

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
POSTGRADO EN MEDICINA VETERINARIA
DOCTORADO EN CIENCIAS**



**ANÁLISIS DEL PROCESO DE TRADUCCIÓN *IN VITRO* DE CEPAS
DEL VIRUS DENGUE E INHIBICIÓN DE ESTE MECANISMO
MEDIANTE EL USO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO**

Licenciada Daría Elena Camacho García

Maracay, Febrero 2016

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
POSTGRADO EN MEDICINA VETERINARIA
DOCTORADO EN CIENCIAS**



**ANÁLISIS DEL PROCESO DE TRADUCCIÓN *IN VITRO* DE CEPAS
DEL VIRUS DENGUE E INHIBICIÓN DE ESTE MECANISMO
MEDIANTE EL USO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO**

Licenciada Daría Elena Camacho García

Tesis Doctoral presentada como requisito parcial para optar al título de
Doctor en Ciencias

Tutora: Dra. Elizabeth Ferrer Jesús

Maracay, Febrero 2016

DEDICATORIA

A mi amado padre Darío, hoy ausente, pero vigente en sus enseñanzas.

A mi amada madre Carmen Elena, siempre presente en cada uno de mis sueños.

A mi amado hermano Darío, presente en la distancia y orgulloso de mis logros.

A mi amada ahijada María Clarence, por su amor incondicional.

A mis amados hijos Daniel André y Diego Alessandro, los magos de mi vida, por quienes sigo siendo caminante, por quienes sigo teniendo esperanza.

A mis amados José Gregorio, Gabriel Gilberto y Sofía Katherine, complementos de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Luego de recorrer este largo, a veces tortuoso, pero enriquecedor camino queda el recuerdo del encuentro con muchos seres, cada uno especial a su manera. De estos, unos ya no están, otros aún persisten, y tienen en común un valor incalculable, por lo que me permito agradecer cada una de las vivencias que compartí con ellos. Si alguien queda excluido en letras, tenga por seguro que es por un olvido involuntario y solo ruego a Dios, que mi obra hacia ellas demuestre lo contrario, más allá de lo plasmado en un papel.

Al creador universal, al Dios que vive en el corazón de los que pretendemos hacer esta estancia absolutamente enriquecedora.

A mi familia, por soportar con extremo amor y paciencia mis ausencias.

A mi tutora, Elizabeth Ferrer por ser fuente de inspiración para mí, por alentarme y por haberme regalado día a día de forma incondicional, toda su maravilla personal e intelectual.

Al profesor Francisco Triana, quien a pesar de su ausencia, guió de algún modo, cada uno de los pasos en la ejecución de este trabajo. No está ausente, quien deja su vida plasmada en obras que van más allá de lo tangible.

A la profesora Ledia Triana, quien de forma incondicional con ahínco, entereza, paciencia e innumerables virtudes brindó su apoyo en la ejecución de este trabajo.

Al personal del laboratorio de Bioquímica de Ácidos Nucleicos y Síntesis de Proteínas (BIOMED-UC). De forma especial a la MSc. Ana Celia Ferreras, quien dedicó gran parte de su tiempo y conocimientos en brindar todo el apoyo que fuera necesario, para llevar a cabo gran parte de los ensayos.

A Guillermo Comach, quien fuera el impulsor de mi incursión en el mundo científico y de quien aprendiera que quien persevera con entusiasmo y dedicación, solo está llamado al logro de los objetivos.

Al personal del Laboratorio Regional de Diagnóstico e Investigación del Dengue y otras Enfermedades Virales.

A Eduardo Guerra, quien me brindó siempre y oportunamente su apoyo incondicional.

A Jesús Reyes, quien estuvo presente en momentos de dificultad brindándome su mano amiga y solidaria.

A todo el personal del BIOMED, con quienes me une más que un lazo profesional, un lazo personal. Por ser partícipes de una u otra forma de mis sueños.

A mis compañeras de asignatura del Departamento Clínico Integral, Escuela de Bioanálisis, Universidad de Carabobo, siempre comprensivas. Especialmente, a la profesora Glenda Rojas.

A Yasmín Rubio-Palis, la amiga siempre impulsora de metas.

A la Dra. Tatiana Pérez, quien siempre estuvo presta a otorgarme la ayuda necesaria para el cumplimiento de la meta.

Al personal docente y administrativo del postgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UCV, particularmente a las profesoras Adriana Méndez y Luz Elena Camargo. A Yajaira, Yenilse y Dulce.

A las instituciones que hicieron posible el cumplimiento del programa: Universidad de Carabobo y Universidad Central de Venezuela.

Al Ministerio del Poder Popular para Ciencia y Tecnología, en el marco del programa Misión Ciencia, al hacer posible el financiamiento de este trabajo bajo el código del proyecto N°20009000434.

“El agradecimiento es sanador, te enseña lo positivo y bueno de la vida, es una terapia extraordinaria. Quien se centra en lo malo pierde fuerzas y se deprime, pero ver lo bueno y dar gracias te hace más feliz».

Santiago Martin (Sacerdote madrileño, católico).

RESUMEN

El DENV es un flavivirus cuyo genoma es un ARN de aproximadamente 10700 nucleótidos, consituída en sus extremos 5' y 3' terminal por regiones no traducibles (UTR). La funcionalidad de estos extremos se ha asociado con eventos de supervivencia viral, tales como la replicación y síntesis de proteínas. Este último mecanismo ha sido escasamente dilucidado. El objetivo del presente estudio fue analizar el proceso traduccional *in vitro* de cepas de los serotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4, y su inhibición con oligonucleótidos antisentido. Para lograrlo, se obtuvieron los ARN's de los DENV que fueron incorporados a un sistema de traducción *in vitro* obtenido de placenta humana haciendo uso de la fracción postmitocondrial (S30) como fuente de ribosomas y factores solubles. Se observaron diferentes porcentajes de estimulación del sistema en relación al control, específicamente DENV-1 (16007) ~45%, DENV-3 (H87) ~30%, DENV-4 (H-241) ~60%, mientras que las cepas de DENV-2 -independiente del genotipo viral- estimularon el sistema en ~50%. Verificada la capacidad de estimulación traduccional los ARNv, se realizaron ensayos de inhibición de este mecanismo haciendo uso de moléculas antisentido dirigidas contra las estructuras SLA, SLB, CS1 del genoma de DENV-2. Los resultados mostraron un efecto inhibitorio, exceptuando el dirigido contra la secuencia ubicada entre los nucleótidos 119 y 141 correspondiente a la cápside viral. Posteriormente, se analizó el efecto inhibitorio de una molécula dirigida contra una secuencia ubicada entre los nucleótidos 80 y 99, previo al codón de inicio AUG, incluyéndolo. Los valores de inhibición fueron 47, 38 y 100%, para los ARNv de DENV-1, DENV-3 y DENV-4; respectivamente. Adicionalmente, con el fin de obtener transcritos de DENV-2 se amplificaron mediante RT-PCR los fragmentos 5'UTR-C para clonarlos en el plásmido comercial pGEM®-T Easy justo en la secuencia ubicada luego del promotor T7 para obtener -mediante reacciones de transcripción *in vitro* con T7 ARN polimerasa- transcritos de 320 pb. Posteriormente, haciendo uso de los plásmidos recombinantes se amplificaron productos de 345 pb que abarcaban la región promotora T7 y 5'UTR-C, estos fueron sometidos a transcripción *in vitro* en condiciones similares lo que dio lugar a la obtención de los transcritos. Los resultados demostraron eficiencia traduccional por parte de genomas de DENV, sugiriendo un proceso canónico para la síntesis de proteínas que pudo ser inhibido con moléculas antisentido. Asimismo, se obtuvieron transcritos de la región iniciadora 5'UTR-C susceptibles a ser analizados en ensayos posteriores en el sistema traduccional mencionado, lo que permitiría comparar estrategias de traducción *in vitro*. El bloqueo observado con las moléculas antisentido sugiere su uso para dilucidar aspectos relacionados con el mecanismo de síntesis de proteínas, así como para el diseño y puesta en marcha de estrategias antivirales contra DENV y cualquier otro virus de tipo ARN.

Palabras clave: Dengue, traducción *in vitro*, transcripción *in vitro*, oligonucleótidos antisentido

ABSTRACT

The DENV is a flavivirus whose genome is an RNA of approximately 10,700 nucleotides, with at their ends 5' and 3' non-translatable region (UTR). The functionality of these extremes has been associated with events of viral survival, such as replication and protein synthesis. The latter mechanism has been poorly elucidated. The aim of this study was to analyze the translational process *in vitro* of strains of DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4 serotypes, and its inhibition with antisense oligonucleotides. To achieve this, the DENV RNAs were obtained and incorporated into an *in vitro* translation system obtained from human placenta using the post-mitochondrial fraction (S30) as a source of ribosomes and soluble factors. Several percentages of system stimulation were observed regarding to the control, specifically DENV-1 (16007) ~ 45%, DENV-3 (H87) ~ 30%, DENV-4 (H-241) ~ 60%. While, DENV-2 strains (independent of the genotype) stimulated the system by ~ 50%. After of determine the ability of the vRNA in translational stimulation, inhibition assays of this mechanism were performed using antisense molecules against SLA, SLB, CS1 structures of DENV-2 genome. The results showed an inhibitory effect, except against the sequence located between nucleotides 119 and 141 corresponding to the viral capsid. Subsequently, it was analyzed the inhibitory effect of a molecule against a sequence located between nucleotides 80 and 99, prior to the AUG start codon, and including it. The inhibitory values were 47, 38 and 100%, for vRNA DENV-1, DENV-3 and DENV-4; respectively. Additionally, in order to obtain DENV-2 transcripts, 5'UTR-C fragments were amplified by RT-PCR and cloned in the pGEM®-T Easy commercial plasmid, located downstream the sequence of the T7 promoter, for obtained transcripts of 320 bp by *in vitro* transcription with T7 RNA polymerase. Subsequently, using recombinant plasmids, products of 345 bp were amplified spanning the T7 promoter region and 5'UTR-C. They were subjected to *in vitro* transcription under similar conditions, which resulted in obtaining transcripts. The results showed translational efficiency by DENV genomes, suggesting a canonical process for the synthesis of proteins that could be inhibited with antisense molecules. Likewise, were obtained transcripts for initiator region 5'UTR-C susceptible to be analyzed in subsequent tests in the translational system mentioned, which would compare *in vitro* translation strategies. Blocking observed with antisense molecules suggests its use to elucidate aspects of the mechanism of protein synthesis as well as for the design and implementation of antiviral strategies against DENV and other RNA viruses.

Keywords: Dengue, *in vitro* translation, *in vitro* transcription, antisense oligonucleotides.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
PRELIMINARES	
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	5
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	
2.1.- Antecedentes	7
2.2.- Bases teóricas	11
2.2.1. Características generales del virus Dengue	11
2.2.2. Organización del genoma	11
2.2.2.1. Regiones no traducibles (UTR) del genoma viral	13
2.2.3. Infección viral	15
2.2.3.1. Anclaje y adsorción viral	16
2.2.3.2. Replicación del genoma viral	18
2.2.3.3. Mecanismo de traducción del genoma viral	20
2.2.3.3.1. Componentes principales de los mecanismos de traducción	20
2.2.3.3.2. Mecanismo traduccional en células eucariotas	23
2.2.3.3.2.1. Iniciación de la traducción	23
2.2.3.3.2.2. Elongación y terminación de la traducción	30
2.2.3.5. Ensamblaje viral	31
2.2.4. Proteínas virales	33
2.2.4.1. Proteínas estructurales	33
2.2.4.2. Proteínas no estructurales	34

2.2.5. Ciclo de transmisión de los DENV	37
2.2.6. Patogénesis de las infecciones por DENV	38
2.2.7. Manifestaciones clínicas de la enfermedad	40
2.2.8. Diagnóstico de laboratorio de infecciones por DENV	41

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

3.1.-Tipo de Investigación	45
3.2.- Material biológico	45
3.2.1.- Cepas virales	45
3.2.2.- Plásmido pGEM®-T Easy	46
3.2.3.- Cepa bacteriana	47
3.2.4.- Placenta humana	47
3.3.-Análisis de secuencias nucleotídicas correspondientes al genoma total y parcial de cepas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4	48
3.3.1.- Análisis filogenético de secuencias completas de los genomas de cepas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4	48
3.3.2.- Alineamientos de las secuencias nucleotídicas correspondientes la región 5'UTR de los diferentes serotipos virales	49
3.4.- Obtención de ARN viral	50
3.4.1.- Cultivos virales	50
3.4.2.- Obtención del ARN viral genómico	52
3.5.- Obtención del fragmento 5'UTR-C de ADNc del ARN viral por amplificación de la región del genoma viral correspondiente a la secuencia 5' no traducible y parte del gen de la Cápside (5'UTR-C, <i>Untranslated Region-Capside</i>)	52
3.5.1.- Extracción del ARN viral	53
3.5.2.- Diseño de oligonucleótidos	53
3.5.3.- Transcripción Reversa acoplada a Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR, <i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i>)	54
3.5.4.- Purificación de los productos de RT-PCR	55
3.6.-Análisis de restricción enzimática de los productos 5'UTR-C obtenidos mediante RT-PCR	56

3.7.- Ensayos de Traducción <i>in vitro</i>	57
3.7.1.- Obtención del sistema traduccional libre de células de placenta humana	57
3.7.2.- Traducción de los ARN virales en el sistema libre de células de placenta humana	58
3.7.2.1.- Ensayo de síntesis de proteínas con moléculas de ARNv de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4	58
3.7.2.2.- Ensayo de síntesis de proteínas con los diferentes ARNv en presencia de oligonucleótidos antisentido	59
3.8.- Clonamiento de la región inicial del genoma (5'UTR-C) de las cepas de DENV-2 en el plásmido pGEM®-T Easy	60
3.8.1.- Acondicionamiento de los productos de RT-PCR (5'UTR-C) de DENV-2	60
3.8.2.- Preparación del vector de clonamiento (plásmido pGEM®-T Easy).	61
3.8.3.- Ligación del producto de RT-PCR purificado y el plásmido pGEM®-T Easy	62
3.8.4.- Preparación de las células competentes	63
3.8.5.- Transformación de las células <i>Escherichia coli</i> XL1-Blue competentes	64
3.8.6.- Identificación de los clones recombinantes	64
3.8.7.Extracción de ADNp pGEM®-T Easy recombinante con el inserto de DENV-2 (5'UTR-C)	65
3.8.8.- Comprobación de la presencia del inserto de DENV-2 en el ADNp	66
3.8.9.- Maxipreparación de ADNp	67
3.9.- Transcripción <i>in vitro</i> a partir de los plásmidos recombinantes pGEM®-T Easy-5'UTR-C DENV-2	68
3.9.1.- Linearización de los clones recombinantes (pGEM®-T Easy-5'UTR-C DENV-2)	68
3.9.2.- Estandarización de las condiciones de los ensayos de transcripción <i>in vitro</i> a partir de los plásmidos recombinantes pGEM®-T Easy-5'UTR-C DENV-2 linealizados	69
3.10.- Obtención de fragmentos de ADN por	

amplificación de la región promotora de T7 y la secuencia 5' no traducible y parte del gen de la Cápside (5'UTR-C, <i>Untranslated Region-Capside</i>) a partir de plásmidos pGEM®-T Easy clonados con las secuencias 5'UTR-C de cepas de DENV-2	70
3.11.- Transcripción <i>in vitro</i> a partir de los productos de amplificación de la región promotora T7 y 5'UTR-C mediante PCR	70
3.12.- Técnicas empleadas para evaluar las muestras y productos de reacción	71
3.12.1.- Determinación de fosfato liberado en la reacción de transcripción	71
3.12.2.- Concentración y pureza de los ácidos nucleicos	71
3.12.3.- Determinación de la concentración y pureza del ARN	71
3.12.4.- Determinación de la concentración y pureza del ADN	72
3.12.5.- Transcripción Reversa acoplada a Reacción en Cadena de la Polimerasa de las regiones 5'UTR-C, C/prM-M y NS5 de los genomas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4	72
3.12.6.- Electroforesis en geles de Agarosa y poliacrilamida	73
3.12.6.1.- Electroforesis en geles de agarosa para ADN	73
3.12.6.2.- Electroforesis en geles de poliacrilamida	74
3.12.6.3.- Electroforesis en geles de poliacrilamida de los productos de transcripción <i>in vitro</i>	75
3.12.6.4.- Tinción de geles de poliacrilamida	75
3.12.6.4.1.- Tinción con azul de toluidina (0,1%)	75
3.12.6.4.2.- Tinción con Nitrato de Plata	75

