, and IL-10 profiles during 2021-2022 outbreaks. *PLOS Neglected Tropical Diseases*.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012954>
- El Sahili, A., & Lescar, J. (2017). Dengue Virus Non-Structural Protein 5. *Viruses*, 9(4), 91.
<https://doi.org/10.3390/v9040091>
- Elong Ngono, A., & Shresta, S. (2019). Cross-Reactive T Cell Immunity to Dengue and Zika Viruses: New Insights Into Vaccine Development. *Frontiers in Immunology*, 10, 1316.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01316>

- Felipe Valdés-López, J., Sebastián Tamayo-Molina, Y., Fernandez, G. J., Hernández-Sarmiento, J., Velilla, P. A., & Urcuqui-Inchima, S. (2025). *Early events in dengue virus infection inducing cytokine storm: The dynamic interplay of pattern-recognition receptors, inflammasome activation, and biphasic NF- κ B and STAT1-dependent inflammatory responses in human mononuclear phagocytes*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0013366>
- Fernandes-Santos, C., & de Azeredo, E. L. (2022). Innate Immune Response to Dengue Virus: Toll-like Receptors and Antiviral Response. In *Viruses* (Vol. 14, Number 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/v14050992>
- Filomatori, C., Marcello, A., & Ludert, J. (2026). Cellular Biology: Virus-Host Interactions and RNA Structure and Function . In C. N. Duarte dos Santos & M. Giovanetti (Eds.), *Dengue Virus Evolution: From Emergence to a Global Health Crisis* (Vol. 447, pp. 35–89). Springer, Cham.
- Flint, J., Racaniello, V., Rall, G., Hatzioannou, T., & Skalka, A. M. (2020). *Principles of Virology: II* (ASM Press, Ed.; 7th ed.).
- Flores, K. (2016). *ESTUDIO DEL PAPEL DE IgG1 EN LA LIBERACIÓN DE CITOCINAS POR EL MACRÓFAGO EN LA INFECCIÓN POR DENGUE* [Tesis de Maestría]. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Floris, I., Rose, T., Rojas, J. A. C., Appel, K., Roesch, C., & Lejeune, B. (2020). Pro-Inflammatory Cytokines at Ultra-Low Dose Exert Anti-Inflammatory Effect In Vitro: A Possible Mode of Action Involving Sub-Micron Particles? *Dose-Response*, 18(4). <https://doi.org/10.1177/1559325820961723>
- Fraser, J. E., Rawlinson, S. M., Wang, C., Jans, D. A., & Wagstaff, K. M. (2014). Investigating Dengue Virus Nonstructural Protein 5 (NS5) Nuclear Import. In *Dengue Methods and Protocols* (Vol. 1138, pp. 301–328). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0348-1_19
- Freshney, R. I. (2016). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications.: I* (6th ed.). Wiley & Blackwell.
- Fung, K. W., Kapusnik-Uner, J., Cunningham, J., Higby-Baker, S., & Bodenreider, O. (2017). Comparison of three commercial knowledge bases for detection of drug-drug interactions in clinical decision support. *Journal of the American Medical Informatics Association*, 24(4), 806–812. <https://doi.org/10.1093/jamia/ocx010>
- Glasner, D. R., Puerta-Guardo, H., Beatty, P. R., & Harris, E. (2018). The good, the bad, and the shocking: The multiple roles of dengue virus nonstructural protein 1 in protection and pathogenesis. *Annual Review of Virology*, 5, 227–253. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041848>
- Goh, J. Z. H., De Hayr, L., Khromykh, A. A., & Slonchak, A. (2024). The Flavivirus Non-Structural Protein 5 (NS5): Structure, Functions, and Targeting for Development of Vaccines and Therapeutics. In *Vaccines* (Vol. 12, Number 8). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/vaccines12080865>
- Hannemann, H., Sung, P.-Y., Chiu, H.-C., Yousuf, A., Bird, J., Lim, S. P., & Davidson, A. D. (2013). Serotype-specific Differences in Dengue Virus Non-structural Protein 5 Nuclear Localization. *Journal of Biological Chemistry*, 288(31), 22621–22635. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.481382>
- Harapan, H., Michie, A., Sasmono, R. T., & Imrie, A. (2020). Dengue: A Minireview. *Viruses*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/v12080829>

- Id, T. A., & Getawa, S. (2021). *Coagulation abnormalities in Dengue fever infection: A systematic review and meta-analysis*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009666>
- Jiravejchakul, N., Chan-In, W., Thuncharoen, W., Thailand, D., Sungnak, W., Charoensawan, V., Vacharathit, V., & Matangkasombut, P. (2025). Cytokine and chemokine kinetics in natural human dengue infection as predictors of disease outcome. *Scientific Reports*, 1562(15). <https://doi.org/10.1038/s41598-025-99628-y>
- Jitobaom, K., Boonarkart, C., Manopwisedjaroen, S., Punyadee, N., Borwornpinyo, S., Thitithanyanont, A., Avirutnan, P., & Auewarakul, P. (2022). Synergistic anti-SARS-CoV-2 activity of repurposed anti-parasitic drug combinations. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 23(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s40360-022-00580-8>
- Kaur, B., Blavo, C., & Parmar, M. S. (2024). Ivermectin: A Multifaceted Drug With a Potential Beyond Anti-parasitic Therapy. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.56025>
- Kayesh, M. E. H., Kohara, M., & Tsukiyama-Kohara, K. (2021). Recent Insights Into the Molecular Mechanism of Toll-Like Receptor Response to Dengue Virus Infection. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.744233>
- Kelley, J. F., Kaufusi, P. H., Volper, E. M., & Nerurkar, V. R. (2011). Maturation of dengue virus nonstructural protein 4B in monocytes enhances production of dengue hemorrhagic fever-associated chemokines and cytokines. *Virology*, 418(1), 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.07.006>
- Khan, M. B., Yang, Z. S., Lin, C. Y., Hsu, M. C., Urbina, A. N., Assavalapsakul, W., Wang, W. H., Chen, Y. H., & Wang, S. F. (2023). Dengue overview: An updated systemic review. In *Journal of Infection and Public Health* (Vol. 16, Number 10, pp. 1625–1642). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.08.001>
- Kim, S.-R., Lee, J.-M., Kang, H. J., Ryou, J., & Shim, S.-M. (2024). Antiviral activity of pimecrolimus against dengue virus type 2 infection in vitro and in vivo. *Scientific Reports*, 14(1), 13303. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-61127-x>
- King, C. R., Tessier, T. M., Dodge, M. J., Weinberg, J. B., & Mymryk, J. S. (2020). Inhibition of Human Adenovirus Replication by the Importin α/β 1 Nuclear Import Inhibitor Ivermectin. *Journal of Virology*, 94(18). <https://doi.org/10.1128/JVI.00710-20>
- Kong Yong, Y., Fen Wong, W., Vignesh, R., Chattopadhyay, I., Velu, V., Yien Tan, H., Zhang, Y., Larsson, M., & Shankar, E. M. (2022). Dengue Infection - Recent Advances in Disease Pathogenesis in the Era of COVID-19. *Frontiers*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.889196>
- Koussounadis, A., Langdon, S. P., Um, I. H., Harrison, D. J., & Smith, V. A. (2015). Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. *Scientific Reports*, 5(1), 10775. <https://doi.org/10.1038/srep10775>
- Kretschmer, M., Collins, J., Dale, A. P., Garrett, B., Koski, L., Zabel, K., Staab, R. N., Turnbow, K., Nativio, J., Andrews, K., Smith, W. E., Townsend, J., Busser, N., Will, J., Burr, K., Jones, F. K., Santiago, G. A., Fitzpatrick, K. A., Ruberto, I., ... Sunenshine, R. H. (2023). First Evidence of Locally Acquired Dengue Virus Infection — Maricopa County, Arizona, November 2022. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 72(11), 290–291. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7211a5>

- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C. T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P. R., Strauss, E. G., Baker, T. S., & Strauss, J. H. (2002). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, *108*(5), 717–725. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00660-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00660-8)
- Kumar, A., Bühler, S., Selisko, B., Davidson, A., Mulder, K., Canard, B., Miller, S., & Bartenschlager, R. (2013). Nuclear localization of dengue virus nonstructural protein 5 does not strictly correlate with efficient viral RNA replication and inhibition of type I interferon signaling. *Journal of Virology*, *87*(8), 4545–4557. <https://doi.org/10.1128/JVI.03083-12>
- Kutkat, O., Kandeil, A., Moatasim, Y., Elshaier, Y. A. M. M., El-Sayed, W. A., Gaballah, S. T., El Taweel, A., Kamel, M. N., El Sayes, M., Ramadan, M. A., El-Shesheny, R., Abdel-Megeid, F. M. E., Webby, R., Kayali, G., & Ali, M. A. (2022). In Vitro and In Vivo Antiviral Studies of New Heteroannulated 1,2,3-Triazole Glycosides Targeting the Neuraminidase of Influenza A Viruses. *Pharmaceuticals*, *15*(3), 351. <https://doi.org/10.3390/ph15030351>
- Lanciotti, R. S., Calisher, C. H., Gubler, D. J., Chang, G. J., & Vorndam, A. V. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, *30*(3), 545–551. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.3.545-551.1992>
- Laserna, A., Barahona-Correa, J., Baquero, L., Castañeda-Cardona, C., & Rosselli, D. (2018). Economic impact of dengue fever in Latin America and the Caribbean: a systematic review. *Revista Panamericana de Salud Pública*, *42*. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2018.111>
- Lee, M. F., Voon, G. Z., Lim, H. X., Chua, M. L., & Poh, C. L. (2022). Innate and adaptive immune evasion by dengue virus. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1004608>
- Li, Q., & Kang, C. (2022). Structures and Dynamics of Dengue Virus Nonstructural Membrane Proteins. *Membranes*, *12*(2), 231. <https://doi.org/10.3390/membranes12020231>
- Lien, T.-S., Sun, D.-S., Hung, S.-C., Wu, W.-S., & Chang, H.-H. (2021). Dengue Virus Envelope Protein Domain III Induces Nlrp3 Inflammasome-Dependent NETosis-Mediated Inflammation in Mice. *Frontiers in Immunology*, *12*, 618577. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.618577>
- Lim, A., Shearer, F. M., Sewalk, K., Pigott, D. M., Clarke, J., Ghouse, A., Judge, C., Kang, H., Messina, J. P., Kraemer, M. U. G., Gaythorpe, K. A. M., de Souza, W. M., Nsoesie, E. O., Celone, M., Faria, N., Ryan, S. J., Rabe, I. B., Rojas, D. P., Hay, S. I., ... Brady, O. J. (2025). The overlapping global distribution of dengue, chikungunya, Zika and yellow fever. *Nature Communications*, *16*(1), 3418. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-58609-5>
- Liu, J., Carlos Castaño, J., Samadder, A., Loregian, A., Nannetti, G., Santi, N., Mercorelli, B., Bazzacco, A., Celegato, M., Ferla, S., Sturlese, M., Buurma, N. J., & Branciale, A. (2025). OPEN ACCESS EDITED BY New dengue virus inhibitors targeting NS3-NS5 interaction identified by in silico screening. *TYPE Original Research PUBLISHED*, *31*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1663404>
- Liu, T., Huang, T., Li, J., Li, A., Li, C., Huang, X., Li, D., Wang, S., & Liang, M. (2023). Optimization of differentiation and transcriptomic profile of THP-1 cells into macrophage by PMA. *PLoS ONE*, *18*(7 July). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0286056>

- Luan, X., Wang, L., Song, G., & Zhou, W. (2024). Innate immune responses to RNA: sensing and signaling. *Frontiers in Immunology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1287940>
- Maden, S. (2023). Rosacea: An Overview of Its Etiological Factors, Pathogenesis, Classification and Therapy Options. *Dermato*, 3(4), 241–262. <https://doi.org/10.3390/dermato3040019>
- Madhry, D., Malvankar, S., Phadnis, S., Srivastava, R. K., Bhattacharyya, S., & Verma, B. (2023). Synergistic correlation between host angiogenin and dengue virus replication. *RNA Biology*, 20(1), 805–816. <https://doi.org/10.1080/15476286.2023.2264003>
- Malavige, G. N., Jeewandara, C., & Ogg, G. S. (2020). Dysfunctional Innate Immune Responses and Severe Dengue. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.590004>
- Malavige, G. N., & Ogg, G. S. (2024). Molecular mechanisms in the pathogenesis of dengue infections. In *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 30, Number 5, pp. 484–498). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2024.03.006>
- Mapalagamage, M., Weiskopf, D., Sette, A., & De Silva, A. D. (2022). Current Understanding of the Role of T Cells in Chikungunya, Dengue and Zika Infections. *Viruses*, 14(2), 242. <https://doi.org/10.3390/v14020242>
- Martin, R. J., Robertson, A. P., & Choudhary, S. (2021). Ivermectin: An Anthelmintic, an Insecticide, and Much More. *Trends in Parasitology*, 37(1), 48–64. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.10.005>
- Masood, K. I., Jamil, B., Rahim, M., Islam, M., Farhan, M., & Hasan, Z. (2018). Role of TNF α , IL-6 and CXCL10 in Dengue disease severity. *Iranian Journal of Microbiology*, 10(3), 202–207.
- Mastrangelo, E., Pezzullo, M., De Burghgraeve, T., Kaptein, S., Pastorino, B., Dallmeier, K., de Lamballerie, X., Neyts, J., Hanson, A. M., Frick, D. N., Bolognesi, M., & Milani, M. (2012a). Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: new prospects for an old drug. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(8), 1884–1894. <https://doi.org/10.1093/jac/dks147>
- Mastrangelo, E., Pezzullo, M., De Burghgraeve, T., Kaptein, S., Pastorino, B., Dallmeier, K., de Lamballerie, X., Neyts, J., Hanson, A. M., Frick, D. N., Bolognesi, M., & Milani, M. (2012b). Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: new prospects for an old drug. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(8), 1884–1894. <https://doi.org/10.1093/jac/dks147>
- Mendonca, M., Vicente Rozini, S., Cecília Quirino-Teixeira, A., Barbosa-Lima, G., Lopes, J. F., Sacramento, C. Q., Bozza, F. A., Bozza, P. T., Hottz, E. D., Canobbio, I., Beddingfield, B., Hernandez, J. C., Limjindaporn, T., & Van Der Ven, A. (2022). Dengue induces iNOS expression and nitric oxide synthesis in platelets through IL-1R. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1029213>
- Meng, F., Badierah, R. A., Almeshdar, H. A., Redwan, E. M., Kurgan, L., & Uversky, V. N. (2015). Unstructural biology of the dengue virus proteins. *FEBS Journal*, 282(17), 3368–3394. <https://doi.org/10.1111/febs.13349>
- Mukherjee, D., Das, S., Begum, F., Mal, S., & Ray, U. (2019). The Mosquito Immune System and the Life of Dengue Virus: What We Know and Do Not Know. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/pathogens8020077>

- Muralidharan, A., & Reid, S. P. (2021). Complex Roles of Neutrophils during Arboviral Infections. *Cells*, 10(6), 1324. <https://doi.org/10.3390/cells10061324>
- Nanaware, N., Banerjee, A., Bagchi, S. M., Bagchi, P., & Mukherjee, A. (2021a). Dengue virus infection: A tale of viral exploitations and host responses. In *Viruses* (Vol. 13, Number 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/v13101967>
- Nanaware, N., Banerjee, A., Bagchi, S. M., Bagchi, P., & Mukherjee, A. (2021b). Dengue virus infection: A tale of viral exploitations and host responses. In *Viruses* (Vol. 13, Number 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/v13101967>
- Obi, J., Gutiérrez-Barbosa, H., Chua, J., & Deredge, D. (2021). Current Trends and Limitations in Dengue Antiviral Research. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 6(4), 180. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed6040180>
- OMS. (2024, May 30). *Dengue Global Situation*.
- Opasawatchai, A., Amornsupawat, P., Jiravejchakul, N., Chan-in, W., Spoerk, N. J., Manopwisedjaroen, K., Singhasivanon, P., Yingtaweesak, T., Suraamornkul, S., Mongkolsapaya, J., Sakuntabhai, A., Matangkasombut, P., & Loison, F. (2019). Neutrophil Activation and Early Features of NET Formation Are Associated With Dengue Virus Infection in Human. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03007>
- Organización Mundial de la Salud. (2023, December 21). *Dengue Situación Mundial*. <https://www.who.int/es/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON498>
- Organización Panamericana de la Salud. (2025, November 7). *Dengue. Situación epidemiológica del dengue en las Américas - Semana epidemiológica 48, 2025*.
- O'Shea, L., Szewczuk, M., Abdulkhalek, S., Allison, S., & Neufeld, R. (2014). Therapeutic targeting of Neu1 sialidase with oseltamivir phosphate (Tamiflu®) disables cancer cell survival in human pancreatic cancer with acquired chemoresistance. *OncoTargets and Therapy*, 117. <https://doi.org/10.2147/OTT.S55344>
- Palacios-Rápalo, S. N., De Jesús-González, L. A., Reyes-Ruiz, J. M., Osuna-Ramos, J. F., Farfan-Morales, C. N., Gutiérrez-Escolano, A. L., & del Ángel, R. M. (2021). Nuclear localization of non-structural protein 3 (NS3) during dengue virus infection. *Archives of Virology*, 166(5), 1439–1446. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05026-w>
- Palacios-Rápalo, S. N., Farfan-Morales, C. N., Cordero-Rivera, C. D., De Jesús-González, L. A., Reyes-Ruiz, J. M., Meraz-Ríos, M. A., & Del Ángel, R. M. (2023a). An ivermectin – atorvastatin combination impairs nuclear transport inhibiting dengue infection in vitro and in vivo. *IScience*, 26(12). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.108294>
- Palacios-Rápalo, S. N., Farfan-Morales, C. N., Cordero-Rivera, C. D., De Jesús-González, L. A., Reyes-Ruiz, J. M., Meraz-Ríos, M. A., & Del Ángel, R. M. (2023b). An ivermectin – atorvastatin combination impairs nuclear transport inhibiting dengue infection in vitro and in vivo. *IScience*, 26(12). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.108294>
- Pan, P., Zhang, Q., Liu, W., Wang, W., Yu, Z., Lao, Z., Zhang, W., Shen, M., Wan, P., Xiao, F., Shereen, M. A., Zhang, W., Tan, Q., Liu, Y., Liu, X., Wu, K., Liu, Y., Li, G., & Wu, J. (2019). Dengue Virus