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1.- Análisis filogenético de secuencias completas de los genomas de cepas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4	77
4.1.1.- Análisis de las secuencias nucleotídicas del fragmento 5'UTR de DENV.	78
4.2.- Amplificación de la región de iniciación de	

síntesis de proteínas (5'UTR-C) del genoma viral de cepas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4.	84
4.3. Especificidad de la RT-PCR para la amplificación de la región de iniciación de síntesis de proteínas (5'UTR-C) del genoma viral de cepas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 y sensibilidad analítica para la obtención del fragmento 5'UTR-C de DENV-2.	90
4.4. Análisis de restricción enzimática de los productos 5'UTR-C obtenidos mediante RT-PCR cepas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4.	92
4.5.- Traducción dirigida por los ARNv naturales de cepas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 en un sistema libre de células de placenta humana.	94
4.5.1.- Obtención del ARN viral para la traducción <i>in vitro</i>	94
4.5.2.- Actividad del sistema de traducción S-30 dirigida por ARNv natural.	97
4.5.3.- Ensayo de síntesis de proteínas en presencia de oligonucleótidos antisentido	105
4.5.3.1. Síntesis de proteínas con el ARNv de la cepa de DENV-2 (16681) en presencia de oligonucleótidos antisentido	105
4.5.3.2. Síntesis de proteínas con los ARNv de las cepas de DENV-1 (16007), DENV-2 (16681), DENV-3 (H-87) y DENV-4 (H-241) en presencia de un oligonucleótido antisentido (OAs2)	109
4.6.- Clonamiento de la región inicial del genoma de cepas de DENV-2 en el plásmido pGEM®-T Easy	110
4.6.1.- Acondicionamiento de los productos de RT-PCR (5'UTR-C) de DENV-2	111
4.6.2.- Preparación del vector de clonamiento (plásmido pGEM®-T Easy)	113
4.6.3.- Construcción del plásmido recombinante luego de la ligación del producto de RT-PCR purificado y el plásmido pGEM®-T Easy y transformación de células <i>Escherichia coli</i> XL1-Blue competentes	114
4.6.4.- Identificación de los clones recombinantes	115
4.7.- Ensayos de transcripción <i>in vitro</i>	118

4.7.1.- Transcripción <i>in vitro</i> a partir de los plásmidos recombinantes pGEM®-T Easy-5'UTR-C DENV-2 linealizados	118
4.7.2.- Transcripción <i>in vitro</i> a partir de los productos de amplificación de la región promotora T7 y 5'UTR-C mediante PCR	135
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	
5.1. Análisis de las secuencias nucleotídicas de los genomas completos de las cepas de DENV	137
5.2. Optimización de una RT-PCR para la amplificación de la región de iniciación de síntesis de proteínas (5'UTR-C) del genoma viral de cepas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4	139
5.3. Variabilidad genómica de los fragmentos 5'UTR-C obtenidos mediante RT-PCR a partir de genomas de cepas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4	140
5.4. Transcripción <i>in vitro</i> a partir de los plásmidos recombinantes pGEM®-T Easy-5'UTR-C DENV-2 y a partir de los productos de amplificación de la región promotora T7 y 5'UTR-C mediante PCR	142
5.5. Traducción dirigida por los ARNv naturales de cepas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 en un sistema libre de células de placenta humana	145
5.6. Traducción dirigida por los ARNv naturales de cepas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 en presencia de oligonucleótidos antisentido	155
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	160
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES	161
CAPÍTULO VIII:REFERENCIAS	162
ANEXOS	179

ÍNDICE DE TABLAS

Nº		Pág.
1	Cepas de DENV seleccionadas para el estudio	46
2	Características bioquímicas de los oligonucleótidos diseñados para inhibir el proceso de traducción de DENV-2	60
3	Secuencias de los cebadores directos y reversos diseñados mediante el programa Gene Runner <i>Versión 3.05.</i> para la amplificación de los fragmentos 5'UTR-C de los diferentes serotipos de DENV	85
4	Condiciones óptimas establecidas para los ensayos de amplificación de la región 5'UTR-C de cepas de los diferentes serotipos de DENV mediante RT-PCR	89
5	Sitio de restricción enzimática y tamaño de los fragmentos obtenidos a partir de las secuencias correspondientes a los fragmentos 5'UTR-C de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 mediante el programa bioinformático Gene Runner <i>Versión 3.05.</i> (Spruyt y Buquicchio, 1994)	93
6	Cantidad y porcentaje de los ARN en los sedimentos y sobrenadantes obtenidos de la ultracentrifugación a 16000 rpm en rotor SW-28 (Beckman Coulter Optima™ L-90K) de los cultivos celulares de cepas de DENV	95
7	Condiciones óptimas para la ejecución de los ensayos de transcripción in vitro, luego de la estandarización de cada uno de los reactantes	129

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº		Pág.
1	Representación esquemática de la organización del genoma de DENV. Las regiones 5' y 3'UTR y el marco abierto de lectura indicando las proteínas estructurales y no estructurales. La localización de las secuencias complementarias 5'-3'CS y 5'-3'UAR se señalan por líneas solidas y punteadas, respectivamente. Fuente: Gebhard <i>et al.</i> (2011).	12
2	Estructura esquemática de la predicción de la estructura secundaria de la región 5' terminal del genoma de DENV. Se indican los elementos localizados en 5' (SLA, SLB, Oligo U, AUG, cHP y 5'CS). Fuente: Gebhard <i>et al.</i> (2011).	14
3	Esquema de la estructura de la predicción de la estructura secundaria de la región 3' terminal del genoma de DENV. Se evidencian tres dominios: I (región variable), II (DB1 y DB2), y III (secuencias conservadas CS1 y 3'SL). Fuente: Gebhard <i>et al.</i> (2011).	15
4	Ciclo de vida de los flavivirus. A. Los virus se unen a la superficie celular a través de receptores y son internalizados a través de endocitosis B. En el endosoma, las glicoproteínas virales median la fusión entre el virus y la membrana celular permitiendo la liberación del citoplasma C. El ARN viral es traducido y la poliproteína es procesada por proteasas virales y celulares D. Las proteínas no estructurales replican el genoma viral E. Ensamblaje viral en la membrana del RE. F. Transporte de las partículas virales inmaduras a través del aparato de Golgi G. Liberación de las partículas maduras en el citoplasma. Fuente: Perera <i>et al.</i> (2008).	16
5	Representación de un ensayo de iniciación <i>in vitro</i> de la síntesis de ARN viral. A: Formación del complejo ARN-ARN entre los primeros 160 nt (5'UTR-5'CS) y 3'UTR lo que permite que la RdRp inicie la síntesis de ARN. B: Representación esquemática del rol del espaciador oligo U en la síntesis de ARN. El oligo U permite que la RdRp inicie la síntesis a partir de 3'UTR. En contraste, una molécula de ARN con delección del oligoU es incapaz de promover la síntesis de ARN. Fuente: Filomatori <i>et al.</i> (2011).	19
6	Iniciación de la traducción dependiente de CAP o canónica. Se muestran los diferentes pasos (1→4) de la iniciación y los	

	factores descritos que intervienen desde la disociación del ribosoma hasta la formación del complejo de iniciación 80S. (Fuente: Lodish <i>et al.</i> , 2005).	26
7	Fase de elongación y terminación de la síntesis de proteínas. A: Elongación. Una vez formado el complejo de iniciación 80S, el aminoacil-ARNt (aa-ARNt) se une al sitio A del ribosoma y luego de la formación del enlace peptídico, comienza la elongación del péptido. Después de la translocación el ciclo se repite con la selección del aa-ARNt siguiente hasta alcanzar el codón de terminación. B: Terminación. El codón de terminación es reconocido por los factores eRF1 y eRF3, lo cual promueve la hidrólisis del enlace entre el péptido y el ARNt y su liberación del complejo ribosomal (Modificado de Lodish <i>et al.</i> , 2005).	32
8	Representación esquemática del plásmido pGEM®-T Easy y principales regiones referenciales en su secuencia nucleotídica para la clonación de fragmento 5'UTR-C de DENV-2 (SnapGene® Viewer).	47
9	Relación filogenética de cepas de DENV-1, DENV-3, DENV-4 y dos cepas foráneas y ocho (08) cepas autóctonas de DENV-2 basadas en las secuencias del genoma completo (excepto DENV-2/1693) realizado con el programa de computación MEGA5. El árbol filogenético óptimo fue generado mediante el método Neighbor-Joining. En cada una de las ramas se indican los porcentajes ≥ 60 de las réplicas de los árboles mediante el <i>test</i> de <i>bootstrap</i> de 1000 replicas. Las distancias evolutivas fueron calculadas mediante el método de Tamura-Nei (Tamura-Nei, 2011). Cada cepa fue denominada considerando el serotipo viral, el código LARDIDEV, número de acceso al <i>GenBank</i> . En el caso de la cepa DENV-2/1693, la relación filogenética se realizó comparando la secuencia nucleotídica correspondiente al gen de la envoltura (E).	78
10	Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de la región inicial del genoma (5'UTR) de ocho cepas de los diferentes serotipos de DENV mediante el método Clustal W (Thompson <i>et al.</i> , 1994). Se indican las zonas SLA y SLB (OligoU y 5'UAR) descritas para 5'UTR de DENV.	79
11	Alineamiento múltiple de 14 secuencias nucleotídicas de 100 nt correspondientes a la región inicial del genoma (5'UTR) de cepas autóctonas de DENV-1 teniendo como referencia la secuencia de la cepa 16007 (DENV-1/N° de acceso <i>GenBank</i> : AF180817.1).	80

- 12 Alineamiento múltiple de 13 secuencias nucleotídicas de 100 nt correspondientes a la región inicial del genoma (5'UTR) de cepas autóctonas de DENV-2 teniendo como referencia las secuencias de las cepas: 16681 (DENV-2/Nº de acceso GenBank: NC_001474.2) y 1950IQT (DENV-2/Nº de acceso GenBank: EU056811.1). 81
- 13 Alineamiento múltiple de 17 secuencias nucleotídicas de 100 nt correspondientes a la región inicial del genoma (5'UTR) de cepas autóctonas de DENV-3 teniendo como referencia la secuencia de la cepa: H87 (DENV-3/Nº de acceso GenBank: M93130.1). 82
- 14 Alineamiento múltiple de 15 secuencias nucleotídicas de 100 nt correspondientes a la región inicial del genoma (5'UTR) de cepas autóctonas de DENV-4 teniendo como referencia la secuencia de la cepa: H241 (DENV-4/Nº de acceso GenBank: AY947539.1). 83
- 15 Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los fragmentos correspondientes a la región genómica 5'UTR-C de DENV-1 amplificados con diferentes concentraciones (0,5 µM, 0,75 µM y 1 µM) de cebadores (UTRD-1 y UTRR-1), así como con diferentes soluciones amortiguadoras. A. Buffer AMV® *Reverse Transcriptase* y B. GoTaq® *Flexi Buffer colorless*). RT-PCR realizada con la solución A. 1: Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen), 2-3: DENV-1 [16007 (0,5 µM)], 4: Control negativo, 5: Control de mezcla, 6-7: DENV-1 [16007 (0,75 µM)], 8: Control negativo, 9: Control de mezcla, 10-11: DENV-1 [16007 (1 µM)], 12: Control negativo, 13: Control de mezcla. RT-PCR realizada con la solución B. 14-15: DENV-1 [16007 (0,5 µM)], 16: Control negativo, 17: Control de mezcla, 18-19: DENV-1 [16007 (0,75 µM)], 20: Control negativo, 21: Control de mezcla, 22-23: DENV-1 [16007 (1 µM)], 24: Control negativo, 25: Control de mezcla. 86
- 16 Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los fragmentos correspondientes a la región genómica 5'UTR-C de los serotipos DENV-2, DENV-3 y DENV-4 amplificados con diferentes concentraciones (0,5 µM, 0,75 µM y 1 µM) de cebadores A. 1: Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen), 2: DENV-2 [16681 (0,5 µM)], 3: DENV-2 [16681 (0,75 µM)], 4: DENV-2 [16681 (1 µM)]. B. 1: Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen), 2: DENV-3 [H87 (0,5 µM)], 3: DENV-3 [H87 (0,75 µM)], 4: DENV-3 [H87 (1 µM)]. C. 1: Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen), 2: DENV-4 [H241 (0,5 µM)], 3:

DENV-4 [H241 (0,75 μ M),4: DENV-4 [H241(1 μ M).

86

- 17 Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los fragmentos correspondientes a la región genómica 5'UTR-C de los serotipos DENV-1 y DENV-2 amplificados con diferentes cantidades de la enzima *Taq* polimerasa(0,5 U, 1,25 U y 2,5 U). A. 1: Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen), 2-3: DENV-1 [16007 (0,5 U)], 4: Control negativo, 5: Control de mezcla, 6-7: DENV-1 [16007 (1,25 U)], 8: Control negativo, 9: Control de mezcla, 10-11: DENV-1 [16007 (2,5 U)], 12: Control negativo, 13: Control de mezcla. B. 1: Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen), 2-3: DENV-2 [16681 (0,5 U)], 4: Control negativo, 5: Control de mezcla, 6-7: DENV-2 [16681 (1,25 U)], 8: Control negativo, 9: Control de mezcla, 10-11: DENV-2 [16681 (2,5 U)], 12: Control negativo, 13: Control de mezcla.

87

- 18 Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los fragmentos correspondientes a la región genómica 5'UTR-C de los serotipos DENV-3 y DENV-4 amplificados con diferentes cantidades de la enzima *Taq* polimerasa(0,5 U, 1,25 U y 2,5 U). A. 1: Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen), 2-3: DENV-3 [H87 (0,5 U)], 4: Control negativo, 5: Control de mezcla, 6-7: DENV-3 [H87 (1,25 U)], 8: Control negativo, 9: Control de mezcla, 10-11: DENV-3 [H87 (2,5 U)], 12: Control negativo, 13: Control de mezcla. B. 1: Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen), 2-3: DENV-4 [H241 (0,5 U)], 4: Control negativo, 5: Control de mezcla, 6-7: DENV-4 [H241 (1,25 U)], 8: Control negativo, 9: Control de mezcla, 10-11: DENV-4 [H241 (2,5 U)], 12: Control negativo, 13: Control de mezcla.

88

- 19 Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los fragmentos correspondientes a la la región 5'UTR-C de las diferentes cepas del DENV. 1: DENV-1 (16007), 2: DENV-2 (1693), 3: DENV-2 (19094), 4: DENV-2 (28105), 5: DENV-2 (29681), 6: DENV-2 (2124IQT), 7: DENV-2 (16681), 8: DENV-3 (H87), 9: DENV-4 (H241), 10: Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen).

89

- 20 Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los fragmentos de 320 pb correspondientes a la la región 5'UTR-C de cepas de DENV-2. 1: Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen), 2: DENV-2 (16681), 3: DENV-2 (2124-IQT), 4: DENV-2 (28105), 5: DENV-2 (29681), 6: Control negativo, 7: Control positivo.

90

- 21 Especificidad del ensayo de amplificación del fragmento 5'UTR-C de las cepas de DENV haciendo uso de los diferentes juegos de cebadores. A. Amplificación con los cebadores UTRD-1 y UTRR-1. 1: DENV-1 (16007), 2: 16681 (DENV-2), 3: H87 (DENV-3), 4: H241 (DENV-4), 5: Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen). B. Amplificación con los cebadores UTRD-2 y UTRR-2., 1: 16007 (DENV-1), 2: 16681 (DENV-2), 3: H87 (DENV-3), 4: H241 (DENV-4), 5: Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen). C. Amplificación con los cebadores UTRD-3 y UTRR-3, 1: 16007 (DENV-1), 2: 16681 (DENV-2), 3: H87 (DENV-3), 4: H241 (DENV-4), 5: Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen). D. Amplificación con los cebadores UTRD-4 y UTRR-4, 1: 16007 (DENV-1), 2: 16681 (DENV-2), 3: H87 (DENV-3), 4: H241 (DENV-4), 5: Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen). 91
- 22 Sensibilidad analítica del ensayo mediante amplificación por RT-PCR del fragmento 5'UTR-C a partir ARNv obtenido de diluciones seriadas de la cepa 16681 (DENV-2). 1: 100.000 UFP/mL, 2: 10.000 UFP/mL, 3: 1000 UFP/mL, 4: 100 UFP/mL, 5: 10 UFP/mL, 6: Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen). 92
- 23 Electroforesis en gel de Agarosa al 2% correspondiente a los fragmentos producto de la digestión enzimática con enzimas de restricción. A. Digestión enzimática de la región 5'UTR-C correspondiente a la cepa 16007 (DENV-1) con la enzima *Sal* I, 1-4: DENV-1 (16007), 5: DENV-1 (16007) sin digerir, 7: Marcador:100 pb *DNA step ladder* (Axygen). restricción.B. Digestión enzimática de la región 5'UTR-C correspondiente a cepas de DENV-2 con la enzima *Pst* I, 1: DENV-2 (2124IQT), 2: DENV-2 (1693), 3: DENV-2 (16681), 4: DENV-2 (19094), 5: DENV-2 (28105), 6: DENV-2 (29681), 7: DENV-2 (16681) sin digerir, 8: Marcador:100 pb *DNA step ladder* (Axygen). C. Digestión enzimática de la región 5'UTR-C correspondiente a la cepa H87 (DENV-3) con la enzima *Hae* III, 1: Marcador:100 pb *DNA step ladder* (Axygen), 2-5: DENV-3 (H87), 6: DENV-3 (H87) sin digerir, D. Digestión enzimática de la región 5'UTR-C correspondiente a la cepa H241 (DENV-4) con la enzima *Msp* I, 1: Marcador:100 pb *DNA step ladder* (Axygen), 2-6: DENV-3 (H87), 7-8: DENV-3 (H241) sin digerir. 94
- 24 Electroforesis en gel de agarosa 2% de productos de amplificación de 5 'UTR-C de cepas de DENV. 1: DENV-1 (16007); 2: DENV-2 (16681); 3: DENV-2 (1693); 4: DENV-2 (19094); 5: Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen); 6: 96

DENV-3 (H-87); 7: DENV-4 (H-241).

- 25 Electroforesis en gel de agarosa 2% de productos de amplificación de 5'UTR-C/ C/prM-M/ NS5 de DENV. 1: 5'UTR-C 16007 (DENV-1); 2: C/prM-M 16007 (DENV-1); 3: NS5 16007 (DENV-1); 4: Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen); 5: 5'UTR-C 1693 (DENV-2); 6: C/prM-M 1693 (DENV-2); 7: NS5 1693 (DENV-2); 8: Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen); 9: 5'UTR-C H87 (DENV-3); 10: C/prM-M H87 (DENV-3); 11: NS 5 H87 (DENV-3); 12: Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen); 13: 5'UTR-C H241 (DENV-4); 14: C/prM-M H241 (DENV-4); 15: NS5 H241 (DENV-4); 16: Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen). 97
- 26 Actividad del sistema traduccional de placenta con los ARNv obtenidos a partir de las cepas de DENV-2 (16681 y 1693). El S-30 de placenta fue incubado bajo condiciones de síntesis de proteínas (Metodología 3.7.) con diferentes cantidades del ARNv de la cepa de referencia DENV-2 (16681) en (A) y del ARNv de la cepa autóctona (1693) en (B), Se indican las dpm de los ¹⁴[C] aminoácidos incorporados en los polipéptidos sintetizados y el porcentaje de actividad frente al ARNm endógeno de placenta (control). 99
- 27 Máxima actividad traduccional del S-30 de placenta con los ARNv. Los ensayos se realizaron como se especifica en la Metodología (3.7.) y utilizando la concentración de ARNv donde se observó máxima actividad (Figura 26) de 31 µg/mL del ARNv DENV-2 (16681) y 40 µg/mL del ARNv DENV-2 (1693). Se muestra el promedio y la desviación estándar de cuatro ensayos independientes. Prueba de múltiples comparaciones con el control de Dunnett: *Significativamente superior al control (P<0,001). 100
- 28 Cinética de la actividad traduccional del S-30 de placenta con el ARNv de la cepa de referencia de DENV-2 (16681). 31 mg/mL del ARNv fueron incubados con el sistema traduccional humano bajo condiciones de síntesis de proteínas (Metodología 3.7.). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 23 µL de la mezcla de reacción para el conteo de la radiactividad en los polipéptidos sintetizados. 101
- 29 Actividad traduccional de la fracción S-30 dirigida por ARNv DENV-2 (16681) incubado a una temperatura de 70 °C. El ARNv (31 µg /mL) previamente incubado, o no, a 70 °C por 3 min fue agregado al sistema traduccional bajo condiciones de síntesis de proteínas. Se muestra el promedio de cuatro ensayos 102

con la desviación estándar y el porcentaje de aumento de estimulación traduccional por la incubación del ARNv.

- 30 Actividad del sistema traduccional de placenta con los ARNv obtenidos a partir de cepas de diferentes serotipos virales DENV. El S-30 de placenta fue incubado bajo condiciones de síntesis de proteínas (Metodología 3.7.) con diferentes cantidades del ARNv de las diferentes cepas. A) ARNv de DENV-1 (cepa Hawaii), B) ARNv de DENV-2 (cepa 19094), C) ARNv de DENV-3 (cepa H-87), D) ARNv de DENV-4 (cepa H-241). Se indican las dpm de los ¹⁴[C] aminoácidos incorporados en los polipéptidos sintetizados y el porcentaje de actividad frente al ARNm endógeno de placenta (control). 103
- 31 Máxima actividad traduccional del S-30 de placenta con los ARN de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. Los ensayos se realizaron como se especifica en la Metodología (3.7.) y utilizando la concentración de ARNv donde se observó máxima actividad. Se muestra el promedio de dpm y la desviación estándar de tres ensayos independientes, así como el % de actividad respecto al control. Prueba de múltiples comparaciones con el control de Dunnett: *Significativamente superior al control (P<0,001). ★Prueba de Tukey (P<0,001): significativamente diferente a todos menos a DENV-1. 105
- 32 Esquema de hibridización esperada de cada uno de los oligonucleótidos antisentido con la secuencia nucleotídica complementaria del ARNm de DENV-2. 106
- 33 Actividad traduccional dirigida por ARNv DENV-2 (16681) en presencia de oligonucleótidos antisentido que hibridizan con secuencias de la región 5'UTR y de la cápside (C) del genoma viral. Control: ARNm endógeno de placenta. OAs1→7 o Oines: en presencia de los oligoantisentido sin ARNv. ARNv: ARN del virus sin OAs. ARNv/OAs1→7 o Oines: Híbridos del ARNv. Promedio de tres ensayos con la desviación estándar. Prueba de Dunnett: *P<0,0001; ★P<0,01 (significativamente superior o inferior al control, respectivamente). Oines: oligo inespecífico para el ARNv. 107
- 34 Actividad traduccional dirigida por ARNv DENV-2 (16681) respecto al control y en presencia de los oligonucleótidos antisentido contra secuencias del ARNv. Los valores de porcentaje respecto al control se obtuvieron de los datos indicados en la Figura 4.23. Prueba de Dunnett: *P<0,0001; ★P<0,01 (significativamente superior o inferior al control, respectivamente). 108

35	Efecto inhibitorio de los oligonucleótidos antisentido sobre el sistema de traducción S-30 dirigido por ARNv DENV-2 (16681). Se presenta el porcentaje de inhibición de los polipéptidos radiactivos sintetizados por los ARNv hibridizados, frente a la actividad traduccional dirigida por el ARNv sin oligonucleótidos antisentido. Promedio de tres ensayos con la desviación estándar.	109
36	Efecto inhibitorio de los oligonucleótidos antisentido sobre el sistema de traducción S-30 dirigido por ARNv de los serotipos DENV-1 (16007), DENV-3 (H87) y DENV-4 (H241). Se presenta el porcentaje de inhibición de los polipéptidos radiactivos sintetizados por los ARNv hibridizados con el OAs2, frente a la actividad traduccional dirigida por los ARNv sin el oligonucleótido antisentido. Promedio de tres ensayos con la desviación estándar.	110
37	Esquema correspondiente a la región del promotor de T7 ARN polimerasa, sitio de clonaje múltiple y dianas de restricción enzimática en el plásmido pGEM®-T Easy. A: Se muestran los sitios de restricción de <i>Apa</i> I y <i>Eco</i> RI antes del proceso de doble digestión, B: Se observa el sitio de clonaje múltiple con los extremos cohesivos del plásmido y donde se espera la recombinación del inserto.	112
38	Electroforesis en gel de Agarosa al 2 % de los productos de ADN correspondientes a los fragmentos 5'UTR-C de las cepas de DENV-2. 1: 16681, 2: 2124-QT, 3: 28105, 4: 29681. 6: Marcador (100 pb DNA <i>step ladder</i> , Axygen).	113
39	Electroforesis en gel de Agarosa al 0,8 % del plásmido pGEM®-T Easy (©Promega) lineal después del tratamiento con las enzimas <i>Apa</i> I y <i>Eco</i> RI. Marcador (1 kb DNA <i>step ladder</i> , Axygen).	114
40	Electroforesis en el gel de Agarosa al 2 % de los productos de la PCR de colonias producto de la transformación de las células <i>E. coli</i> XL1 Blue con la mezcla de ligación el vector pGEM®-T Easy y 5'UTR-C de la cepa 16681 DENV-2. 1: 100 pb DNA <i>step ladder</i> (Axygen), 2-16: Colonias recombinantes en un relación molar 3/1 17-31: Colonias recombinantes en un relación molar 5/1, 32-36: Colonias negativas, 37-38: Control positivo: DH5α pTZ 3.2-320 pb (15.08.08) M2.1.	115
41	Electroforesis en el gel de Agarosa al 1% donde se observa la liberación de inserto de dos de los fragmentos (5'UTR-C) clonados en de pGEM®-T Easy. 1-2. pGEM®-T Easy-5'UTR-	117

- C sometido a doble digestión con las enzimas *ApaI* y *EcoRI*, 3. pGEM®-T Easy-5'UTR-C tratado con la enzima *ApaI*. 4. pGEM®-T Easy-5'UTR-C sin tratamiento, 6. 100 pb *DNA step ladder* (Axygen).
- 42 Electroforesis en gel de Agarosa al 2% correspondiente a la amplificación mediante PCR de los fragmentos 5'UTR-C de DENV-2 obtenidos a partir de los ADNp (pGEM®-T Easy-5'UTR-C). 1. 16681, 2. 2124IQT, 3. 28105, 4. 29681. 6. Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen). 117
- 43 Electroforesis en el gel de Agarosa al 1% donde se observan los productos de extracción de ADNp de los clones recombinantes conformados por la región 5'UTR-C de DENV-2 y pGEM®-T Easy cuyo tamaño corresponde a 3335 pb 1. 16681, 2. 2124IQT, 3. 28105, 4. 29681. 5. Marcador (1kb *DNA step ladder*, Axygen). 118
- 44 Electroforesis en el gel de Agarosa al 1% donde se observan los ADNp linearizados (pGEM®-T Easy-5'UTR-C DENV-2) luego de la digestión con la enzima *EcoRI*. 1-3: ADNp (16681), 4-6. ADNp (2124IQT), 7-8. ADNp (28105), 9-10. ADNp (29681), 11. ADNp sin digerir con *EcoRI* (29681), 12: Marcador tamaño molecular (1 Kb *DNA step ladder*, Axygen). 119
- 45 Actividad de la enzima pirofosfatasa. A. Cinética de reacción. La incubación se realizó con diferentes concentraciones de enzima (0,005, 0,05 y 0,1 U/μL), bajo las condiciones iónicas del ensayo de transcripción utilizadas por Pérez *et al.* (2015). En cada caso, la cinética de reacción se siguió midiendo el fosfato liberado como se especifica en Materiales y Métodos (3.12.1). B. Relación de la velocidad inicial de reacción de la pirofosfatasa con la concentración de enzima. Las velocidades iniciales de reacción se obtuvieron de las pendientes de las rectas de las gráficas de las cinéticas a los primeros minutos de reacción. 121
- 46 Actividad de T7 ARN polimerasa. Se representan las cinéticas de las reacciones de transcripción con las cantidades de T7 ARN polimerasa indicadas. Las reacciones se siguieron por la medida del fosfato liberado como se especifica en Materiales y Métodos (3.12.1). Se usaron 0,03 μg/μL del plásmido recombinante pGEM®-T Easy-5'UTR-C DENV-2 (28105) y las condiciones iónicas del ensayo de transcripción previamente estandarizado por Pérez *et al.*, 2015. 122
- 47 Estandarización de la cantidad de ADNp recombinante en los

- ensayos de transcripción. Fueron incubadas diferentes cantidades de los plásmidos clonados con las cepas de DENV-2 (16681, 28105, 2124IQT y 29681) con 0,6 U/μL de T7 ARN polimerasa, 3,75 mM de cada nucleótido, 0,005 U/mL de pirofosfatasa y las demás condiciones de la reacción de transcripción fueron las descritas por Pérez *et al.* (2015). A las 3 y 6 horas se tomaron alícuotas de las mezclas de reacción para medir la cantidad de fosfato liberado como se indica en Materiales y Métodos (3.12.1.). Cada ensayo incluyó un blanco sin T7 ARN polimerasa. 124
- 48** Estandarización de la concentración de magnesio en los ensayos de transcripción. 0,035 μg/μL de ADNp pGEM®-T Easy-5'UTR-C DENV-2 (28105) fueron incubados con diferentes concentraciones del ión Mg⁺² (6 a 25 mM), 0,6 U/μL de T7 ARN polimerasa, 0,005 U/μL de pirofosfatasa y 3,75 mM de cada nucleótido, el resto de las condiciones se mantuvieron como describe Pérez *et al.* (2015). A los tiempos indicados se midió el fosfato liberado (Materiales y Métodos). Las líneas punteadas indican el valor máximo de Pi liberado a las 3 y 7 horas de reacción del plásmido control DH5α pTZ 3.2-320 pb (15.08.08) clonado con la región 5'UTR-C de la cepa asiática de DENV-2 (16681) por Pérez *et al.* (2015). 125
- 49** Estandarización de la concentración de la enzima pirofosfatasa en los ensayos de transcripción. 0,025 μg/μL de ADNp pGEM®-T Easy-5'UTR-C DENV-2 (29681) fueron incubados con diferentes concentraciones de pirofosfatasa (0,001 a 0,1 U/μL), 0,6 U/μL de T7 ARN polimerasa, 3,75 mM de cada nucleótido y 16 mM magnesio, el resto de las condiciones se mantuvieron como describe Pérez *et al.* (2015). A las siete horas de reacción se midió el fosfato liberado (Materiales y Métodos). 126
- 50** Estandarización del tiempo de reacción de transcripción. 0,035 μg/μL de ADNp pGEM®-T Easy-5'UTR-C DENV-2 (28105) fueron incubados bajo las condiciones estandarizadas de T7 ARN polimerasa (0,6 U/μL), nucleótidos (3,75 mM c/u), pirofosfatasa (0,05 U/μL) y magnesio (16 mM), el resto de las condiciones se mantuvieron como describe Pérez *et al.* (2015). Se tomaron alícuotas de las mezclas de reacción a las horas indicadas para medir el fosfato liberado como se especifica en la Metodología (3.9.2.). Se representa el promedio de tres ensayos con la desviación estándar 127
- 51** Estandarización de la temperatura en la reacción de transcripción. 0,035 μg/μL de ADNp pGEM®-T Easy-5'UTR-

- C DENV-2 (28105) fueron incubados a tres temperaturas diferentes (30, 37 y 42 °C) bajo las condiciones estandarizadas de T7 ARN polimerasa (0,6 U/μL), nucleótidos (3,75 mM c/u), pirofosfatasa (0,05 U/μL) y magnesio (16 mM), el resto de las condiciones se mantuvieron como describe Pérez *et al.* (2015). A las 6 horas de reacción se tomaron alícuotas de los ensayos para medir el fosfato liberado como se especifica en la Metodología (3.9.2.). Se representa el promedio de tres ensayos con la desviación estándar. 128
- 52 Actividad máxima de los ADNp. Diferentes concentraciones de los ADNp pGEM®-T Easy-5'UTR-C de las cepas de DENV-2 fueron incubados bajo las condiciones estandarizadas e indicadas en la tabla 7. A las 6 horas de reacción se tomaron alícuotas de los ensayos para medir el fosfato liberado como se especifica en la Metodología (3.12.1.). 130
- 53 Actividad transcripcional del plásmido 29681. Diferentes concentraciones de los ADNp pGEM®-T Easy-5'UTR-C de la cepa de DENV-2 29681 fueron incubados bajo las condiciones estandarizadas e indicadas en la tabla 7. A las 3 y 6 horas de reacción se tomaron alícuotas de los ensayos para medir el fosfato liberado como se especifica en la Metodología (3.12.1.). 131
- 54 **A.** Electroforesis en gel de poliacrilamida-urea al 10% de los productos de transcripción *in vitro* con diferentes concentraciones del plásmido pGEM®-T Easy-5'UTR-C/DENV-2 (29681) con las condiciones estandarizadas para la reaccion de transcripción a 37 °C durante los tiempos 0, 3 y 6 horas de incubación. **1-3:** 29681 sin enzima T7 ARN Polimerasa, **4-6:** 0,015 μg/μL 29681, **7-9:** 0,025 μg/μL 29681, **10-12:** 0,035 μg/μL 29681. **B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los productos de Transcripción Reversa (Canales 1-5) y Transcripción Reversa acoplada a Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR, *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) (Canales 7-12) de la reacción de transcripción *in vitro* del plásmido pGEM®-T Easy-5'UTR-C/DENV-2 (29681) a 37 °C durante 6 horas de incubación. **1:** 29681 sin enzima T7 ARN Polimerasa, **2:** 0,015 μg/μL 29681, **3:** 0,025 μg/μL 29681, **4:** 0,035 μg/μL 29681, **5:** ADN plasmídico 29681, **6:** 29681 sin enzima T7 ARN Polimerasa, **7:** 0,015 μg/ μL 29681, **8:** 0,025 μg/μL 29681, **9:** 0,035 μg/ 29681, **10:** ADN plasmídico 29681, **11:** ARN DENV-2 (cepa 16681),**12:** 29681 sin linealizar, **13:** pGEM®-T Easy-5'UTR-C/DENV-2 lineal,**14:** Marcador tamaño molecular (1 Kb DNA *step ladder*, Axygen). 132
- 55 Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los productos de transcripción *in vitro* de los plásmidos pGEM®-T Easy-

5'UTR-C/DENV-2 (22124IQT y 29681) con las condiciones estandarizadas para la reaccion de transcripción a 37 °C durante 6 horas de incubación. 1: pGEM®-T Easy-5'UTR-C/DENV-2 (2124IQT), 2: pGEM®-T Easy-5'UTR-C/DENV-2 (29681), 3: pGEM®-T Easy-5'UTR-C/DENV-2 (29681) sin enzima T7 ARN Polimerasa, 4: pGEM®-T Easy-5'UTR-C/DENV-2 (29681) LINEAL, 5: pGEM®-T Easy-5'UTR-C/DENV-2 (29681) CIRCULAR, 6: Marcador tamaño molecular (1 Kb DNA *step ladder*, Axygen), 7: 0,20 OD de ARN ribosomal de *E. coli*. 134

- 56 Electroforesis en gel de poliacrilamida-urea al 10% de los productos de transcripción *in vitro* con diferentes concentraciones de los amplificados T7-5'UTR-C 1-3: 2124IQT, 4-6: 29681. 135

ÍNDICE DE ANEXOS

Nº		Pág.
1	Informacion a los participantes en la investigacion y formato de consentimiento	184
2	Datos de las cepas de DENV empleadas para la elaboración de los alineamientos múltiples y/o relaciones filogenéticas.	187

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Las infecciones por virus Dengue (DENV) representan la enfermedad viral más importante transmitida por mosquitos a humanos en términos de morbi-mortalidad (Gubler, 1998). La infección es causada por cualquiera de los serotipos del DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4), es transmitida a los humanos fundamentalmente por el mosquito *Aedes aegypti*. La presentación clínica de esta enfermedad se describía como un espectro clínico que iba desde manifestaciones asintomáticas hasta las sintomáticas, que incluía cuadros de Fiebre Dengue (FD), Fiebre Hemorrágica del Dengue (FHD) y/o Síndrome de Choque por Dengue (SCD) (WHO, 1997). Sin embargo, en el año 2009 un grupo de expertos de la Organización Mundial de la Salud reportó una nueva forma de clasificación clínica de la enfermedad, al establecer cuadros de dengue severo y no severo, éste último a su vez segregado en dos grupos de acuerdo a la presencia o no de signos de alarma (WHO, 2009).