- Infection Activates Interleukin-1 β to Induce Tissue Injury and Vascular Leakage. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02637>
- Pandey, B. D., & Costello, A. (2019). The dengue epidemic and climate change in Nepal. *The Lancet*, 394(10215), 2150–2151. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32689-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32689-3)
- Pandey, P., Al Rumaih, Z., Kels, Ma., Ng, E., Kc, R., Malley, R., Chaudhri, G., & Karupiah, G. (2023). Therapeutic Targeting of Inflammation and Virus Simultaneously Ameliorates Influenza Pneumonia and Protects from Morbidity and Mortality. *Viruses*, 15(2), 318. <https://doi.org/10.3390/v15020318>
- Pathak, V. K., & Mohan, M. (2019). A notorious vector-borne disease: Dengue fever, its evolution as public health threat. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 8(10), 3125–3129. https://doi.org/10.4103/jfmprc.jfmprc_716_19
- Paz-Bailey, G., Adams, L. E., Deen, J., Anderson, K. B., & Katzelnick, L. C. (2024). Dengue. In *The Lancet* (Vol. 403, Number 10427, pp. 667–682). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)02576-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)02576-X)
- Poggianella, M., Campos, J. L. S., Chan, K. R., Tan, H. C., Bestagno, M., Ooi, E. E., & Burrone, O. R. (2015). Dengue e protein domain iii-based dna immunisation induces strong antibody responses to all four viral serotypes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(7), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003947>
- Procopio, A. C., Colletta, S., Laratta, E., Mellace, M., Tilocca, B., Ceniti, C., Urbani, A., & Roncada, P. (2024). Integrated One Health strategies in Dengue. *One Health*, 18, 100684. <https://doi.org/10.1016/J.ONEHLT.2024.100684>
- Puerta-Guardo, H., Glasner, D. R., Espinosa, D. A., Biering, S. B., Patana, M., Ratnasiri, K., Wang, C., Beatty, P. R., & Harris, E. (2019). Flavivirus NS1 Triggers Tissue-Specific Vascular Endothelial Dysfunction Reflecting Disease Tropism conceived and designed the experiments. *Cell Rep*, 26(6), 1598–1613. <https://doi.org/10.1016/j.celrep>
- Puerta-Guardo, H., Glasner, D. R., & Harris, E. (2016). Dengue Virus NS1 Disrupts the Endothelial Glycocalyx, Leading to Hyperpermeability. *PLoS Pathogens*, 12(7), e1005738. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005738>
- Puerta-Guardo, H., Mosso, C., Medina, F., Liprandi, F., Ludert, J. E., & del Angel, R. M. (2010). Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in U937 cells requires cholesterol-rich membrane microdomains. *Journal of General Virology*, 91(2), 394–403. <https://doi.org/10.1099/vir.0.015420-0>
- Rakotoarimanana, A. K., Carriere Richez, P., Ramanandraibe, V. V., Bialecki, A., & El Kalamouni, C. (2026). Antiviral Strategies Against Dengue Virus: Recent Insights into Compounds Targeting Viral and Host Factors. In C. Nunes Duarte dos Santos & M. Giovanetti (Eds.), *Dengue Virus Evolution: From Emergence to a Global Health Crisis* (1st ed., pp. 288–296). Springer Cham.
- Rivino, L. (2018). *Understanding the Human T Cell Response to Dengue Virus* (pp. 241–250). https://doi.org/10.1007/978-981-10-8727-1_17
- Roy, S. K., & Bhattacharjee, S. (2021). Dengue virus: Epidemiology, biology, and disease aetiology. In *Canadian Journal of Microbiology* (Vol. 67, Number 10, pp. 687–702). Canadian Science Publishing. <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0572>

- Sawant, J., Patil, A., & Kurle, S. (2023). A Review: Understanding Molecular Mechanisms of Antibody-Dependent Enhancement in Viral Infections. *Vaccines*, *11*(7), 1240. <https://doi.org/10.3390/vaccines11071240>
- Schaller, M., Gonser, L., Belge, K., Braunsdorf, C., Nordin, R., Scheu, A., & Borelli, C. (2017). Dual anti-inflammatory and anti-parasitic action of topical ivermectin 1% in papulopustular rosacea. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, *31*(11), 1907–1911. <https://doi.org/10.1111/jdv.14437>
- Secretaría de Salud. (2025). *PANORAMA EPIDEMIOLOGICO DE DENGUE SEMANA EPIDEMIOLOGICA 53*.
- Secretaría de Salud. (2026). *PANORAMA EPIDEMIOLOGICO DE DENGUE*.
- Segatori, V. I., Garona, J., Caligiuri, L. G., Bizzotto, J., Lavignolle, R., Toro, A., Sanchis, P., Spitzer, E., Krolewiecki, A., Gueron, G., & Alonso, D. F. (2021). Effect of Ivermectin and Atorvastatin on Nuclear Localization of Importin Alpha and Drug Target Expression Profiling in Host Cells from Nasopharyngeal Swabs of SARS-CoV-2- Positive Patients. *Viruses*, *13*(10), 2084. <https://doi.org/10.3390/v13102084>
- Sia, D. K., Mensah, K. B., Opoku-Agyemang, T., Folitse, R. D., & Darko, D. O. (2020). Mechanisms of ivermectin-induced wound healing. *BMC Veterinary Research*, *16*(1), 397. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02612-z>
- Singh, A., Roy, R., Singh, K., Sokhal, P., Afroj, S., Phadnis, S., Y.S, R. K., & Verma, B. (2025). Dengue Virus Life Cycle and Host Protein Interactions: Focus on RNA Binding Proteins and Therapeutic Advances. *Reviews in Medical Virology*, *35*(2). <https://doi.org/10.1002/rmv.70025>
- Sinha, S., Singh, K., Ravi Kumar, Y. S., Roy, R., Phadnis, S., Meena, V., Bhattacharyya, S., & Verma, B. (2024). Dengue virus pathogenesis and host molecular machineries. *Journal of Biomedical Science*, *31*(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s12929-024-01030-9>
- Sood, V., Puerta-Guardo, H., Malavige, G. N., Jeewandara, C., & Ogg, G. S. (2020). Dysfunctional Innate Immune Responses and Severe Dengue. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* | *Www.Frontiersin.Org*, *10*, 590004. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.590004>
- Srikiatkachorn, A., Mathew, A., & Rothman, A. L. (2017). Immune-mediated cytokine storm and its role in severe dengue. *Seminars in Immunopathology*, *39*(5), 563–574. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0625-1>
- Starvaggi, J., Previti, S., Zappalà, M., & Ettari, R. (2024). The Inhibition of NS2B/NS3 Protease: A New Therapeutic Opportunity to Treat Dengue and Zika Virus Infection. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 25, Number 8). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms25084376>
- Suputtamongkol, Y., Avirutnan, P., Mairiang, D., Angkasekwinai, N., Niwattayakul, K., Yamasmith, E., Saleh-arong, F. A., Songjaeng, A., Prommool, T., Tangthawornchaikul, N., Puttikhunt, C., Hunnangkul, S., Komoltri, C., Thammapalo, S., & Malasit, P. (2021). Ivermectin Accelerates Circulating Nonstructural Protein 1 (NS1) Clearance in Adult Dengue Patients: A Combined Phase 2/3 Randomized Double-blinded Placebo Controlled Trial. *Clinical Infectious Diseases*, *72*(10), e586–e593. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1332>

- Tay, M. Y. F., Fraser, J. E., Chan, W. K. K., Moreland, N. J., Rathore, A. P., Wang, C., Vasudevan, S. G., & Jans, D. A. (2013). Nuclear localization of dengue virus (DENV) 1–4 non-structural protein 5; protection against all 4 DENV serotypes by the inhibitor Ivermectin. *Antiviral Research*, 99(3), 301–306. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.06.002>
- Tayal, A., Kabra, S. K., & Lodha, R. (2023). Management of Dengue: An Updated Review. *Indian Journal of Pediatrics*, 90(2), 168–177. <https://doi.org/10.1007/s12098-022-04394-8>
- Tejo, A. M., Hamasaki, D. T., Menezes, L. M., & Ho, Y. L. (2024). Severe dengue in the intensive care unit. In *Journal of Intensive Medicine* (Vol. 4, Number 1, pp. 16–33). Chinese Medical Association. <https://doi.org/10.1016/j.jointm.2023.07.007>
- Teo, A., Tan, H. D., Loy, T., Chia, P. Y., & Chua, C. L. L. (2023). Understanding antibody-dependent enhancement in dengue: Are afucosylated IgG1s a concern? *PLOS Pathogens*, 19(3), e1011223. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011223>
- Tian, Y., Grifoni, A., Sette, A., & Weiskopf, D. (2019). Human T Cell Response to Dengue Virus Infection. *Frontiers in Immunology*, 10, 2125. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02125>
- Tian, Y., Sette, A., & Weiskopf, D. (2016). Cytotoxic CD4 T Cells: Differentiation, Function, and Application to Dengue Virus Infection. *Frontiers in Immunology*, 7, 531. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00531>
- Torres, S., Hernández, J. C., Giraldo, D., Arboleda, M., Rojas, M., Smit, J. M., & Urcuqui-Inchima, S. (2013). Differential Expression of Toll-like Receptors in Dendritic Cells of Patients with Dengue during Early and Late Acute Phases of the Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(2), e2060. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002060>
- Torres-Galicia, I., Cortés-Poza, D., & Becker, I. (2014). Dengue en México: incremento en la población juvenil durante la última década. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, 71(4), 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.bmhmx.2014.08.003>
- Tsai, T.-T., Chuang, Y.-J., Lin, Y.-S., Wan, S.-W., Chen, C.-L., & Lin, C.-F. (2013). An emerging role for the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in dengue virus infection. In *Journal of Biomedical Science* (Vol. 20). <https://doi.org/10.1186/1423-0127-20-40>
- Tuci, S., Mercorelli, B., & Loregian, A. (2025). Antiviral drug repurposing: different approaches and the case of antifungal drugs. *Pharmacology & Therapeutics*, 273, 108903. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2025.108903>
- Tuiskunen Bäck, A., & Lundkvist, Å. (2013). Dengue viruses – an overview. *Infection Ecology & Epidemiology*, 3(1), 19839. <https://doi.org/10.3402/iee.v3i0.19839>
- Ulgheri, F. M., Bernardes, B. G., & Lancellotti, M. (2025). Decoding Dengue: A Global Perspective, History, Role, and Challenges. *Pathogens*, 14(9), 954. <https://doi.org/10.3390/pathogens14090954>
- Upadhyay, S. R., & Ryan, C. J. (2022). Experimental reproducibility limits the correlation between mRNA and protein abundances in tumor proteomic profiles. *Cell Reports Methods*, 2(9), 100288. <https://doi.org/10.1016/J.CRMETH.2022.100288>
- Vargas-Hernández, O., Ventura-Gallegos, J. L., Ventura-Ayala, M. L., Torres, M., Zentella, A., & Pedraza-Sánchez, S. (2020). THP-1 cells increase TNF- α production upon LPS + soluble human IgG