En los últimos 50 años la enfermedad por DENV ha sufrido un incremento notorio en su expansión geográfica hacia otros países. Se estima, que anualmente ocurren 50 millones de infecciones y aproximadamente 2,5 billones de personas viven en riesgo. Asimismo, se han reportado aproximadamente 500.000 hospitalizaciones y 15.000 muertes por año, sin embargo el número total de personas que se limitan anualmente a causa de ésta enfermedad es probablemente de decenas de millones (WHO, 2009). En muchos países de Asia y América Latina, la FD fue gradualmente reemplazada por epidemias de casos severos, tal como se observó en 1981 en Cuba con la ocurrencia de la primera epidemia de FHD/SCD en la región de las Américas (Kourí *et al.*, 1983), esta a su vez se extendió a Venezuela a finales de 1989 donde se reportaron más de 6000 casos de FHD y 73 muertes. En esta epidemia se aislaron los serotipos DENV-1, DENV-2 y DENV-4, el serotipo DENV-2 estuvo asociado a los casos fatales (PAHO, 1990). Desde el punto de vista molecular el análisis de la secuencia de cepas venezolanas de DENV-2 aisladas entre 1987

y 1995 permitió la clasificación de las mismas dentro del genotipo Asiático desplazando así al genotipo Americano (Rico-Hesse, 1990).

Un aspecto poco dilucidado en relación a las infecciones por DENV se refiere al proceso patogénico, particularmente por la falta de un modelo animal que desarrolle los síntomas de la enfermedad (Rico-Hesse, 2007). Al respecto se han descrito algunas hipótesis, entre ellas la teoría de inmunoamplificación dependiente de anticuerpos, la cual plantea la posibilidad de que un individuo puede infectarse hasta tres veces por serotipos heterólogos, lo que aumenta su propensión a desarrollar enfermedad hemorrágica (Halstead y Marchette, 2003). Asimismo, algunas evidencias apuntan a la virulencia de las cepas virales, como factor determinante en la patogénesis de la enfermedad por DENV (Rico-Hesse, 2007).

Desde el punto de vista biológico, se ha descrito que el genoma del DENV está representado por un ARN de cadena simple, sentido positivo y conformado por aproximadamente 10700 nucleótidos (nt) de longitud (Kuhn *et al.*, 2002). Consta de una región no traducible 5' (UTR, *Untranslated Region*), un marco abierto de lectura (ORF, *Open Reading Frame*) y una UTR a nivel del extremo 3' terminal. El ORF codifica una poliproteína que es procesada co y post-traduccionalmente por proteasas virales y celulares para dar lugar a tres proteínas estructurales [Cápside (C), preMembrana/Membrana (prM/M) y Envoltura (E)] y siete no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5). Las proteínas virales son producidas luego de la infección viral, una vez que la cadena positiva de ARN es traducida y transcrita en una cadena de ARN negativa que sirve como molde para la síntesis de ARN positivo (Chambers *et al.*, 1990).

Las regiones 5'UTR y 3'UTR del genoma de los flavivirus tienen aproximadamente 100 y 400 a 700 nt de longitud, respectivamente. Presentan secuencias conservadas (CS, *Conserved Sequence*) y estructuras tipo bucle (SL, *Stem-Loop*). Se cree que éstas últimas son regiones determinantes para la replicación de los flavivirus, específicamente por la interacción entre proteínas virales (NS3 y NS5) y del hospedador con 3'UTR. Este hecho sugiere que 3'UTR y 5'UTR dirigen los procesos de traducción de flavivirus y replicación

de ARN, lo que hace de las mismas blanco potencial para realizar análisis antivirales (Deas *et al.*, 2005).

Asimismo, y debido a las implicaciones previamente mencionadas son regiones de especial interés, para estudiar mecanismos de síntesis de proteínas y replicación viral. Los estudios para determinar acción antiviral son escasos, sin embargo se ha descrito el uso de moléculas químicamente modificadas denominadas oligómeros morfolidos (PMOs, *Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers*), cuya actividad antisentido ha sido observada sobre secuencias del genoma viral correspondientes a las regiones 5' y 3' terminal (Deas *et al.*, 2005). De igual forma, Pérez *et al.* (2015) emplearon de forma preliminar oligonucleótidos antisentido no morfolidos dirigidos contra 5'UTR de una cepa asiática de DENV-2, sugiriendo un efecto inhibitor del proceso de traducción viral. La razón fundamental de estos estudios ha sido la necesidad de hallar alternativas antivirales, debido a la falta de disponibilidad de vacunas o de drogas antivirales efectivas para la prevención o cura de las infecciones por DENV. Estos resultados sugieren el uso de oligonucleótidos antisentido, como inhibidores de la actividad viral. Estas moléculas han sido probadas con gran efectividad para virus como Ebola (Warfield *et al.*, 2006), virus de Oeste del Nilo (WNV, *West Nile Virus*) (Deas *et al.*, 2005) e Influenza A, lo que abre la posibilidad de evaluarlas en aislados de DENV de referencia y particularmente de naturaleza autóctona, con el fin de valorar su uso como potencial inhibidor del proceso de infección por DENV.

En relación a procesos determinantes de la supervivencia viral, como la traducción y la replicación se han realizado diversos estudios en relación a este último mecanismo (Álvarez *et al.*, 2005b; Álvarez, *et al.*, 2008; Lodeiro *et al.*, 2009), pero no en relación al primero. La síntesis de proteínas ha sido evaluada en algunos casos (Edgil *et al.*, 2006), pero utilizando constructos recombinantes, estas estrategias muestran ciertas ventajas, pero no ofrecen evidencias contundentes en relación a lo que ocurriría de forma natural en las infecciones producidas en el hospedador susceptible. De este planteamiento, surgió la necesidad de demostrar, como moléculas correspondientes a genomas de DENV actuando como ARN mensajeros, podían ser capaces de sintetizar proteínas en un sistema de traducción *in vitro*, así como valorar la supresión total o parcial de este proceso haciendo

uso de inhibidores de naturaleza antisentido, dirigidas contra secuencias nucleotídicas ubicadas en la región 5'UTR-C. Este hecho permitiría determinar la capacidad de los mismos de modular la expresión de genes virales y sentar las bases para dar lugar a la posibilidad de ejecución de ensayos que permitieran comprobar la acción antiviral de moléculas antisentido sensibles a su utilización en humanos, como terapia antiviral no solamente para DENV, sino para otros virus tipo ARN que merman a diario la salud de la población mundial.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Analizar el proceso traduccional *in vitro* de cepas de los serotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4, y su inhibición con oligonucleótidos antisentido.

Objetivos específicos

- Analizar las secuencias nucleotídicas de los genomas completos y de la región 5'UTR-C de genomas de cepas de los serotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4.
- Clasificar filogenéticamente las cepas de los serotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4.
- Amplificar la región de inicio 5'UTR-C (nucleótidos 1-320) de genomas de DENV mediante la técnica de RT-PCR.
- Obtener ARN genómico a partir de cultivos celulares a gran escala de cepas de los serotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4.
- Estandarizar las condiciones de reacción de un sistema de traducción *in vitro* a partir de ARN genómico aislado de cepas de los serotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4.
- Determinar la inhibición del proceso de traducción de cepas de los serotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 mediante la incorporación de oligonucleótidos antisentido dirigidos contra diferentes secuencias nucleotídicas de la región iniciadora de síntesis de proteínas (5'UTR-C).
- Clonar el ADNc correspondiente a la región amplificada 5'UTR-C en el plásmido pGEM®-T Easy.
- Amplificar la secuencia nucleotídica correspondiente a la región promotora de la enzima T7 ARN polimerasa y el fragmento 5'UTR-C a partir de ADNp recombinantes con cepas de DENV-2 mediante la técnica de RT-PCR.
- Estandarizar las condiciones de reacción de un sistema de transcripción *in*

vitro para la obtención de ARNm correspondiente a la región de inicio 5'UTR-C de cepas de DENV-2.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1.- Antecedentes

Con el transcurrir del tiempo, las infecciones por DENV se han hecho endémicas en gran parte del mundo (OMS, 2009). Uno de los aspectos más resaltantes de esta enfermedad, se refiere a la falta de un modelo animal que permita realizar estudios asociados a su patogénesis, así como la falta de una vacuna o terapia antiviral efectiva que influya en el proceso de replicación viral. Se ha descrito que a nivel de las regiones 3' UTR y 5' UTR (UTR, *Untranslated Regions*) de los DENV existen secuencias involucradas en el proceso de síntesis y traducción del ARNv (Alvarez *et al.*, 2005a). Asimismo, se han utilizado moléculas anti-sentido denominadas oligómeros morfolidos (P-PMOs, *Peptide-conjugated Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers*) para inhibir la replicación de flavivirus, tales como DENV y virus del Oeste del Nilo (WNV, *West Nile Virus*). En relación a éste aspecto, se cree que tales moléculas interfieren estéricamente con interacciones ARN-ARN ó ARN-proteína necesarias para el proceso de traducción o síntesis viral (Deas *et al.*, 2005) lo que haría presumir su potencial utilidad terapéutica sobre infecciones virales causadas a humanos (Holden *et al.*, 2006). De acuerdo a éste planteamiento, a continuación se describen algunos trabajos relacionados con el proceso de síntesis de proteínas virales y su posible inhibición con P-PMOs.

En 1995, Raviprakash *et al.* demostraron la inhibición de DENV-2 en células LLCMK/2 microinyectadas con los siguientes oligonucleótidos antisentido: [5'-AS (99-113 nt), 3'-b-AS (10684-10698 nt), NS5a-AS (8403-8417 nt), NS-5b-AS (8938-8952 nt) y 3'-a-AS (10584-10598 nt)]. Dos de ellos, 5'-AS y 3'-b-AS fueron sintetizados como POs (oligómeros fosfodiéster), PSs (oligómeros fosfotioatos) y PrPSs (oligómeros cuya sustitución fue con un grupo propinilo) sin modificación. Los oligonucleótidos controles tenían idéntica secuencia de bases, pero ordenada de forma aleatoria.

Los resultados de esta investigación fueron analizados por la síntesis de la proteína de envoltura, la cual fue medida por inmunofluorescencia y el análisis cuantitativo de imágenes de células infectadas con la cepa de DENV-2. Los únicos oligonucleótidos que favorecieron la inhibición de la replicación viral fueron los PrPS5' (5'-AS y 3'-b-AS) cuando fueron inoculados a concentraciones de 0,1 μ M y 1 μ M. De igual forma, se observó disminución en los niveles de ARNV en las células tratadas con éstos PrPS5' mediante la hibridización *in situ* con una sonda marcada con P³². Entre las conclusiones que destacan los autores, se observa que la posible falla en la inhibición del proceso de multiplicación por parte de otros oligonucleótidos como 3'-b-AS, pudo ser debida a la falta de acceso de éste último al genoma viral por la formación de estructuras secundarias. Asimismo, los resultados sugieren que el mecanismo de inhibición de funcionalidad de un gen por acción de los oligonucleótidos antisentido, podría deberse a la capacidad de unión de los mismos a las moléculas de ARN con subsecuente impedimento estérico e inhibición de la replicación viral. De igual forma, por un proceso de degradación de ARN causado por la formación de un heterodúplex que sirve como sustrato a la acción de ARNasas con actividad tipo H. De acuerdo a los autores, estos oligonucleótidos con sustituciones propinilo podrían ser efectivos contra otros agentes virales.

En 2005, Deas *et al.* publicaron un trabajo en el cual analizaron la actividad antiviral de PMOs, cuya secuencia era complementaria a varias regiones 3' y 5' terminales del genoma del virus del Oeste del Nilo. El objetivo principal era explorar la posibilidad de que las secuencias de ARN ubicadas en las regiones terminales, fuesen útiles como blanco para drogas antivirales. Para ello, diseñaron PMOs conjugados hacia la región 5' con un péptido rico en Arginina, el cual permitiría la liberación de moléculas en el interior celular. Entre los PMOs que mostraron mayor efectividad se observaron dos que los autores denominaron: 5'End y 3'CSI, cuyos blancos genómicos fueron una región de 20 nucleótidos hacia el extremo 5' y una región conservada denominada CS asociada con el proceso de ciclización del genoma. Ambos PMOs fueron capaces de disminuir los títulos virales entre 5 y 6 log a una concentración de 5 μ M sin efectos aparentes de citotoxicidad. La inhibición ocurrió específicamente en el proceso de traducción viral y síntesis de ARN por parte de los PMOs 5'End y 3'CSI, respectivamente. Esta investigación abrió la

posibilidad de generar alternativas para el establecimiento de terapias antivirales en flavivirus.

De igual forma, Stein *et al.* (2008), determinaron la actividad antiviral de oligómeros morfolinis anti-sentido (PMO) y PMO conjugados a péptidos (PPMO) en ratones AG129 infectados con la cepa D2/IC-30P-A y cultivos de tejido infectados con la cepa NG''C'' del serotipo DENV-2. Los PMO y PPMO fueron diseñados para que actuaran contra la región 5'terminal (5' SL, *Steem Loop*) ó la secuencia de ciclización ubicada hacia el extremo 3' del ARNv. Al respecto, los autores diseñaron una serie de ensayos para valorar incorporación de los PPMO de diferentes longitudes en células Vero, toxicidad y farmacocinética en ratones. Asimismo, determinaron que 100 ufp (Unidades Formadoras de Placas) de la cepa NG''C'' era capaz de causar 100% de mortalidad en ratones AG129 entre 7 a 9 semanas de nacidos, pero una vez que los mismos fueron tratados con 5'SL y 3'CS se observaba un tiempo de supervivencia mayor a 8 días. Ese mismo hecho fue evidenciado en células Vero infectadas con la cepa D2/IC-30P-A, tratadas con PPMO.

Este estudio mostró que los PPMO, cuyo blanco de acción se ubica en las regiones terminales del genoma viral de DENV-2 fueron capaces de alargar el tiempo de supervivencia de ratones AG129 infectados con una dosis letal de la cepa NG''C''. Además, los resultados de la evaluación farmacológica y toxicológica en ratones mostraron una distribución a nivel del hígado y persistencia por algunos días, lo que se consideró un perfil de PPMO favorable considerando la posibilidad de su uso en humanos.

Costin *et al.* (2010) reportan el diseño computacional de péptidos inhibidores de la proteína de Envoltura (E) de DENV-2. Entre los péptidos más activos se encontraron los que ellos denominaron DN57opt y 1OAN1, diseñados con el fin de que actuaran en la bisagra del dominio II y la conexión entre los dominios I/II de la proteína E, respectivamente. Los autores observaron inhibición de la replicación viral de la cepa de DENV-2, mediante la técnica de formación de focos, por parte de los péptidos DN57opt y 1OAN1. De igual forma, al medir la posible toxicidad de los péptidos se observó que DN57opt era medianamente tóxico para las células a una concentración de 40 μ M, mientras que 1OAN1 no lo era a ninguna de las concentraciones ensayadas. De igual forma, los

autores detectaron mediante microscopía electrónica cambios en la superficie de los virus tratados con los péptidos, lo que implicaba un posible rearrreglo de las glicoproteínas de envoltura, ya que no mostraban la simetría icosaédrica esperada para DENV. En cuanto al proceso de inhibición de la replicación, se observó que cuando los péptidos eran adicionados de forma directa a las células luego de haber sido infectadas su funcionalidad era nula. Sin embargo, los péptidos eran capaces de bloquear la interacción virus-célula, así como el proceso de infección luego que los virus se habían unido a la superficie celular. Los hallazgos soportan la hipótesis de que ambos péptidos interactúan directamente con la proteína E de DENV-2 actuando en la inhibición de la entrada viral. Este hecho daría soporte a la aplicación de estrategias antivirales, como tratamiento efectivo contra las infecciones por DENV.

Posteriormente, Pérez *et al.* (2015) reportaron la clonación de los primeros 297 nucleótidos del genoma de la cepa 16681 del serotipo DENV-2 en el plásmido pTZ18R, el cual fue sometido a transcripción *in vitro*, y posterior traducción en un sistema derivado de placenta humana. Se observó la síntesis de polipéptidos, así como la inhibición de dicha síntesis, sugiriendo que esta podría ser una vía para el diseño de estrategias virales, además de presentarse como un mecanismo alternativo independiente de 5'CAP, que involucraría a la estructura SLB. Los autores consideraron que este mecanismo podría ser útil como blanco en el desarrollo de terapias antisentido para inhibir el proceso de síntesis de proteínas.

2.2.- Bases teóricas

2.2.1.- Características generales del virus Dengue

El virus Dengue (DENV) pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus* y está conformado por cuatro tipos antigénicos diferentes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) (Henchal y Putnak, 1990). Son virus relativamente pequeños (40-70 nm), esféricos, con una composición de 6 % de ARN, 66 % de proteínas, 9 % de carbohidratos y 17 % de lípidos. La envoltura está conformada por las proteínas (E y M) que cubren

completamente la superficie del virus. El material genético se encuentra protegido por una nucleocápside circular de simetría icosaédrica, el diámetro del núcleo es de 25-30 nm. Entre la envoltura y la nucleocápside se encuentra una bicapa lipídica derivada de la membrana celular del hospedero (Rice, 1996).

2.2.2.- Organización del genoma

Como en el caso de otros flavivirus, el genoma de DENV corresponde a un ARN genómico de cadena sencilla de polaridad positiva que funciona como ARN mensajero, tiene una longitud aproximada de 10700 pb y codifica un único marco abierto de lectura (ORF, *open reading frame*) (Lindenbach y Rice, 2001). Posee una caperuza (CAP) en el extremo 5' terminal, seguido por una secuencia dinucleotídica conservada AG, carece de cola poli(A) en el extremo 3' terminal (Henchal y Putnak, 1990; Rice, 1996).

A diferencia de los ARNm celulares, los cuales contienen solo motivos para la regulación traduccional, los genomas de ARN virales (ARNv) poseen regiones funcionales, que actúan en diferentes estadios de su ciclo celular. Estas estructuras específicas, sus interacciones y asociación con proteínas del hospedador orquestan la multifuncionalidad del genoma viral (Sztuba-Solinska *et al.*, 2013). Luego del proceso de infección, el genoma actúa como ARNm para la traducción, y subsecuentemente como molde para la síntesis de ARN. Las hebras de ARN recién sintetizado pueden intervenir en las nuevas “rondas” de traducción, así como de sustrato para la encapsidación. El uso eficiente del genoma durante estos procesos, requiere de regulaciones, que permitirán asegurar la diseminación viral. Estas regulaciones son mediadas por determinadas secuencias del ARNv, ubicadas en la región codificante y no codificante; las cuales van a actuar como promotoras, potenciadoras o represoras del proceso viral (Baum *et al.*, 2010).

El ARNv presenta dos regiones no traducibles (UTR, *Untranslated Regions*), una ubicada en el extremo 5' y otra 3'. En lo que se refiere al ORF del genoma de DENV, se ha descrito que el mismo da lugar a una poliproteína única (3400 residuos aminoacídicos aproximadamente) que es posteriormente clivada por proteasas virales y del hospedador.

Este procesamiento post-traducciona da lugar a tres proteínas estructurales (cápside-premembrana/membrana-envoltura; NH₃⁺-C-prM/M-E-) y siete no estructurales (-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-COO⁻) (Figura 1) (Leitmeyer *et al.*, 1999; Kuhn *et al.*, 2002).

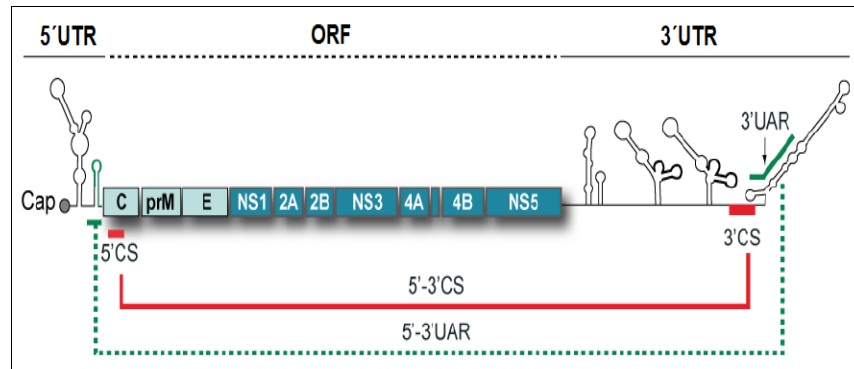


Figura 1. Representación esquemática de la organización del genoma de DENV. Las regiones 5' y 3'UTR y el marco abierto de lectura indicando las proteínas estructurales y no estructurales. La localización de las secuencias complementarias 5'-3'CS y 5'-3'UAR se señalan por líneas solidas y punteadas, respectivamente. Fuente: Gebhard *et al.* (2011).

2.2.2.1.- Regiones no traducibles (UTR) del genoma viral:

- **5'UTR:** se ubica en el extremo 5' del genoma, tiene una longitud entre 95 y 101 nucleótidos (nt). De acuerdo a su estructura se han descrito las siguientes regiones: **5' SLA** (*Stem-Loop A*): secuencia en forma de bucle, **SLB** (*Stem-Loop B*): secuencia nucleotídica en forma de bucle, **UAR** (*Upstream of AUG región*): región que se ubica antes del codón de inicio AUG, **DAR** (*Downstream of AUG región*): región que se encuentra luego del codón AUG, **CS** (*Cyclization sequence*): secuencia de ciclización, **chP** (*capsid-coding region hairpin*): región en forma de horquilla que codifica la cápside y **DCS-PK** (*downstream of 5'CS pseudoknot*): referido a un pseudonudo ubicado “corriente abajo” de 5' que ha sido reportado en flavivirus transmitidos por mosquitos (Liu *et al.*, 2013) (Figura 2.). **SLA**, tiene forma de “Y”, tiene una longitud estimada de 70 nt. Se ha propuesto que actúa como promotor de RdRps (NS5) y se cree que la unión entre SLA y RdRps es necesaria para la síntesis de ARN (Filomatori *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2008). En SLA, se han descrito tres regiones helicoidales (**S1**, **S2** y **S3**) interrumpidas por regiones en forma de “bulbos” que actúan como motivos altamente reactivos de estas regiones

de la cadena genómica (Filomatori *et al.*, 2006). **SLB**, se pliega conformando un pequeño lazo y contiene secuencias esenciales para interacciones de tipo ARN-ARN y la replicación del genoma (Alvarez *et al.*, 2005b). SLA y SLB se encuentran separados por una secuencia oligoU, cuya función es proveer un espacio entre SLA y SLB (Lodeiro *et al.*, 2009). La región denominada **cHP**, se ubica en la región codificante para la proteína C. Su funcionalidad se relaciona con la replicación del ARN y con la selección del codón de inicio (Clyde *et al.*, 2008), por lo que se cree que en el proceso de traducción favorece el reconocimiento del codón AUG mediante el detenimiento del complejo de iniciación. Otras regiones de interés en el ARNv, son las denominadas **5'-3'UAR**, de 11 y 16 nt de longitud, respectivamente. Asimismo, las secuencias adyacentes denominadas **DAR**. 5'UAR se encuentra en la region 5'UTR exactamente en dirección 5'-3' y justo antes del codón de iniciación (AUG) (Friebe *et al.*, 2011). La región DAR se ubica entre 5'UAR y 5'CS, y se superpone con sHP dentro de 3'SL. Estas regiones se asocian con la ciclización que ocurre durante la replicación viral, lo cual ocurre por la hibridización de los extremos del genoma de DENV, una vez que ocurren cambios conformacionales en las estructuras conservadas de ARN.

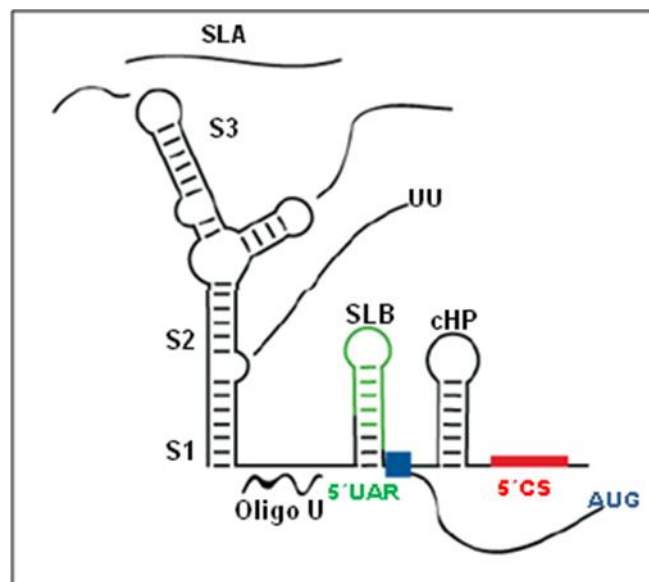


Figura 2. Estructura esquemática de la predicción de la estructura secundaria de la región 5' terminal del genoma de DENV. Se indican los elementos localizados en 5' (SLA, SLB, Oligo U, AUG, cHP y 5'CS). Fuente: Gebhard *et al.* (2011).

- **3'UTR:** se ubica en el extremo 3' del genoma viral y su longitud es de aproximadamente 450 nt. Se le ha atribuido un rol crucial en la síntesis viral. Estructuralmente se han reconocido tres dominios: I, II y III. El dominio I se localiza inmediatamente después del codón de parada (Alvarez *et al.*, 2005a) y es la región más variable su longitud puede oscilar entre 90 y 120 nt (Brinton y Dispoto, 1988). El dominio II incluye secuencias en forma de pesas denominadas **DB** (DB1 y DB2, *dumbbell-shaped*), las cuales se duplican en *tándem* (Silva *et al.*, 2008), contienen secuencias conservadas (**CS2**) y repetidas conservadas (**RCS2**) (Proutski *et al.*, 1997). Se ha descrito que los dominios I y II no son esenciales para la replicación viral, sin embargo sirven como potenciadoras del proceso. El dominio III es la región más conservada de 3'UTR, se conforma por una secuencia conservada seguida de una estructura en lazo (**CS1-3'SL**) que termina la secuencia del genoma viral. CS1 contiene una región involucrada en las interacciones ARN-ARN entre los extremos finales del genoma viral; mientras que 3'SL contiene un pequeño lazo de 14 nt (sHP) seguido de uno grande de 79 nt sumando los 93 nt finales del genoma viral (Figura 3.) (Proutski *et al.*, 1997).

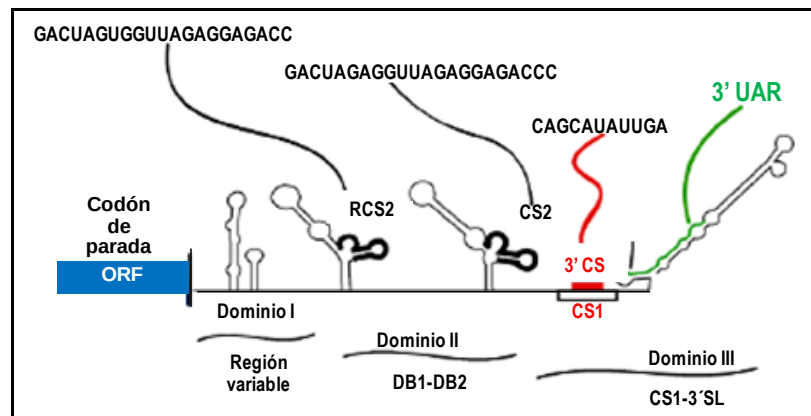


Figura 3. Esquema de la estructura de la predicción de la estructura secundaria de la región 3' terminal del genoma de DENV. Se evidencian tres dominios: I (región variable), II (DB1 y DB2), y III (secuencias conservadas CS1 y 3'SL). Fuente: Gebhard *et al.* (2011).

2.2.3.- Infección viral

Para lograr la replicación, disseminación y expresión de sus genes, las diferentes familias de virus ARN emplean diversas estrategias y ciclos de vida que se aprovechan de la biología y bioquímica de los hospedadores. Cada infección viral representa el encuentro entre la programación genética de un virus y su hospedador (Lindenbach y Rice, 2001). En términos generales la infección celular por los DENV, se divide en anclaje y adsorción viral, replicación del genoma viral, traducción de proteínas virales, ensamblaje, egreso, maduración y liberación de las partículas virales viables para dar inicio a otro ciclo de infección en las células cercanas (Figura 4).

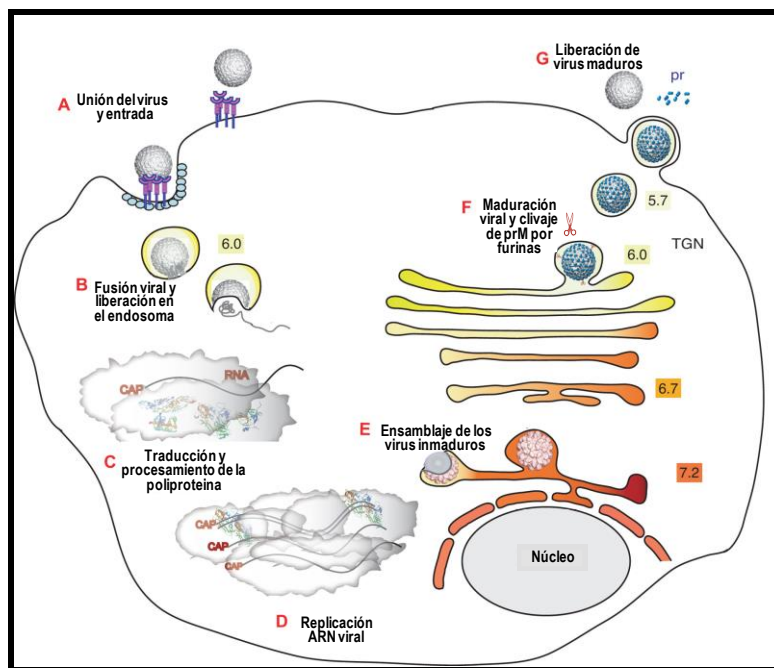


Figura 4. Ciclo de vida de los flavivirus. **A.** Los virus se unen a la superficie celular a través de receptores y son internalizados a través de endocitosis **B.** En el endosoma, las glicoproteínas virales median la fusión entre el virus y la membrana celular permitiendo la liberación del citoplasma **C.** El RNA viral es traducido y la poliproteína es procesada por proteasas virales y celulares **D.** Las proteínas no estructurales replican el genoma viral **E.** Ensamblaje viral en la membrana del RE. **F.** Transporte de las partículas virales inmaduras a través del aparato de Golgi **G.** Liberación de las partículas maduras en el citoplasma. Fuente: Perera *et al.* (2008).

2.2.3.1.- Anclaje y adsorción viral

La replicación de flavivirus (*e.g.* DENV) ocurre porque éstos virus son capaces de infectar numerosas células humanas, tales como células dendríticas (DC-SIGN, *Dendritic Cell*), monocitos/macrófagos, células B, células T, células endoteliales, hepatocitos y células neuronales (Clyde *et al.*, 2006).