- co-stimulation supporting evidence for TLR4 and Fcγ receptors crosstalk. *Cellular Immunology*, 355, 104146. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104146>
- Verhagen, L. M., & de Groot, R. (2014). Dengue in children. *Journal of Infection*, 69, S77–S86. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.020>
- Wagstaff, K. M., Sivakumaran, H., Heaton, S. M., Harrich, D., & Jans, D. A. (2012). Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. *Biochemical Journal*, 443(3), 851–856. <https://doi.org/10.1042/BJ20120150>
- Wald, M. E., Claus, C., Konrath, A., Nieper, H., Muluneh, A., Schmidt, V., Vahlenkamp, T. W., & Sieg, M. (2022). Ivermectin Inhibits the Replication of Usutu Virus In Vitro. *Viruses*, 14(8). <https://doi.org/10.3390/v14081641>
- Wan, S.-W., Wu-Hsieh, B. A., Lin, Y.-S., Chen, W.-Y., Huang, Y., & Anderson, R. (2018). The monocyte-macrophage-mast cell axis in dengue pathogenesis. *Journal of Biomedical Science*, 25(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0482-9>
- Wang, Y., Xie, X., & Shi, P. Y. (2022). Flavivirus NS4B protein: Structure, function, and antiviral discovery. In *Antiviral Research* (Vol. 207). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105423>
- World Health Organization. (2009). *Dengue guidelines, for diagnosis, treatment, prevention and control*.
- World Health Organization. (2012). *Handbook for clinical management of dengue*.
- Xie, X., Zou, J., Zhang, X., Zhou, Y., Routh, A. L., Kang, C., Popov, V. L., Chen, X., Wang, Q.-Y., Dong, H., & Shi, P.-Y. (2019). Dengue NS2A Protein Orchestrates Virus Assembly. *Cell Host & Microbe*, 26(5), 606–622.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.09.015>
- Yang, E., & Li, M. M. H. (2020). All About the RNA: Interferon-Stimulated Genes That Interfere With Viral RNA Processes. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.605024>
- Yang, S., Atkinson, S. C., Wang, C., Lee, A., Bogoyevitch, M. A., Borg, N. A., & Jans, D. A. (2020). The broad spectrum antiviral ivermectin targets the host nuclear transport importin α/β 1 heterodimer. *Antiviral Research*, 177, 104760. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104760>
- Yang, S. N. Y., Atkinson, S. C., Wang, C., Lee, A., Bogoyevitch, M. A., Borg, N. A., & Jans, D. A. (2020). The broad spectrum antiviral ivermectin targets the host nuclear transport importin α/β 1 heterodimer. *Antiviral Research*, 177, 104760. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2020.104760>
- Yaswanth, M., Dubey, A., Tufail, A., Nath, S., Janardhan, S., Maffia, M., Ragusa, A., & Mishra, V. K. (2025). Computational repurposing of drugs against dengue virus targeting NS5 and methyltransferase proteins. *Scientific Reports*, 15(1), 33906. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-09443-8>
- Zerfu, B., Kassa, T., & Legesse, M. (2023). Epidemiology, biology, pathogenesis, clinical manifestations, and diagnosis of dengue virus infection, and its trend in Ethiopia: a comprehensive literature review. In *Tropical Medicine and Health* (Vol. 51, Number 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s41182-023-00504-0>
- Zhang, X., Song, Y., Ci, X., An, N., Ju, Y., Li, H., Wang, X., Han, C., Cui, J., & Deng, X. (2008). Ivermectin inhibits LPS-induced production of inflammatory cytokines and improves LPS-induced

survival in mice. *Inflammation Research*, 57(11), 524–529. <https://doi.org/10.1007/s00011-008-8007-8>

Zuo, W., & Zhao, X. (2021). Natural killer cells play an important role in virus infection control: Antiviral mechanism, subset expansion and clinical application. *Clinical Immunology*, 227, 108727. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2021.108727>

15. ANEXOS

1. Efecto de la Ivermectina y Oseltamivir sobre la replicación de DENV-2 (RT-PCR punto final)

En la RT-PCR punto final para evaluar el efecto de IVM y OSV así como su combinación, se analizaron los productos correspondientes a la primera amplificación de la PCR anidada de Lanciotti, de acuerdo como se describe en el apartado metodológico. Este producto corresponde a 511 pb. Con ninguno de los tratamientos evaluados, ni de forma individual o combinada, se logró observar cambios en la intensidad de las bandas (Figura 29). En el análisis densitométrico realizado, incluso con algunos tratamientos da la impresión de que hay más cantidad de producto de PCR comparado con las células infectadas sin tratamiento (Vehículo) (Figura 30); sin embargo, hay demasiada variación entre las réplicas, y esto se ve reflejado en las barras de error.

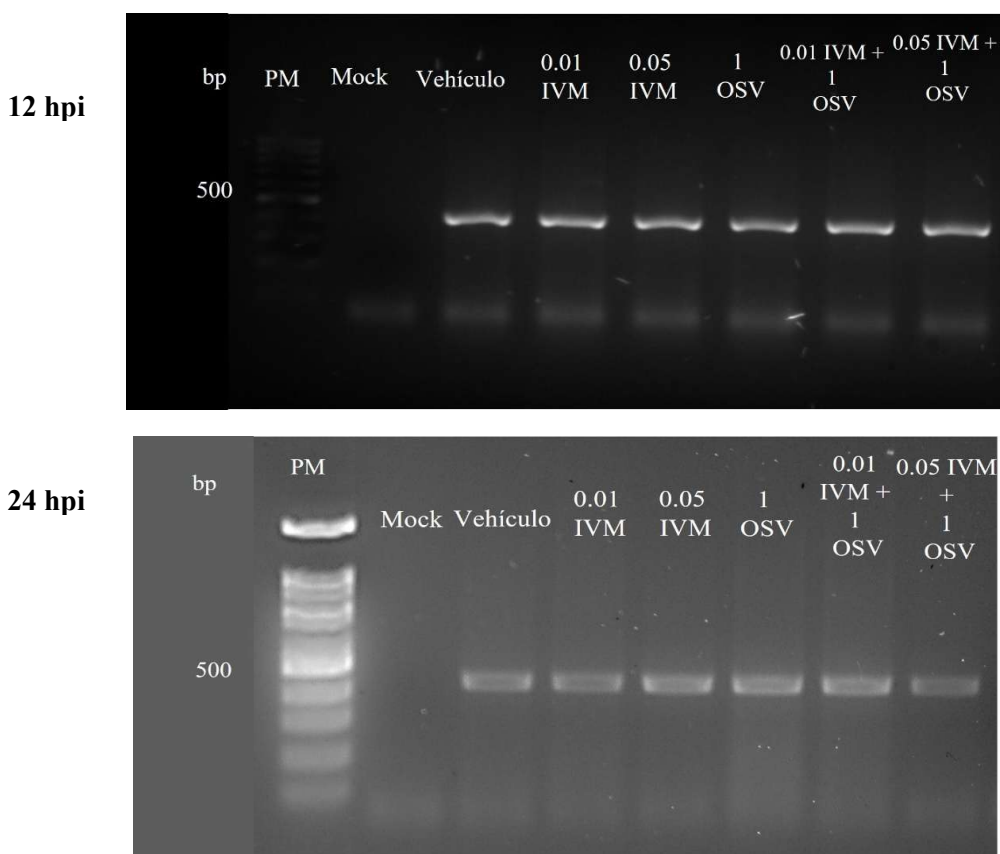


Figura 29. Productos de PCR de los ensayos a las 12 y 24 hpi, El producto mostrado corresponde al primer amplificado de la RT-PCR anidada (NS1 DENV-2), el cuál tiene un peso de 511 pb.