De igual forma, infectan una amplia variedad de cultivos celulares, provenientes de vertebrados y artrópodos. El primer paso del proceso de infección viral, requiere la interacción entre la partícula viral y el complejo receptor presente en la superficie de la célula hospedadora. Específicamente, el virus interacciona con receptores o co-receptores ubicados en la membrana celular a través del dominio III de la glicoproteína E localizado hacia el extremo carboxiterminal de la misma. Entre los receptores celulares, se encuentran moléculas como el glicosaminoglicano heparán sulfato (HS) presente en gran diversidad de células. En el caso específico de células dendríticas, ubicadas en la piel del hospedador humano y que son el primer blanco de infección, la interacción virus-célula ocurre entre la lectina de unión a la molécula de adhesión intercelular 3 (ICAM3, *intercellular adhesion molecule*), célula dendrítica específica de la molécula de adhesión intercelular (DC-SIGN, *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule Grabbing Non-integrin*) ó un dominio de lectina tipo C 209 (CD209, *C-Type Lectin Domain*), y los residuos de manosa de la Asn (Asparagina) 67 de la proteína E. Por otra parte, se ha identificado al receptor de alta afinidad de laminina de 37/67 kDa y a la proteína regulada por glucosa (GRP78, *glucose-regulated proteins*) como moléculas receptoras para DENV-1 y DENV-2, respectivamente en células hepáticas Hep G2 (línea celular obtenidas de carcinoma hepático) (Chen *et al.*, 1997).

Una vez que ha ocurrido la interacción virus-célula se produce endocitosis mediada por cambios en el pH (Randolph y Stolar, 1990) que facilitan la fusión entre la envoltura viral y la membrana endosomal, con el objeto de que los viriones ingresen al interior celular, donde posteriormente ocurrirá la liberación de la nucleocápside al citosol (Lindenbach y Rice, 2001). Las aminos del lisosoma incrementan el pH del endosoma y bloquean la fusión ácido dependiente, inhibiendo así replicación temprana de los virus. Se cree que una vez se ha completado la pérdida de toda estructura proteica que envuelve el

ácido nucleico (ARNv) ocurre de forma inmediata el proceso de traducción que dará lugar al procesamiento de las proteínas virales, con la subsiguiente conformación de las partículas virales (Chen *et al.*, 1997).

2.2.3.2.- Replicación del genoma viral

La replicación de los DENV ocurre luego del ingreso de las partículas virales a la célula por un mecanismo de endocitosis. Luego de la internalización y acidificación del endosoma, la fusión de membranas virales y vesiculares libera el ARNv dentro del citoplasma, donde actúa como un ARNm. La traducción del ORF en el retículo endoplásmico (RE) rugoso produce una poliproteína que es clivada *co* y *post*-traduccionalmente, para generar proteínas estructurales y no estructurales. La poliproteína es dirigida hacia la membrana del RE, NS1 y los dominios exógenos de prM y C se ubican hacia el lumen; la proteína C, NS3 y NS5 son citoplasmáticas; las proteínas NS2A, NS2B, NS4A y NS4B son predominantemente *trans*-membrana. El procesamiento *post*-traduccional es requerido para la replicación viral, y se lleva a cabo por la proteasa viral NS3 en el citoplasma y por proteasas del hospedador en el lumen. La replicación del ARNv ocurre en estrecha asociación con las membranas celulares dentro de los paquetes vesiculares, denominadas también complejos de replicación viral. A partir de una cadena de ARN, se generarán cientos de copias en tan solo pocas horas. El proceso de replicación comienza una vez que la polimerasa NS5 se une a la región promotora (SLA) e inicia la síntesis *de novo* de ARN a partir de la región terminal 3' del genoma. Es importante destacar que aunque es necesario el reconocimiento de los nt en SL en la región 3' por parte de la polimerasa durante el proceso de iniciación, 3'UTR por sí misma no funciona como un molde para la síntesis de ARN *in vitro*. En el contexto del genoma viral, la hibridización de secuencias complementarias 5'-3'UAR induce cambios conformacionales dentro de SLB en 5'UTR, y en 3'SL de 3'UTR. Este hecho propone que la hibridización juega un doble rol, el primero es atraer el complejo polimerasa-SLA cerca de 3'terminal y segundo abrir el gran tallo de la estructura 3'SL por hibridización de 5'-3'UAR (Figura 5.A) (Filomatori *et al.*, 2011).

De forma particular, se ha descrito que la polimerasa RdRps viral reconoce específicamente elementos tipo ARN ubicados en el extremo 5', lo que favorece la amplificación de ARNv, pero no ARNm celular, por lo tanto discrimina éstas moléculas de ARN en el citoplasma de las células infectadas (Filomatori *et al.*, 2006). El mecanismo descrito sugiere que la RdRp tiene un delgado canal que tendría espacio solo para alojar el extremo 3' del ARNv, cuyas dimensiones solo permitirían el acceso a cadenas únicas de ARN (Yap *et al.*, 2007). Otro aspecto de interés en el proceso de replicación viral, viene representado por el rol que juega el espaciador oligoU como promotor de la acción de la RdRp viral (Filomatori *et al.*, 2011) (Figura 5.B.).

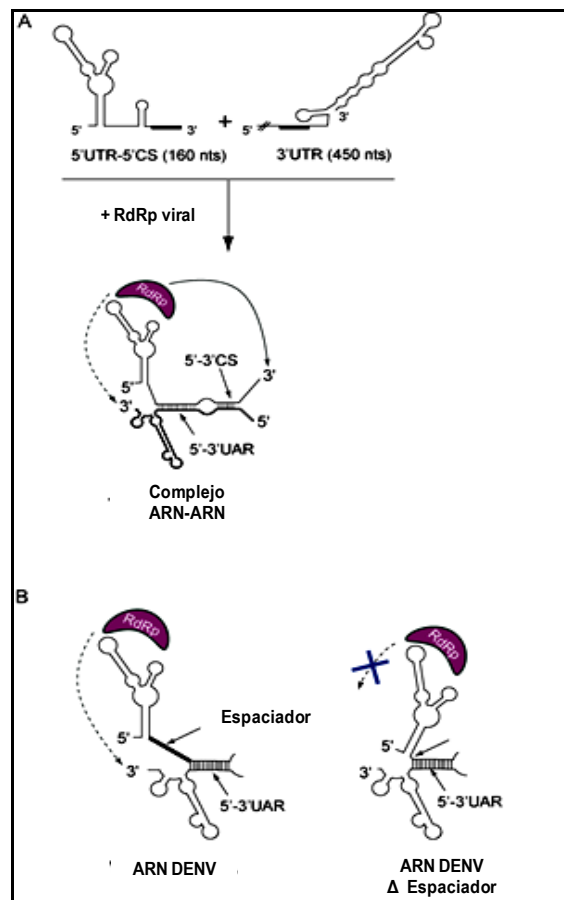


Figura 5. Representación de un ensayo de iniciación *in vitro* de la síntesis de ARN viral. **A:** Formación del complejo ARN-ARN entre los primeros 160 nt (5'UTR-5'CS) y 3'UTR lo que permite que la RdRp inicie la síntesis de ARN. **B:** Representación esquemática del rol del espaciador oligo U en la síntesis de ARN. El oligo U permite que la RdRp inicie la síntesis a partir de 3'UTR. En contraste, una molécula de ARN con delección del oligoU es incapaz de promover la síntesis de ARN. Fuente: Filomatori *et al.* (2011).

2.2.3.3.- Mecanismo de traducción del genoma viral

A partir de los ARNv liberados luego de la internalización en las células y los ARNv producto de la replicación, ocurre el proceso de traducción para generar una poliproteína que luego de un procesamiento co y post-traducciona por acción de proteasas virales y celulares da lugar a la producción de las proteínas estructurales y no estructurales (Leitmeyer *et al.*, 1999). La síntesis de la poliproteína viral consiste en una serie de eventos que requiere de una gran cantidad de componentes que no puede codificar el genoma viral por sí solo, lo que genera que los virus tengan dependencia de la maquinaria de traducción eucariótica para su producción y el desarrollo de mecanismos que puedan competir con los ARNm celulares, por ejemplo, sus efectos y control sobre los factores de traducción (Edgil *et al.*, 2006).

A continuación se describen los componentes principales de la síntesis de proteínas en eucariotas, que corresponden también a los componentes involucrados en la traducción viral de forma directa o indirecta, además de la descripción de los mecanismos involucrados en las diferentes fases del proceso: iniciación, elongación y terminación.

2.2.3.3.1.- Componentes principales de los mecanismos de traducción

Durante el proceso de traducción en las células eucariotas están involucrados: el ARNm (ácido ribonucleico mensajero), ARNt (ácido ribonucleico de transferencia), aminoacil-sintetasas, ribosomas y una serie de factores proteicos relacionados con el inicio, elongación y terminación de la síntesis.

-ARNm: los ARNm celulares son moléculas que actúan como intermediarios, poseen la función de transferir el mensaje genético desde el núcleo al citoplasma, ya que al ser una copia de la información contenida en la secuencia de ADN funcionan en el ribosoma como molde para la síntesis proteica. Desde el punto de vista de los ARNv, éstos actuarían como competidores de los ARNm celulares por la maquinaria traduccional. La mayoría de los ARNm celulares tienen la particularidad de contener en su extremo 5' una estructura denominada 7-metilguanosina-trifosfato (m7GpppN), caperuza de guanina, caperuza 5',

casquete 5' o simplemente CAP. A nivel del extremo 3' se puede observar una cola poliadenilada, conformada por adeninas incorporadas por acción de la enzima poli(A) polimerasa. De igual forma, los ARNm presentan una estructura denominada secuencia Kozak (5'-ACCAUGG-3') conformada por una purina ubicada a tres bases del codón de iniciación y una guanina presente hacia el extremo 3' y es importante en el reconocimiento de dicho codón por el ribosoma (Watson *et al.*, 2006).

La mayoría de los mensajeros eucarióticos tienen una estructura denominada de lazo cerrado, por interacción de la región 5'UTR y 3'UTR. En dicha interacción intervienen varias proteínas, algunas de ellas, factores traduccionales (Sonenberg y Hinnebusch, 2009). Como se describió anteriormente, los ARNv también presentan una interacción entre la región 5'UTR y 3'UTR importante en el mecanismo de replicación, sin embargo, se ha descrito que igualmente podría participar en la interacción con factores traduccionales (García-Montalvo *et al.*, 2004; Edgil *et al.*, 2006; Polacek *et al.*, 2009).

-ARNt: actúan como moléculas intermedias o adaptadores de los aminoácidos en la síntesis de proteínas según el codón especificado sobre el ARNm. La función adaptadora tiene lugar por una doble interacción, primero por un extremo de la molécula que une el aminoácido para dar el aminoacil-ARNt (forma activa para la formación del enlace peptídico) y luego por apareamiento del otro extremo con la molécula de ARNm en presencia del ribosoma, favoreciendo de este modo la transferencia del aminoácido al péptido creciente (Luque y Herráez, 2006).

La estructura secundaria de los ARNt se describe como una “hoja de trébol”, donde se distinguen tres brazos o asas principales y un brazo o asa menor. **El brazo aceptor** contiene la secuencia CCA-3' donde se une el aminoácido por la acción enzimática de las aminoacil-ARNt sintetasas específicas. **El brazo del anticodón o asa II** se ubica en el centro de la molécula y contiene secuencias tripletes para la interacción codón-anticodón con el ARNm. **El brazo T, TΨU ó asa I** y **el brazo D, DHU o asa III** contienen bases modificadas importantes para la interacción con el ribosoma. **El brazo variable, brazo menor o asa IV** se ubica entre el asa anticodón y el asa ψU y define los ARNt de clase I (3

y 5 nucleótidos) y los ARNt de clase II (13-21 nucleótidos apareados con un lazo de 5 nucleótidos) (Lewin, 2004; Luque y Herráez, 2006). Los ARNt celulares tienen la capacidad de tener una interacción de naturaleza codón-anticodón con cualquier ARN enlazado al ribosoma, por lo tanto, también reconocen y decodifican los tripletes de los ARNv.

-Aminoacil-ARNt sintetasa: el proceso de unir un ARNt con su aminoácido correspondiente es catalizado por las enzimas aminoacil-ARNt sintetasa (aaRSs sintetasa) en un proceso que requiere la hidrólisis de ATP a AMP; estas enzimas tienen tres sitios activos para el aminoácido, el ARNt y el ATP. Existe una sintetasa para cada aminoácido y una enzima a su vez puede ser específica para más de un ARNt. El proceso de aminoacilación comprende dos etapas: **(1)** reacción del aminoácido con el ATP, en la cual el aminoácido reacciona con el fosfato α del ATP formando un intermediario (aminoacil-AMP-Enzima) y liberando pirofosfato (PPi); **(2)** transferencia de este aminoácido al extremo 3' del ARNt, con la formación de un enlace éster entre el grupo COOH del aminoácido y el grupo OH unido al carbono 2' o 3' de la ribosa de la adenina del extremo 3' del ARNt (Lewin, 2004; Luque y Herráez, 2006). Estas reacciones para formar los aminoacil-ARNt son necesarias para que se lleve a cabo la traducción y preceden a la etapa de iniciación de la síntesis de proteínas.

-Ribosomas: son partículas subcelulares determinantes en la transmisión de la información genética y donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas. Están conformadas por proteínas y ARNr (ARN ribosomal), lo que determina su denominación como ribonucleoproteína y constituidas por dos subunidades, la subunidad pequeña y la subunidad grande, que representa dos veces la masa de la subunidad pequeña. Las subunidades de los ribosomas bacterianos (70S) tienen coeficientes de sedimentación 50S y 30S, mientras que los ribosomas eucariotas (80S) se conforman por subunidades cuyos coeficientes de sedimentación son 60S y 40S. Estas subunidades se encuentran asociadas por interacciones no covalentes y el ARNm o el ARNv interactúa con ambas subunidades en la interfase ribosomal durante su traducción para la formación de la cadena polipeptídica. Los ribosomas proveen el ambiente que controla el reconocimiento entre el codón del ARNm y

el anticodón de ARNt y dan lugar al inicio del proceso de traducción a partir del extremo 5' de la región codificante del ARNm (Lewin, 2004).

2.2.3.3.2.- Mecanismo traduccional en células eucariotas

2.2.3.3.2.1.- Iniciación de la traducción

En la fase de iniciación ocurre la unión de los componentes que participan en el proceso y cuyo resultado final es la formación del complejo de iniciación 80S, constituido por el ribosoma, el ARNm y el ARNt de metionina iniciador ($\text{Met-ARNt}_i^{\text{Met}}$) unido al codón de iniciación AUG del ARNm y ubicados en el sitio P del ribosoma. La síntesis de proteínas inicia universalmente en el codón AUG, que codifica la metionina y tiene diversos mecanismos de control que hacen que sea la etapa limitante de la velocidad traduccional (Hershey y Merrick, 2000; Kapp y Lorsch, 2004a). En la iniciación traduccional pueden distinguirse dos mecanismos principales dependiendo, en la mayoría de los casos, de la condición del ARNm: iniciación traduccional canónica o dependiente de CAP y no canónica independiente de CAP o iniciación traduccional por entrada interna.

A. Iniciación de la traducción dependiente de CAP o canónica: en este tipo de iniciación traduccional participan al menos 12 factores de iniciación (eIFs) y es la más común en células eucarióticas para los ARNm con CAP (Hershey y Merrick, 2000; Kapp y Lorsch, 2004a). Al tener los ARNv de los DENV, una estructura CAP, algunas investigaciones apoyan que podrían tener un proceso traduccional del tipo canónico. Los eventos que ocurren en la fase de iniciación para los ARNm con la estructura CAP en la región 5'UTR se esquematizan en la Figura 6 y se pueden distinguir cuatro pasos:

– Paso 1. Formación del complejo de preiniciación 43S

La iniciación de la síntesis de proteínas requiere de la disociación del ribosoma. Los factores de iniciación 3 (eIF3) y 1A (eIF1A) se unen a la subunidad 40S y el factor eIF6 a la subunidad 60S impidiendo su re-asociación y desplazando el equilibrio hacia las

subunidades libres. Al mismo tiempo, el factor de iniciación 2 (eIF2) forma un complejo ternario, al unirse a GTP y al ARNt iniciador cargado con metionina (eIF2•GTP•Met-tRNA_i^{Met}) y dicho complejo se enlaza a la subunidad ribosomal pequeña (40S), facilitada por los factores de iniciación 1, 1A y 3 (Kapp y Lorsch, 2004; Komar *et al.*, 2005, Merrick, 2010). El complejo total formado recibe el nombre de **complejo de preiniciación 43S**.

– **Paso 2. Unión del ARNm a la subunidad ribosomal 40S**

Para que ocurra la unión del complejo de preiniciación 43S al ARNm con la estructura de CAP se necesitan varias proteínas, incluyendo las del complejo proteico denominado eIF4F (Kahvejian *et al.*, 2005). Este complejo está formado por las subunidades eIF4A, eIF4B, eIF4E y la subunidad eIF4G. Tres de estas subunidades (eIF4E, eIF4B, eIF4G) son fosfoproteínas, y los niveles de fosforilación del complejo eIF4 parecen controlar la traducción de algunos mensajeros con la estructura de CAP bajo ciertas condiciones celulares. La subunidad eIF4E reconoce específicamente a la región m⁷G-CAP con una afinidad muy alta y su enlace a esta estructura provoca la unión del resto de los polipéptidos al ARNm. La unión del ARNm al complejo de preiniciación 43S se produce a través de la subunidad eIF4G, la cual tiene capacidad de enlace al eIF3 que se encuentra sobre la subunidad 40S, y al mismo tiempo, al eIF4E que está interactuando con el ARNm.

– **Paso 3. Formación del complejo de preiniciación 48S**

Una vez que el complejo de preiniciación 43S se une a la región 5' terminal del ARNm, se produce el desplazamiento o “*scanning*” de este complejo a lo largo de la región 5'UTR del ARNm. Durante este proceso ocurre el desdoblamiento de las estructuras secundarias del ARNm en la región 5'UTR debido a la energía liberada por la hidrólisis de ATP, un evento que es catalizado por la helicasa eIF4A del complejo eIF4, y a su vez, esta actividad es estimulada por el eIF4B. El desplazamiento termina cuando el complejo de preiniciación 43S reconoce al codón de inicio AUG (Kozak, 2005). Seguidamente ocurre la hidrólisis de GTP en el complejo ternario (eIF2.GTP.Met-ARNt_i^{Met}) y se produce la unión del Met-ARNt_i^{Met} al triplete AUG sobre el mensajero, por una interacción de tipo codón-

anticodón, formándose el **complejo de preiniciación 48S** y quedando el Met-ARN_t^{Met} colocado en el sitio P de la subunidad 40S. El complejo binario eIF2•GDP liberado en cada ciclo de iniciación debe ser reciclado a eIF2•GTP para comenzar un nuevo ciclo, y este cambio es facilitado por el factor de iniciación 2B (eIF2B) (Kapp y Lorsch 2004a; Merrick, 2010).

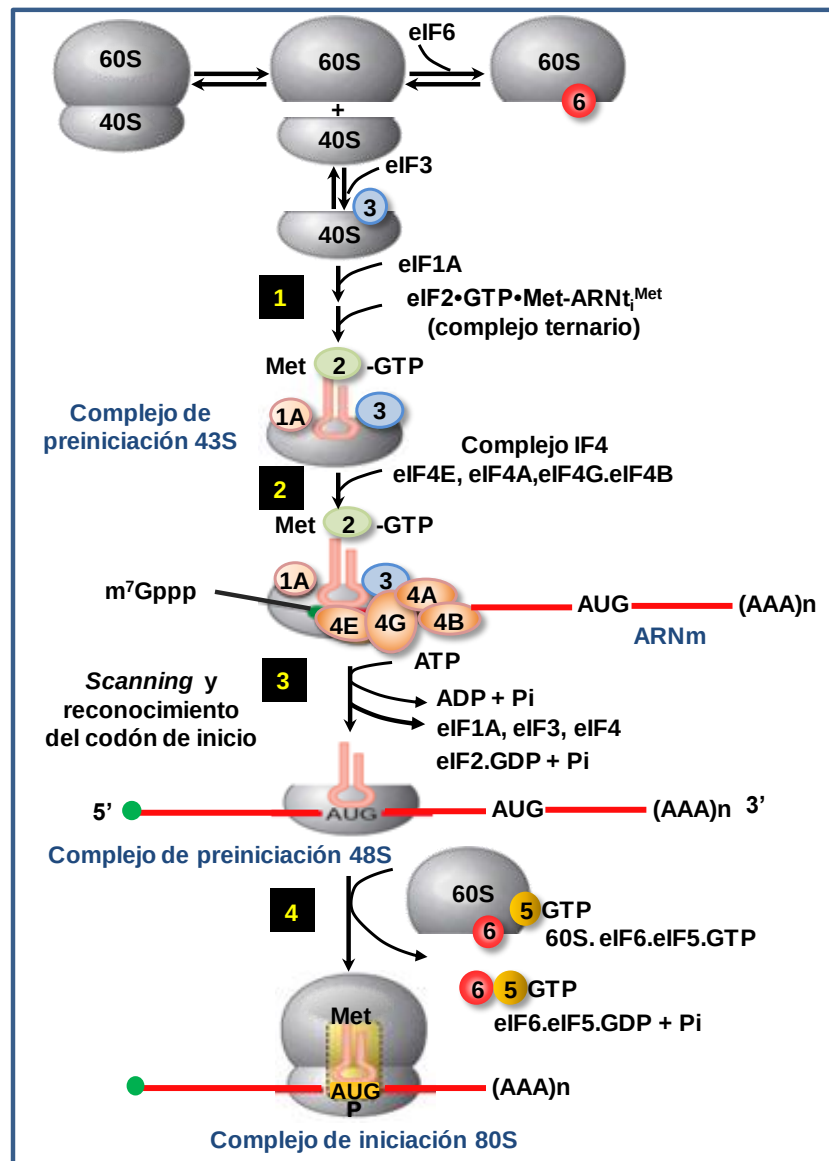


Figura 6. Iniciación de la traducción dependiente de CAP o canónica. Se muestran los diferentes pasos (1→4) de la iniciación y los factores descritos que intervienen desde la disociación del ribosoma hasta la formación del complejo de iniciación 80S. (Fuente: Lodish *et al.*, 2005).

Paso 4. Formación del complejo de iniciación 80S

Una vez formado el complejo de preiniciación 48S, se produce la hidrólisis de GTP en el complejo binario asociado a la subunidad 60S y formado por el nucleótido y el factor 5 de iniciación (eIF5B•GTP), y este evento origina la unión de la subunidad 60S al complejo de preiniciación 48S dando lugar a la formación del **complejo de iniciación 80S**. Durante la reacción se produce la liberación de eIF5•GDP (con baja afinidad por el ribosoma) y de eIF6 que se encuentra asociado a la subunidad 60S (Kapp y Lorsch, 2004a). El complejo de iniciación 80S formado queda listo para iniciar el ciclo de la elongación de la síntesis de proteínas (Merrick, 2010).

En la secuencia de adeninas de la región 3' terminal de los ARNm celulares se encuentra asociada una proteína denominada PABP (*poly A binding protein*). Este polipéptido ha sido involucrado en la iniciación traduccional al facilitar la interacción de los mensajeros con el ribosoma, así como también, el aumento de la velocidad y eficiencia traduccional. Dicho efecto durante la iniciación traduccional es posible debido a la participación de PABP en la formación de la estructura de lazo cerrado de los ARNm o la asociación de las regiones 5' y 3' UTR (Sonenberg y Hinnebusch, 2009).

Como ya fue descrito, los ARNV también presentan una interacción entre la región 5'UTR y 3'UTR que participa en la replicación, sin embargo, su intervención en la traducción no está clara, aunque se ha sugerido que podría tener una función en este proceso, ya que la estructura parece interactuar con factores traduccionales, entre ellos, PABP (Edgil *et al.*, 2006; García-Montalvo *et al.*, 2004). En un estudio realizado por Polacek *et al.* (2009) se demostró una afinidad bioquímica de PABP por la región 3'UTR de DENV, específicamente en 3'SL, donde se encuentran secuencias ricas en A delimitadas por estructuras DB. Esta evidencia indicaría que PABP, podría estar siendo utilizado como un factor de unión (tipo “puente”) para la circularización del ARN de DENV y en consecuencia en el incremento y eficiencia de la traducción, independientemente de la ausencia de cola de poli(A) en el mensajero viral.

B. Iniciación de la traducción independiente de CAP o no canónica: Algunos especímenes virales de tipo ARN y algunos ARNm de eucariotas tienen un inicio traduccional independientemente de CAP, a través de la asociación directa de la subunidad 40S a un sitio interno del ARN denominado IRES (del inglés, *Internal Ribosome Entry Site*).

La interacción entre IRES y la subunidad 40S puede realizarse de tres modos: **1)** El sitio IRES incluye el codón de iniciación AUG donde se une directamente la subunidad 40S haciendo uso de un grupo de factores necesarios para la iniciación en el extremo 5', **2)** El sitio IRES se ubica aproximadamente 100 nt “corriente arriba” requiriendo de la migración de la subunidad 40S hasta el codón AUG, probablemente por un mecanismo de búsqueda a través de la cadena, y **3)** Un tipo excepcional de IRES presente en el virus de la Hepatitis C que puede unirse directamente a la subunidad 40S y al eIF3, sin necesidad de la participación de ningún factor del grupo 4 (eIF4E y eIF4G) (Pestova *et al.*, 1996b). El uso de IRES es de particular importancia en el caso de infecciones por picornavirus, en los cuales se descubrió por primera vez este tipo de mecanismo (Lewin, 2004).

En el caso de DENV y otros flavivirus, tales como virus del Oeste del Nilo (VON), Fiebre Amarilla, Kunjin y Encefalitis Japonesa, cuyo genoma viral es de tipo ARN y contiene una estructura tipo CAP en el extremo 5' se ha creído que el proceso de traducción es absolutamente dependiente de CAP. Sin embargo, en el caso específico de DENV, a pesar de que se ha descrito dependencia de los factores de traducción celular para su síntesis de proteínas, se presume que pudiera haber algún otro mecanismo de traducción dependiendo de las condiciones. Este hecho se sustenta en observaciones realizadas en células indiferenciadas, tales como líneas mieloides que han sido infectadas por DENV y en las que se conoce hay cantidades limitantes de factores de traducción. Al respecto, Edgil *et al.* (2006) demostraron que al restringir la maquinaria dependiente de CAP por supresión de la expresión de eIF4E o por adición de inhibidores (LY294002, Wortmanina o ARN inhibidor específico para eIF4E) no lograban afectar de forma notoria la producción de la progenie viral, ni tampoco los niveles de síntesis de proteínas. Estas observaciones

sugerían, que la traducción podía realizarse por un mecanismo independiente de CAP, pero no se asociaba con IRES debido a la ausencia de la misma en la región 5'UTR del genoma de DENV.

En relación a estos resultados, los autores sustentaron la idea de un modelo en el cual la interacción de los extremos 5'UTR y 3'UTR permitía al DENV, traducirse mediante la estabilización de los factores de iniciación a nivel del extremo 5' del ARNv, lo que permitiría que factores de iniciación traduccional, como eIF4G y eIF4A, fueran incorporados, haciendo innecesario el requerimiento de eIF4E. Otros autores han descrito la acción de proteínas (eEF1A, La, PTB, YB-1 y hnRNP A1 y Q) que se asocian al extremo 3'UTR de DENV (García-Montalvo *et al.*, 2004). Estas proteínas tendrían el rol de unir los extremos 5'UTR y 3'UTR para favorecer la traducción viral.

Conclusiones adicionales, destacan la relevancia biológica de la independencia de DENV de eIF4E para su traducción, y podría asociarse con la habilidad de éstos virus para traducirse bajo condiciones particulares, como ocurre con las células mieloides y dendríticas (Grolleau *et al.*, 1999), inclusive en células bajo condiciones de *stress* (privación de nutrientes, choque por calor, entre otros). De este modo, la existencia de dos mecanismos para que el genoma de DENV pueda ser traducido sería de significativo impacto debido al complejo ciclo de vida que deben mantener (*e.g.* mosquito y humanos), así como a los diversos tipos celulares presentes en el hospedador. Un estudio realizado con células HepG2 infectadas con DENV propuso una traducción dependiente de CAP durante las primeras horas de infección, y luego un cambio hacia un proceso independiente de CAP por inhibición de factores de la iniciación traduccional y de transcripción, así como la desfosforilación de 4E-BP1 (proteínas de unión a 4E para su regulación) y p70S6K (proteína de fosforilación de S6 ribosomal que es importante en la iniciación) (Villas-Bôas *et al.*, 2009).

2.2.3.3.2.2.- Elongación y terminación de la traducción

Una vez formado el complejo de iniciación 80S por cualquiera de los mecanismos descritos, comienza el proceso de elongación traduccional y su culminación en la etapa de

terminación. Es de suponer que estos eventos, llevados a cabo de la misma forma e independientes del ARN que es codificado, sean equivalentes para los ARNv y los ARNm celulares.

La **elongación** traduccional involucra todas las reacciones de síntesis desde la adición del segundo aminoácido hasta el último. Es el evento más rápido en el proceso de síntesis de proteínas (Lewin, 2004), con una característica cíclica que se repite tantas veces como aminoácidos sea necesario incorporar.

Durante la elongación (Figura 7.A.) se pueden diferenciar tres eventos: **(1)** unión del aminoacil-ARNt al sitio A del ribosoma, **(2)** formación del enlace peptídico, y **(3)** translocación (Budkevich *et al.*, 2011; Kapp y Lorsh, 2004a).

En el primer paso, el aminoácido entrante, según el codón especificado sobre el ARNm, es llevado al sitio A ribosomal por el factor de elongación eEF1A en el complejo ternario (aminoacil-ARNt•eEF1A•GTP), formado por el aminoacil-ARNt, GTP y el factor (Chiu *et al.*, 2005; Davis *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2002). Se produce la hidrólisis de GTP y eEF1A es liberado del ribosoma para entrar en un nuevo ciclo.

Seguidamente, en el segundo paso, ocurre la formación del enlace peptídico entre la metionina iniciadora o el peptidil en el sitio P ribosomal y el aminoácido entrante en el sitio A ribosomal. La reacción de transpeptidación tiene lugar en la subunidad 60S, en la región conocida como centro peptidiltransferasa y no se requiere de algún factor en especial para que se produzca este enlace (Chakraborty y Triana-Alonso, 1998; Kapp y Lorsch, 2004a; Lewin, 2004).

En el tercer paso, una vez formado el enlace peptídico, se produce el movimiento relativo del ribosoma/ARNm o translocación, impulsada por la hidrólisis de GTP llevada a cabo por el factor de elongación 2 (eEF2.GTP) y con este proceso entra un nuevo codón del ARNm en el sitio A ribosomal, el peptidil-ARNt se coloca en el sitio P y el deacilado-ARNt pasa al sitio E ribosomal. Posteriormente, el deacilado-ARNt es retirado del

ribosoma en un mecanismo concertado con la interacción del nuevo aminoacil-ARNt en el sitio A ribosomal. Estos eventos se repiten hasta que el ribosoma encuentra a un codón de terminación sobre el mensajero, el cual indica la finalización de la síntesis del polipéptido (Figura 7.B).

2.2.3.5.- Ensamblaje viral

Se inicia en el lumen del RE, cuando el genoma ARNv se asocia con la proteína C para formar la nucleocápside y adquiere la envoltura del RE hospedero. Las partículas virales son llevadas en vesículas de transporte que salen de la membrana del RE y, por un mecanismo específico son translocadas al pre-Golgi, pasando posteriormente al aparato de Golgi. La escisión de las proteínas prM, M, E y NS1 tiene lugar en las vesículas ácidas del post-Golgi (Rice, 1996; Randolph y Stolar, 1990). Hay evidencias que indican que prM y E forman un heterodímero, en el cual prM sirve para proteger a E en el virión inmaduro, previniendo la activación o exposición prematura del dominio de fusión de la proteína E de los nuevos viriones durante su transporte intracelular hacia el aparato de Golgi (Bray y Lai, 1991; Wang *et al.*, 1999). Subsecuentemente, el clivaje proteolítico de prM toma lugar, generándose la proteína M del virión maduro (Stadler *et al.*, 1997). En las vacuolas de pre y post-Golgi, las proteínas de E comienza a glicosilarse e inician su transporte exocítico hasta la superficie celular. La liberación del virus puede ocurrir por fusión de las membranas de la vesícula exocítica, que contiene al mismo, con la membrana citoplasmática o por efecto citopático a través de rupturas puntuales en la membrana celular (Monath y Tsai, 1997).