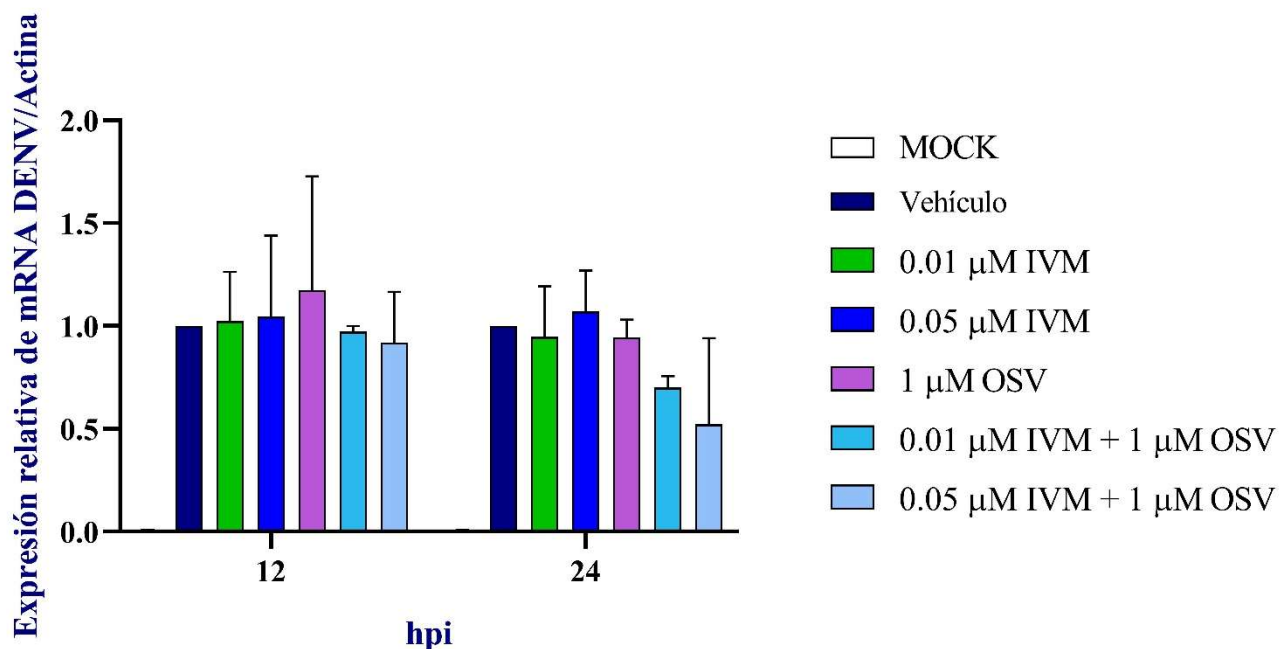


Figura 30. Análisis densitométrico del amplicón correspondiente a la proteína NS1 del DENV-2. El análisis se realizó mediante una normalización con el gen de β -actina.

2. Efecto de la Ivermectina y Oseltamivir sobre la expresión de TNF- α e IL-6 (RT-PCR punto final)

Particularmente, en el caso de TNF- α , a las 12 hpi, en los geles no se observaron cambios visibles en las bandas con ninguno de los tratamientos evaluados. En el caso del control de inflamación con LPS, a pesar de que se esperaba un aumento en la intensidad de la banda, tampoco se observó diferencia. A las 24 hpi se observó poco aumento en la intensidad de la banda en las células infectadas sin tratamiento (Figura 31). En el análisis densitométrico, se encontró que había una mayor cantidad de LPS comparado con las células sin infectar (MOCK), a las 12 hpi, sin embargo, en las células infectadas sin tratamiento (vehículo) no se observó una expresión mayor de TNF- α , como se esperaba puesto que ya está demostrado por otros investigadores y nuestro grupo de trabajo. Además, con los tratamientos de IVM y OSV de forma individual y combinada, se encontró una sobre expresión de la citocina en comparación con el vehículo a las 12 hpi (Figura 32). En el caso de las 24 hpi, las desviaciones eran muy grandes, y todos los tratamientos parecieron generar la misma respuesta.

En el caso de IL-6 se encontró en los geles poca expresión a las 12 hpi en todos los tratamientos evaluados, y por el contrario, no se observaron bandas visibles en el MOCK y el tratamiento con LPS. A las 24 hpi, se observó un incremento en la intensidad de la banda del vehículo, sin embargo, con LPS no se observó ninguna banda (Figura 33). En el análisis densitométrico se encontró que hubo una baja expresión de IL-6 a las 12 hpi, a las 24 hpi se tuvo una alta expresión de la citocina con el tratamiento de OSV, más no con LPS. Al igual que en los análisis densitométricos anteriores, las barras de error son muy grandes (Figura 34).

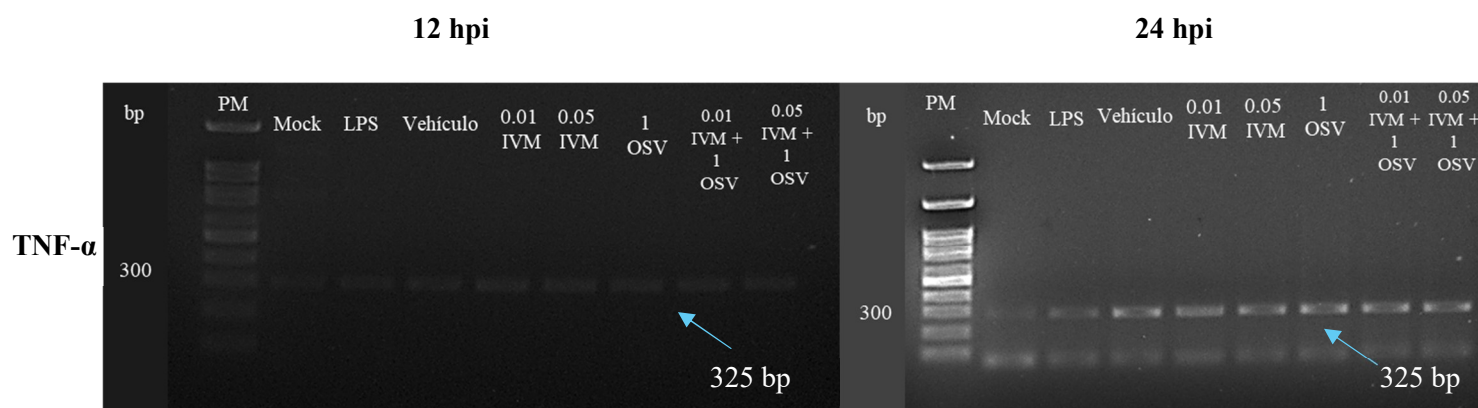


Figura 31. Productos de PCR correspondientes a TNF- α con un peso de 325 pb. Se muestran los ensayos de 12 a 24 hpi. La expresión de esta citocina es más notoria a las 24 hpi. Sin embargo, a simple vista no se observa un cambio evidente entre tratamientos.

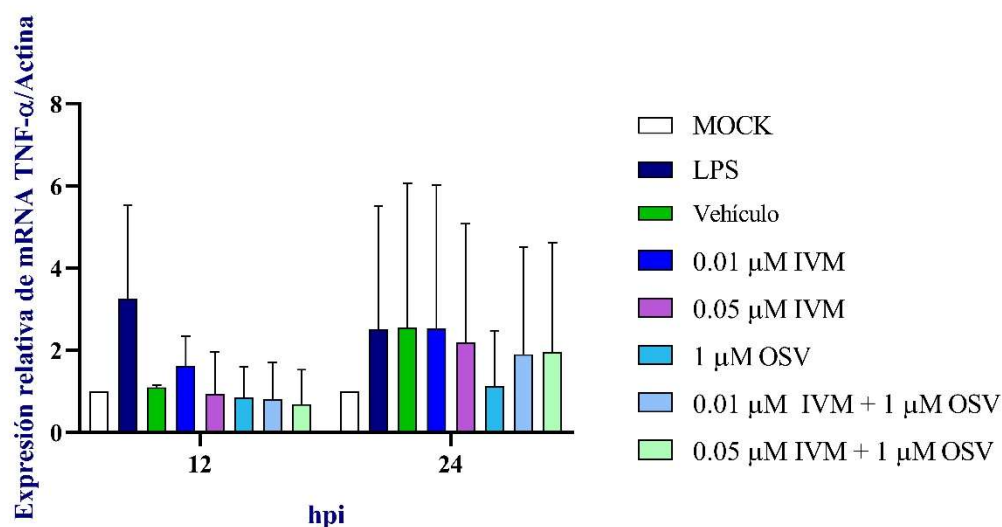


Figura 31. Análisis densitométrico de la expresión de TNF- α a las 12 y 24 hpi. A las 12 hpi, no se observó expresión de la citocina, comparado con el MOCK. A las 24 hpi hubo más expresión, pero las barras de error son muy grandes.

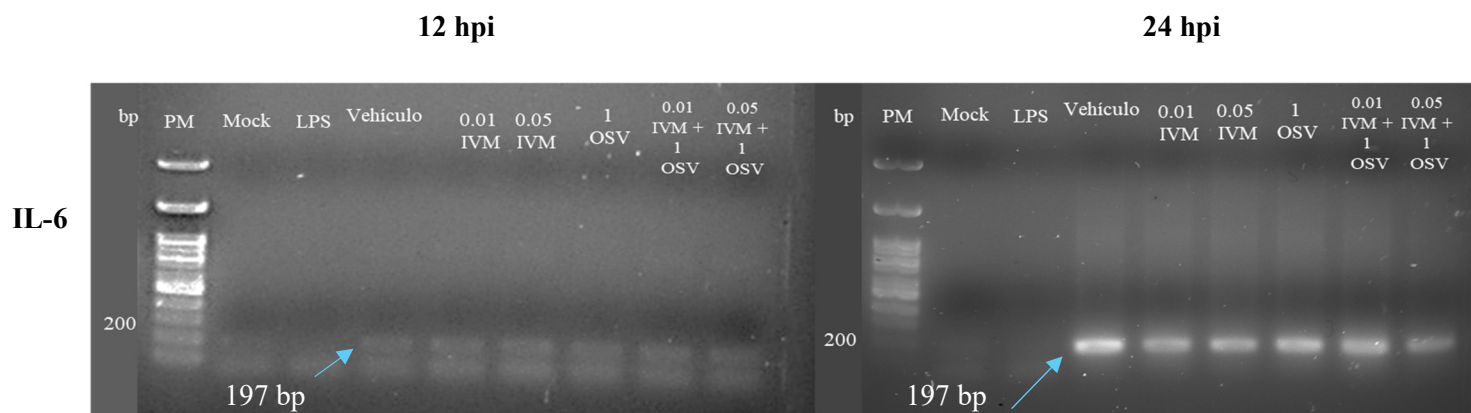


Figura 32. Productos de PCR correspondientes a IL-6 con un peso de 197 pb. Se muestran los ensayos de 12 a 24 hpi. La expresión de esta citocina es más notoria a las 24 hpi. Sin embargo, en ninguno de los tiempos evaluados se observó expresión del control inflamatorio con LPS.

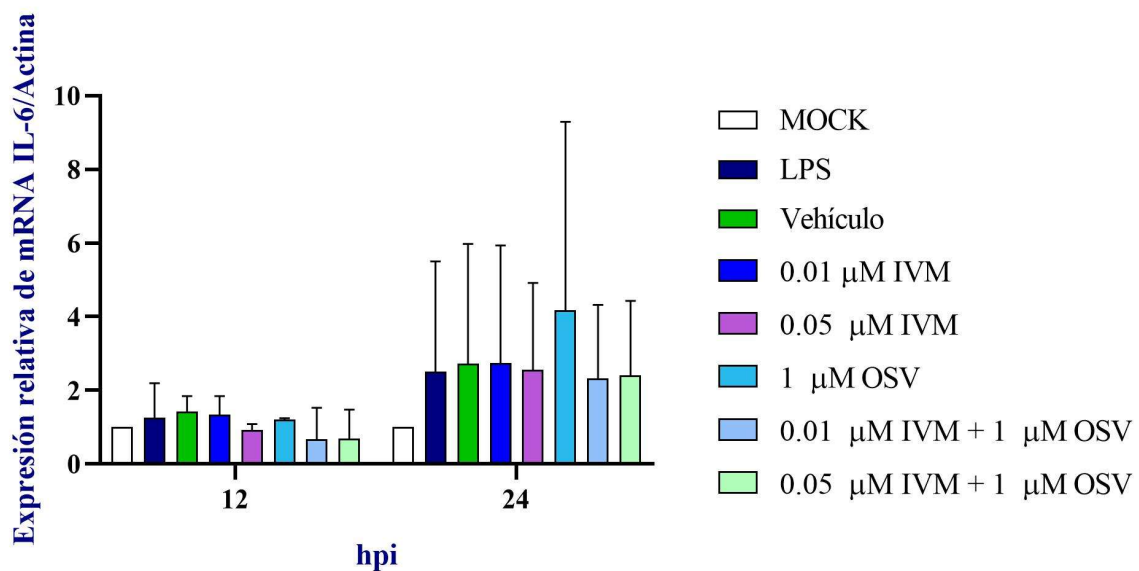


Figura 33. Análisis densitométrico de la expresión de IL-6 a las 12 y 24 hpi. A las 12 hpi, no se observó expresión de la citocina. A las 24 hpi hubo más expresión, sin embargo, no se encontró que fuera mayor con las células infectadas sin tratamiento (Vehículo).

3. Clonación del plásmido pJETL2/blunt con el inserto de la proteína C de DENV-2

Para poder realizar la curva estándar del DENV-2, se utilizó el plásmido pJETL2/blunt que codifica para la proteína C del virus. Sin embargo, como se tenía poca cantidad de plásmido y se tenían que estandarizar condiciones de PCR, se expandió en el laboratorio para tener la cantidad suficiente.

Para ello se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α por el método de choque térmico. Se mantuvieron las bacterias en hielo por 15 min. Luego de este tiempo, se añadieron 50 μ L de bacterias competentes y 10 μ L del plásmido en un tubo estéril. La mezcla se incubó por 10 minutos en hielo y posteriormente se incubó a 42° durante 90 s para después colocar en hielo por 5 min. La mezcla se traspasó a un tubo que contenía 1 mL de medio LB y se incubó a 37°C por 1 h a 200 rpm. Pasado el tiempo, se centrifugó por 10 min a 2000 rpm, se retiraron 800 μ L del medio y el pellet restante se resuspendió. Finalmente, la suspensión se sembró en placas de Petri con medio LB suplementado con ampicilina (100 ug/mL) y se incubó toda la noche a 37°C.

Las clonas bacterianas positivas a resistencia a ampicilina se colocaron en 2 mL de medio de cultivo LB con ampicilina, incubándose durante 16 horas. Posteriormente, este precultivo se escaló para colocar en un matraz con 200 mL de medio LB con ampicilina y se incubó durante 16 horas a 37 °C. Tras la incubación, el cultivo se colocó en tubos cónicos de centrifugación de 50 mL y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante, y se siguió el protocolo del kit Plasmid DNA Extraction Miniprep Kit de Bio Basic Inc (Thermofisher) para purificar el plásmido.

Una vez que se purificó el plásmido, este se cuantificó y se realizó una PCR punto final utilizando las cantidades de la Tabla 3 con los oligonucleótidos de la Tabla 6 y las condiciones de la Tabla 5 (Apartado metodológico) cambiando la temperatura de alineación a 60 °C. Esto con el objetivo de corroborar que se expresaba el gen de la proteína C del virus (151 bp) (Figura 34).

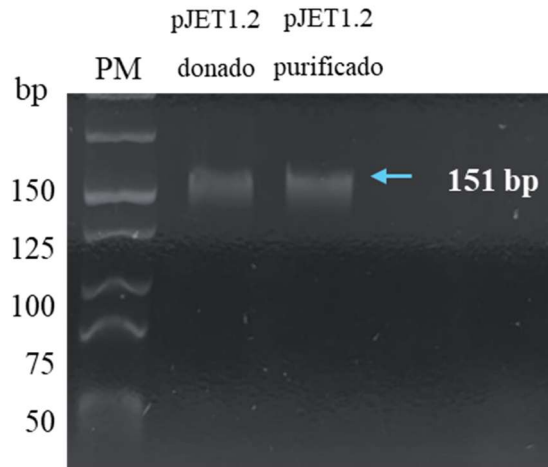


Figura 34. Amplicón correspondiente a la proteína C del DENV-2 con un peso de 151 bp. Ambos fueron expresados por el plásmido donado y el que se purificó mediante la transformación de *E. coli* DH5 α .

4. Amplificación de DENV-2 mediante qPCR

Una vez que se tenía suficiente cantidad del plásmido y que se corroboró la expresión de la proteína C de DENV-2, se realizó la curva estándar de acuerdo con lo descrito en el apartado metodológico. Para determinar que las condiciones de amplificación eran correctas se tomó en cuenta el comportamiento idóneo de la curva de amplificación (sigmoide) (Figura 35), y para asegurar que solo se estaba amplificando un solo producto, la curva melt, misma en la que se presentó solo un pico (Figura 36).

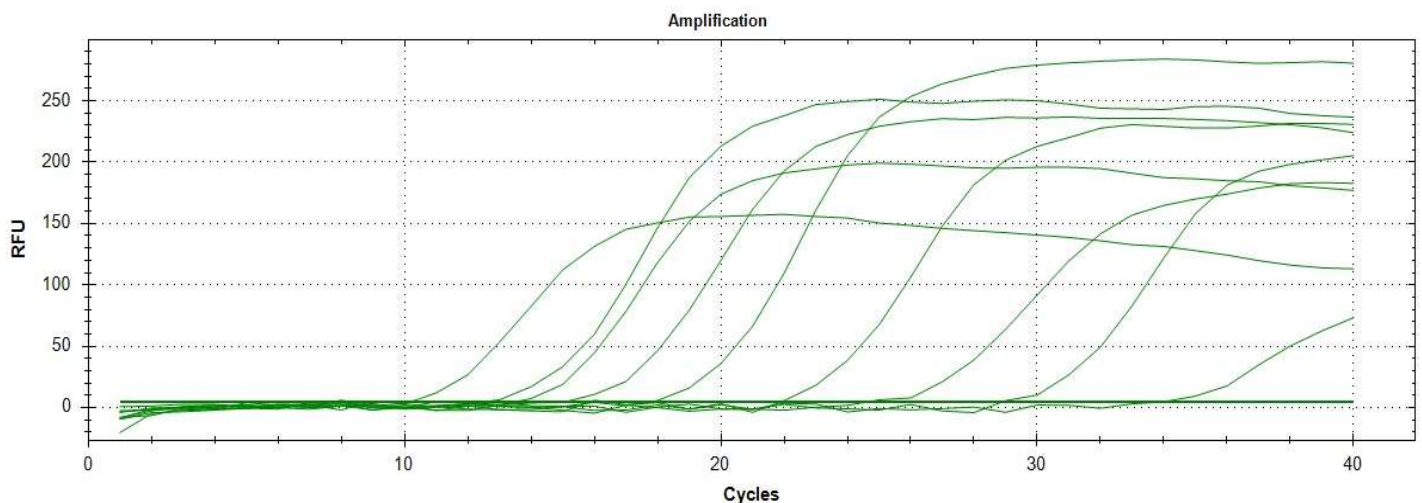


Figura 35. Curvas de amplificación de DENV-2. Se observa un comportamiento sigmoide.

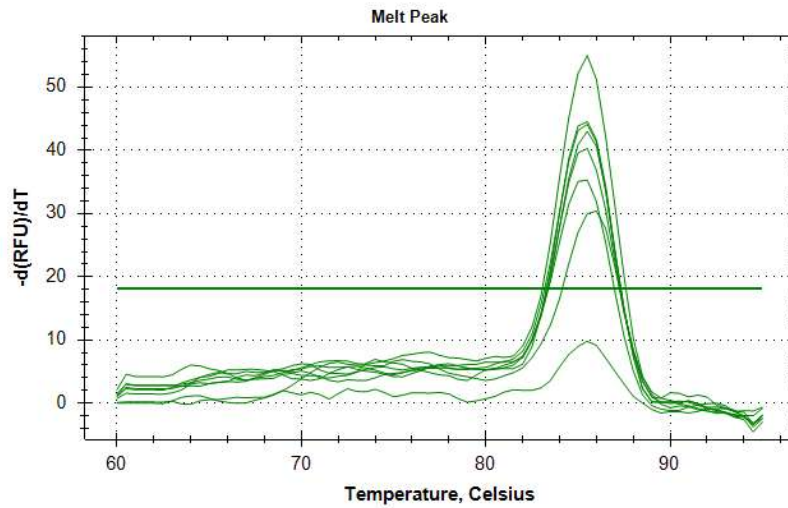


Figura 35. Curva Melt del producto amplificación. Se observa un solo pico, lo cual indica que se amplificó un solo producto.

De igual manera con las curvas de amplificación se realizó un análisis de regresión lineal para poder cuantificar con base en ella la carga viral en las muestras de interés (Figura 35). A partir de la curva también se cuantificó la eficiencia de la reacción, con un resultado de 103%. De acuerdo con la literatura, la eficiencia debe estar entre un 90 y 110 % para considerarse que fue una correcta amplificación.

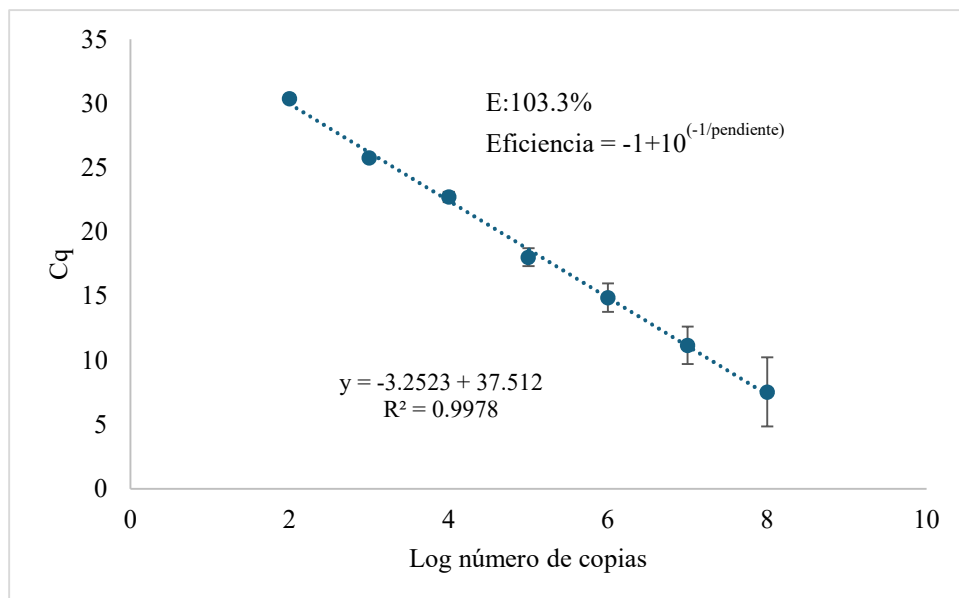


Figura 36. Curva estándar para la cuantificación de DENV-2.

5. Amplificación de TNF- α e IL-6 por qPCR.

Al igual que con la amplificación de DENV-2, para seleccionar las condiciones correctas de amplificación de las citocinas se tomó en cuenta el comportamiento sigmoide de la curva y la curva melt (Figuras 37 a 39).

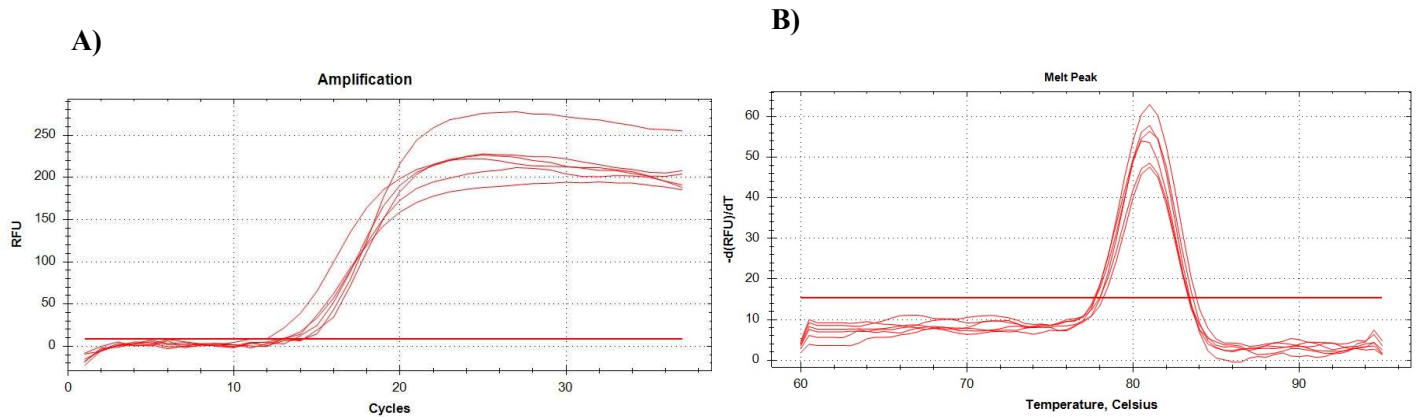


Figura 37. A) Curva de amplificación de GAPDH, se muestra un comportamiento sigmoide. B) Curva melt del producto amplificado, se muestra solo un pico, lo cual indica que se amplificó un solo producto.

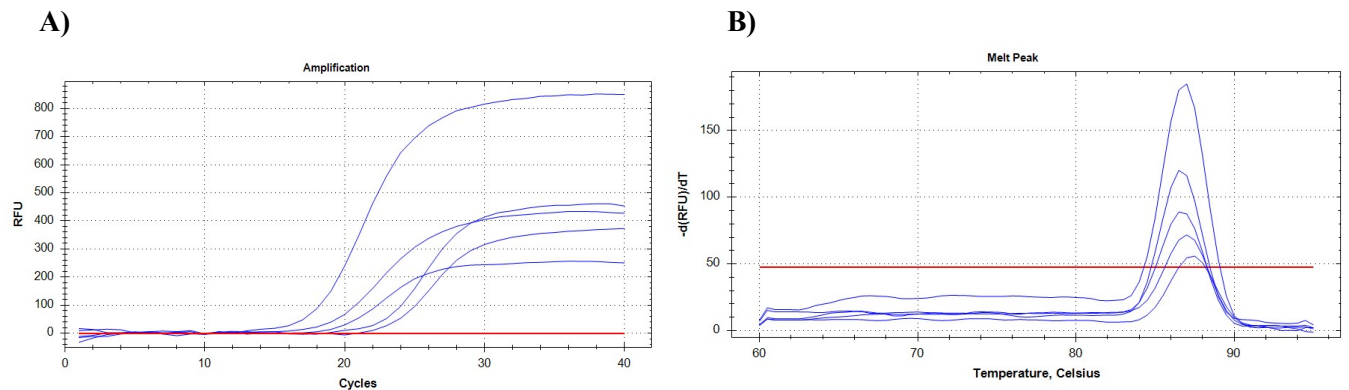


Figura 37. A) Curva de amplificación de TNF- α , se muestra un comportamiento sigmoide. B) Curva melt del producto amplificado, se muestra solo un pico, lo cual indica que se amplificó un solo producto.

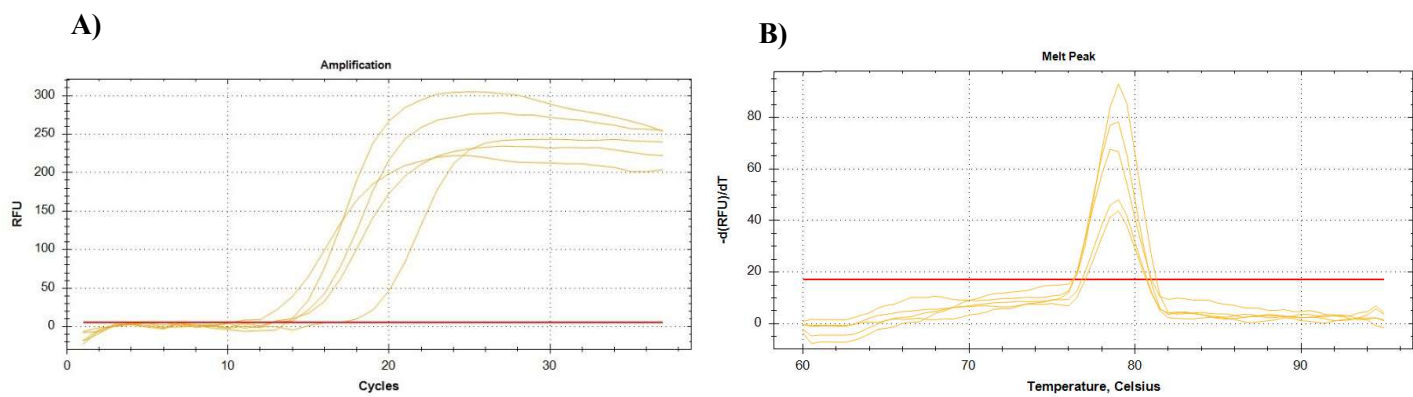


Figura 37. A) Curva de amplificación de IL-6, se muestra un comportamiento sigmoide. B) Curva melt del producto amplificado, se muestra solo un pico, lo cual indica que se amplificó un solo producto.

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Sujey Abigail Niño Herrera

Título de la tesis: *“Efecto de la combinación de la ivermectina y oseltamivir sobre la replicación viral y la producción de citocinas en células THP-1 infectadas con virus Dengue”*

Grado a obtener:

☒ **Maestría en Farmacia**

☐ **Doctorado en Farmacia**

Miembro del jurado: Dra. Leticia González Maya

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

☒ Si se aprueba tal como se presenta

☐ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-Firma

Firma del miembro del jurado

12/05/2026

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

LETICIA GONZALEZ MAYA | Fecha:2026-05-13 08:52:37 | FIRMANTE

MWxiQ7pJU+MsOn/4spFR9zRHrRSGjmRyVJuBMLhr+KpXgwriQoUYNcMaX6YrLoBTK9++IY+jlbZUw6hg7JK006MvSjZCwNn+RwvAvCyJAFu5NECnILstPHlh6EW+4Shd5uhQ19awTkfSLjRJVbVrvzbXsFjUxth9nT0SCxaXOsgd7IVjtok3SkZ70o7c0cpcQE82pAwQWOV2SBJHlmryMWcvmQExssLajEIU6XGLfbGKhnr2x5kGeLzMvhqmEBnAa634ssYGHSit enLRpD06QhNTEckR52S6u/hXE/CDLO+3tXCn8ft5XrbN1YW8MghYT57bDcRainiL8CCIF3Og==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



QSkp6N0EZ

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/lsvbk0GLkcXWIBimAzib8uv1XMCoiurM>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Sujei Abigail Niño Herrera

Título de la tesis: *“Efecto de la combinación de la ivermectina y oseltamivir sobre la replicación viral y la producción de citocinas en células THP-1 infectadas con virus Dengue”*

Grado a obtener:

☒ **Maestría en Farmacia**

☐ **Doctorado en Farmacia**

Miembro del jurado: Dr German Bernal Fernandez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

☒ Si se aprueba tal como se presenta

☐ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-Firma

Firma del miembro del jurado

12/05/2026

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

GERMAN BERNAL FERNANDEZ | Fecha:2026-05-13 10:29:12 | FIRMANTE

DKhzvVFXQrflLljdwI/sB7QEOYZPOWgk+nSlmHib9NSOL9iBHVXB01CYitej5aB6RwO4c3cOHkzCVXLYNhtFSbZnTaCkwlvGSXPz9mY5PV1hos0fIA2n8XcF1APhvfpSnxRswjf7e
cKR1caeGW0Z/adpsQy1I7d3I0v9ze58g3vZRviDHB7zBOb9CHyFIKyMkgHqTSp/EP+PZLt2/q8x8+68QB654mGuucimIq8vG39ZXU9AcH4PwcsHQxCznPiuE8LKki9dDHI7azELU
YrKOcVni62pWyiYphpU7g9J7DN1oqRor788TWLzSwsjl8ILwj/6JXN9YLOftvYyxbFnA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



1zALTvpJg

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ypPtCdOdUwI/N4dZ9I5SsqoxTBJ36eTIF>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Sujey Abigail Niño Herrera

Título de la tesis: *“Efecto de la combinación de la ivermectina y oseltamivir sobre la replicación viral y la producción de citocinas en células THP-1 infectadas con virus Dengue”*

Grado a obtener:

☒ **Maestría en Farmacia**

☐ **Doctorado en Farmacia**

Miembro del jurado: Rosa María del Ángel Núñez Cáceres

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

☒ Si se aprueba tal como se presenta

☐ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-Firma

Firma del miembro del jurado

15/05/2026
Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

ROSA MARÍA DEL ANGEL NÚÑEZ DE CÁCERES | Fecha:2026-05-16 11:56:06 | FIRMANTE

ROu+v+iRoijbnw8KNyMynNTPdl4dAgoeglkc1CODoVp2s1kf1suGqgUAhaBYT2y7oOGp/yRFhr3RZFr4j6+y3NUmJpV6bvpodg//p5NU4tc7bLBmaqFM8ac2Yyc6p1pSsa9LWTZxK
KTPYXwt8shLMuSmrbKiZ+VBs/bZc64uRp+pOM2lfbGwqjik+h0+fKWPm+dLoZ9X8YchEDmi8pP4oiLzVshCv3zbBD6T3ScF5jAjDKg156mM83G3MNOdXArS+6E9iBmATeCsJvO
BUos4JblsG/cC8YTO+kW1sXvzpiAYYSuq/PkfJFfSiFPFBj1LiqdgbzdQdL2lnoXOYhrCA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



4Cc7uEkxt

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/thUXKmq6yJyH90v33fRK43UKJPIHVcaj>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Sujei Abigail Niño Herrera

Título de la tesis: *“Efecto de la combinación de la ivermectina y oseltamivir sobre la replicación viral y la producción de citocinas en células THP-1 infectadas con virus Dengue”*

Grado a obtener:

☒ **Maestría en Farmacia**

☐ **Doctorado en Farmacia**

Miembro del jurado: Dra. Alma Nora Fierro González

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

☒ Si se aprueba tal como se presenta

☐ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-Firma

Firma del miembro del jurado

15/05/2026
Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

NORA ALMA FIERRO GONZÁLEZ | Fecha:2026-05-14 13:40:26 | FIRMANTE

QgNvrHNECBvg0Fg4V+AJDiKxQ69ewp543bZYNPAGOVMGh5PW7Ngz0dsWzaonZZ7BRFnZWdaGS5xSTPuoWYgVTVVEVwQcMgpfSNZ0a97enj7Nt80+1aI0GfK/EEM45bbRW
u7cwUpUPMf7dccRb07673TFmoxM73mTYNC/4Fs9qkA8/7VbLK6FRoulvfAb//XwQZqSx0hHd/zDzQiQ7o3pEi0PhWLtpLthdkXDzdkcSnNgbYjvpo9Yqt0AbKM5+mKqmXSXannr9
AZEZQMaSs8Hv1+EXc2H4jQ22QXcXJ+voN3MeFPvSk5d55GhpZT5HUzV30aT/YHO9cQ8aT/eZ5lnp8A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[ezNGj3yIA](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/laUNIIxCx4rdh6btIR5F8tCCGgwZUjUc>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Sujei Abigail Niño Herrera

Título de la tesis: *“Efecto de la combinación de la ivermectina y oseltamivir sobre la replicación viral y la producción de citocinas en células THP-1 infectadas con virus Dengue”*

Grado a obtener:

☒ **Maestría en Farmacia**

☐ **Doctorado en Farmacia**

Miembro del jurado: Dra. Judith González Christen

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

☒ Si se aprueba tal como se presenta

☐ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-Firma

Firma del miembro del jurado

12/05/2026

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

JUDITH GONZALEZ CHRISTEN | Fecha:2026-05-12 16:37:12 | FIRMANTE

JldXuULizFKy2JM72FwEB0Uhl54XSTsMK1NjDLA3CIhp30GrStOsFT5dKly+lw1Vf9pwGbTI8JN6fbatQS/qTw4UuOceNvMSSbLxZeUw6vJ55reqscG65SK/So8DSn9XeZhIVKgjODCEa/WtM1nCoYYGuJkFvC0hRgt1u8fQnciCfAMXGeq/Q5+yMp5E5IVNfH30lw4yqDJ7FXqS2v7FAEb4sZtDcUiMh8M9gXskoJUqbxTFL0eOTaxMivwz86Muvf95/ICgKIXmZLalMc+skGGHUx3iFb2Rjtmv9o93HfoXLRKoNoDfLK8KZR3RFSjqwmROvm/ECuhCWgMFoPskA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



0XolcdRg5

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/06EQhmcfQOA9SkXHSUjJYFXEKjLGVjv>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029