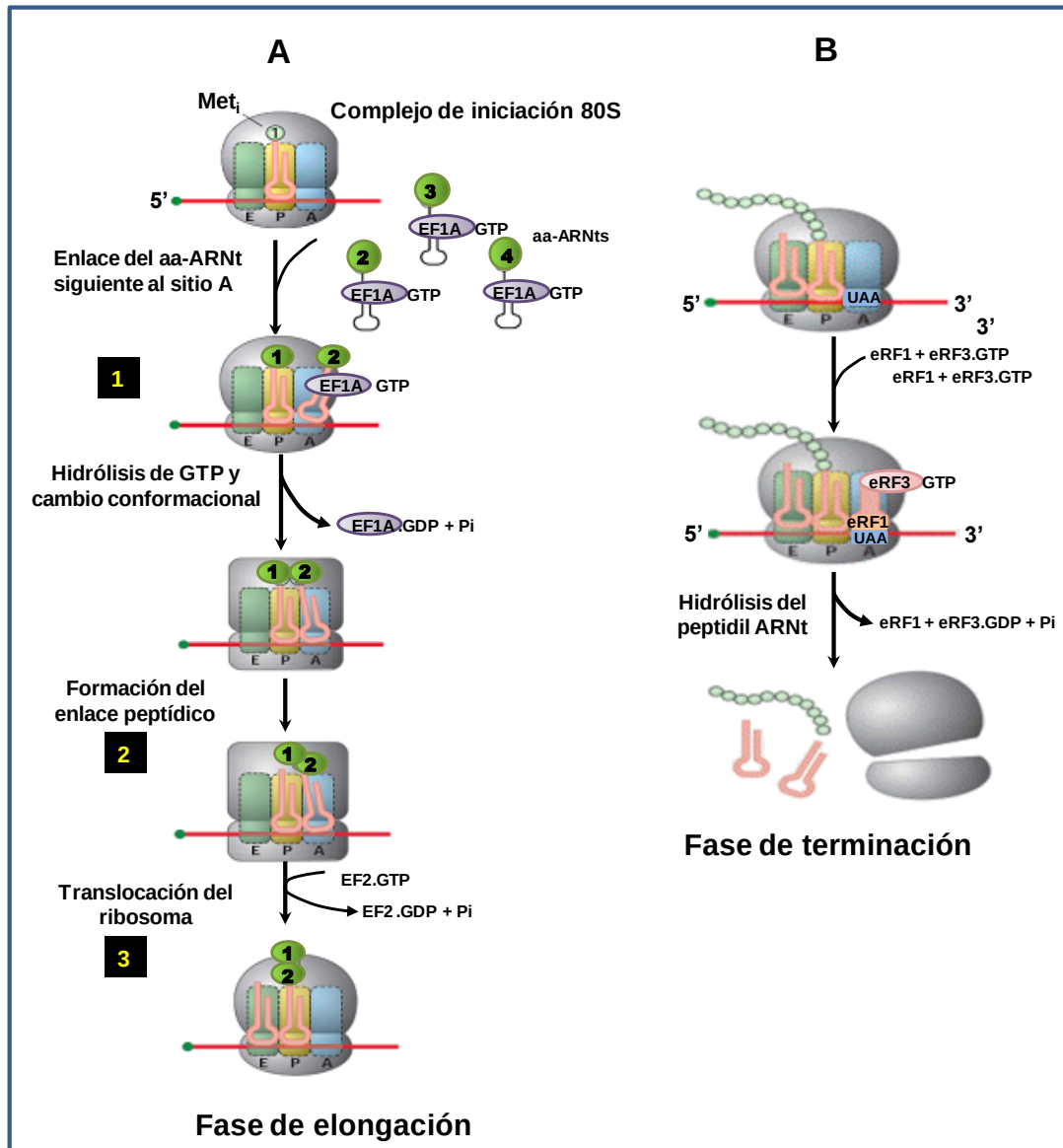


Figura 7. Fase de elongación y terminación de la síntesis de proteínas. **A:** Elongación. Una vez formado el complejo de iniciación 80S, el aminoacil-ARNt (aa-ARNt) se une al sitio A del ribosoma y luego de la formación del enlace peptídico, comienza la elongación del péptido. Después de la translocación el ciclo se repite con la selección del aa-ARNt siguiente hasta alcanzar el codón de terminación. **B:** Terminación. El codón de terminación es reconocido por los factores eRF1 y eRF3, lo cual promueve la hidrólisis del enlace entre el péptido y el ARNt y su liberación del complejo ribosomal (Modificado de Lodish *et al.*, 2005).

2.2.4.- Proteínas virales

2.2.4.1.- Proteínas estructurales

-Cápside (C): es una proteína pequeña de 9 a 12 kDa que contiene de 112 a 127 aminoácidos, cargada positivamente debido al gran número de residuos de *Lys* y *Arg*, las cuales se creen neutralizan la carga negativa del ARNv con el cual están asociadas. La proteína C1 precursora de la proteína C del virión contiene un dominio hidrofóbico C-terminal que sirve de secuencia señal para prM en el ensamblaje de la nucleocápside (Chang, 1997). Es el primer polipéptido viral sintetizado durante la traducción. Se cree que el dominio carboxi-terminal, actúa como transductor de señales a través de la membrana que media la inserción del precursor prM dentro del RE rugoso (Murray *et al.*, 1993).

-Proteína de membrana (M): contiene dos formas; **prM**, contenida en el espacio intracelular de los viriones inmaduros y la proteína **M**, presente de forma extracelular en los viriones maduros. La prM es una glicoproteína que contiene 166 aminoácidos, luego de su clivaje en la posición 91 produce el péptido pr y la proteína M. Se ha descrito que prM produce un rearrreglo de las estructuras oligoméricas de la superficie del virión que aumenta la infectividad de viriones maduros (Chang, 1997). Se cree también que prM actúa como una proteína chaperona al proteger a la proteína E de cambios conformacionales irreversibles antes de la maduración del virión (Yábar, 2003). Además, la asociación de prM con E estabiliza ciertos epítomos de la proteína E sensibles a cambios de pH, previniendo cambios conformacionales que ocurren normalmente a pH ácido y que activan la actividad fusogénica de la proteína de E (Bray y Lai, 1991; Wang *et al.*, 1999).

-Proteína de envoltura (E): es una proteína de 55 a 60 kDa, es el mayor componente de la superficie del virión y está glicosilada en la mayoría de los flavivirus. Es una proteína multifuncional involucrada en la unión a receptores celulares y su entrada a las células hospedadores por fusión con la membrana celular (Lindenbach *et al.*, 2007). Esta proteína constituye el principal componente en la superficie celular, y presenta importantes determinantes antigénicos, que inducen la producción de anticuerpos Inhibidores de la Hemaglutinación (IH) y neutralizantes como parte de la respuesta inmune del hospedero

infectado (Burke y Monath, 2001). La proteína E contiene tres dominios a nivel de N terminal, compuestos principalmente por estructuras β plegadas (DI, DII y DIII); mientras que en C terminal la proteína E contiene dos α hélices (EH1 y EH2), también se han descrito dos dominios transmembrana en la región de anclaje (ET1 y ET2) en la membrana lipídica. En estudios realizados en flavivirus (*e.g.* virus de la Encefalitis transmitido por garrapatas, TBEV), ET2 y ET1 son necesarios para el ensamblaje de la proteína E. EH2 puede estabilizar el heterodímero prM-E, mientras que EH1 está involucrado en procesos de trimerización de la proteína E soluble en ambientes con pH bajo (Allison *et al.*, 1995a).

2.2.4.2.- Proteínas no estructurales

-NS1: es una glicoproteína conservada con un peso molecular de 46-55 kDa, que depende del estatus de glicosilación, los cuales existen en diferentes formas y en distintas localizaciones celulares (Muller y Young, 2013). NS1 inmadura existe como un monómero en el RE, el cual es procesado hacia un homodímero que se une covalentemente a la superficie de la membrana. La NS1 madura contiene 352 residuos aminoacídicos con dos sitios de N glicosilación en los residuos 130 y 207. Se han descrito 12 residuos de cisteína en todos los flavivirus, indicando la importancia de puentes disulfuro en la estructura y función de NS1 (Wallis *et al.*, 2004).

Se ha sugerido que juega un rol en la maduración del virión cuando está asociada a la proteína E inmadura y se relaciona con la morfogénesis y virulencia de la partícula viral. Está fuertemente involucrada con la respuesta inmune específica de serotipo. Esta proteína existe en diferentes formas y puede encontrarse en la superficie celular, asociada a los organelos intracelulares, por lo cual se ha identificado como blanco de la respuesta inmune o en forma soluble, secretada en el medio extracelular (Chang, 1997). NS1 se ha encontrado circulando durante la fase aguda de la enfermedad en sueros de pacientes con infecciones primarias y secundarias en concentraciones que no diferían significativamente, este hallazgo sugiere una contribución de la proteína no estructural en la patogénesis del DENV. Además de que su presencia en la sangre desde el comienzo de la enfermedad hizo

pensar en su uso para el diagnóstico temprano si se lograban desarrollar sistemas sensibles y específicos (Alcon *et al.*, 2002).

Al respecto, se han desarrollado una serie de pruebas diagnosticas (Osorio *et al.*, 2010), en vista de las ventajas de NS1 por su sensibilidad para ser detectada en estadios tempranos de la enfermedad y antes de la aparición de anticuerpos anti-DENV de tipo IgM. Adicionalmente, se han realizado estudios que sugiere asociacion de niveles de NS1 con severidad de la enfermedad, sugiriendo su valor pronóstico en la misma (Libraty *et al.*, 2002).

-NS2a, NS2b, NS4a y NS4b: son las proteínas más pequeñas, poseen secuencias poco conservadas, pero perfiles de hidrofobicidad comunes para los flavivirus, lo cual sugiere que son proteínas asociadas a membrana. La mayoría de las funciones de estas proteínas no han sido definidas. NS2a (18-22 kDa) parece ser requerida para el procesamiento C-terminal de NS1, es una proteína hidrofóbica (Chambers *et al.*, 1990), cuyo extremo N terminal se genera en el lumen del RE por la acción de proteasas del hospedador aun no descritas por su parte el extremo C terminal es generado en el citoplasma por proteasas virales. NS2A ha sido involucrada en procesos de replicación viral y en la patogénesis de la enfermedad. NS2b (13-15 kDa), por su parte, posee un dominio hidrofílico probablemente involucrado en la interacción y el cambio conformacional de NS3 para la actividad proteasa, formando un complejo esencial (NS2B-NS3) para el procesamiento de todos los sitios de corte de las proteínas no estructurales y las estructurales. En relación a NS4a (16-16,4 kDa) y NS4b (27-28 kDa), se presume intervienen en la localización de NS3 y NS5 en el complejo de replicasas de membrana, vía interacción proteína-proteína (Chang, 1997).

-NS3: es la segunda proteína en tamaño (69 kDa), es una proteína multifuncional que ha mostrado tener actividades trifosfatasa del ARN, serina proteasa y helicasa (Brooks *et al.*, 2002-1). Se ha descrito su actuación en el clivaje de la poliproteína viral, mediante su dominio serina proteasa ubicado en el residuo N-terminal, junto a un segmento hidrofílico de 40 residuos de NS2B, que actúa como cofactor. El dominio requerido para la actividad

ATPasa/helicasa y NTPasa se ubica a nivel de C terminal de NS3 (Li *et al.*, 2005). La actividad NTPasa, parece mostrar preferencia por sustratos de ribonucleósidos trifosfatos, especialmente por nt de purina (ATP, GTP) y se sugieren que puede ser regulada por NS5 durante la replicación (Yábar, 2003). Las actividades NTPasa y helicasa de NS3 son necesarias para la replicación de la cadena más en el desenrollamiento dependiente de energía (Ackermann y Padmanabhan, 2001). Para NS3 se han descrito cuatro estados conformacionales, lo que demostró la elevada flexibilidad de este complejo proteico (de Almeida *et al.*, 2013).

-NS5: es la última y más grande proteína codificada (104-106 kDa), posee entre 900 y 905 aminoácidos (aa) y también es altamente conservada entre los flavivirus. Es una proteína de naturaleza básica y se presume que contiene al menos dos dominios diferentes; un dominio N-terminal homólogo a la región metiltransferasa [Dominio MTasa], implicado en las uniones S-adenosil-metionina [SAM] y que se sugiere puede estar envuelto en la metilación de la estructura 5'cap [$^{7\text{Me}}\text{G}^{5'}$ -ppp $^{5'}$ -N $^{\text{Me}}$] y un dominio C-terminal con ocho regiones (I-VIII) altamente conservadas que han sido reconocidas en muchas ARN polimerasas dependientes de ARN [Dominio POL] (Ackermann y Padmanabhan, 2001). La interacción de NS5 con elementos promotores presentes en la región 5'UTR del genoma viral es necesaria para la síntesis específica de ARN (Lodeiro *et al.*, 2009).

2.2.5.- Ciclo de transmisión de los DENV

El principal y más eficiente vector de la enfermedad es el mosquito *Aedes aegypti*. Otras especies incluyendo *A. albopictus*, *A. polynesiensis* y *A. pseudoscutellaris*, juegan un papel importante en áreas rurales e insulares del Pacífico y Asia (Mitchell, 1995; Rodhain y Rosen, 1997). Desde la década de los 80's y principalmente debido a la recolonización de regiones tropicales y sub-tropicales en zonas del nuevo mundo, *A.aegypti*, se ha convertido en un excelente transmisor en Suramérica, donde ha sido causa de infecciones por DENV, excepto en Uruguay, donde hasta la fecha permanece libre de DENV. Sin embargo, un estudio reciente reportó que las posibilidades de infección aumentan para este país, debido a los movimientos poblacionales entre países suramericanos (considerados regiones

endemo-epidémicas para DENV) y al aumento en la competencia del vector (Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 2013).

El reservorio del virus, lo constituyen el hombre, el mosquito, y el mono, siendo el primero el único que desarrolla la enfermedad (Benenson, 1995). El virus se transmite al hombre por la picada de un mosquito infectado. En el mosquito, específicamente en la hembra que es hematófaga, el virus se multiplica en el epitelio intestinal, en los ganglios nerviosos, cuerpo graso, cerebro, esófago y glándulas salivales, luego de lo cual permanece infectada y asintomática toda su vida (Gubler, 1998).

Cuando un mosquito infectado pica a un hospedador susceptible, el virus pasa por un período de incubación intrínseca de 3 a 14 días, después de lo cual el paciente presenta un cuadro febril agudo, acompañado de una serie de signos y síntomas inespecíficos (Gubler, 1998). Durante este período, el virus se replica activamente en las células sanguíneas mononucleares, principalmente en los monocitos, lo que provoca la liberación de partículas virales viables (viriones) en el plasma sanguíneo. Este período, se conoce como virémico o viremia. El DENV también se multiplica en células del sistema fagocítico-mononuclear (macrófagos tisulares), por lo que también se puede encontrar en los tejidos de los órganos afectados; tales como: hígado, bazo, pulmón, riñón y corazón; entre otros (Rigau-Pérez *et al.*, 1998).

Si otro mosquito *Aedes* pica a la persona enferma durante el período febril, el mosquito puede infectarse y transmitir el virus a personas no infectadas, después de un período incubación extrínseco de 8 a 12 días (Gubler, 1998). Así, la partícula viral se mantiene en un ciclo de transmisión urbano-rural en las áreas endémicas y epidémicas, que incluye al hombre enfermo, infectado por cualquiera de los cuatro serotipos del DENV, un mosquito del género *Aedes* que se comporta como vector y el individuo susceptible (Gubler y Clark, 1995; WHO, 1997).

2.2.6.- Patogénesis de las infecciones por DENV

La patogénesis de infecciones por DENV y los factores de riesgo para desarrollar FHD/SCD son controversiales, es por eso que se han formulado algunas teorías. La primera y más aceptada fue propuesta por Halstead (1970) y se conoce como teoría de la infección secundaria o amplificación dependiente de anticuerpos (ADA), la misma plantea que aquellos pacientes que cursan una infección secundaria con un serotipo heterólogo, tienen mayor oportunidad de desarrollar las formas severas de la enfermedad. Este hecho se describe porque los anticuerpos heterólogos circulantes de una infección previa, en concentraciones subneutralizantes, reconocen las partículas virales y forman un complejo con ellas. Posteriormente, este complejo es internalizado en las células mononucleares a través del receptor Fc, lo que favorece la multiplicación en células, las cuales en respuesta a la infección secretan sustancias vasoactivas que incrementan la permeabilidad capilar y conducen al choque hipovolémico (Gubler, 1998).

Por otra parte, la teoría de la virulencia de las cepas como responsable de la severidad de la enfermedad, plantea que ciertos serotipos y genotipos de DENV son responsables de los padecimientos más graves. Los serotipos de DENV pueden ser clasificados en diferentes genotipos de acuerdo a variaciones en su secuencia nucleotídica, las cuales han sido asociadas con diferencias en la virulencia (Cologna y Rico-Hesse, 2003). Uno de los ejemplos clave para sustentar esta teoría, lo representa la situación acaecida en 1981 en las Américas con el primer brote de FHD, específicamente en Cuba, el cual coincidió con la introducción de cepas asiáticas de DENV-2, posiblemente más virulentas que las circulantes en la región y que fueron asociadas a los padecimientos más severos (Rico-Hesse, 1990). Este hecho propuso además que la evolución intraepidémica de las cepas circulantes de DENV, podría ser responsable del incremento en la severidad de la enfermedad, debido a que se observó mayor incidencia en la severidad de las manifestaciones clínicas y en la fatalidad en poblaciones con circulación de DENV, lo que suponía un mayor número de pasajes virales en los hospedadores durante la fase epidémica (Kourí *et al.*, 1987).

Estas observaciones fueron sustentadas en estudios realizados en Australia (Streatfield *et al.*, 1993) y en Cuba (Guzmán *et al.*, 2000). Otros estudios realizados en

América y Singapur sugerían que la secuencia de la infección con determinados serotipos y el intervalo de tiempo entre una infección primaria y una secundaria eran determinantes en el desarrollo de cuadros hemorrágicos, se atribuyó un rol determinante a las infecciones primarias causadas por DENV-1 seguidas por infecciones por DENV-2 ó DENV-3 (Guzmán y Kouri, 2003). En relación al hospedador, algunos estudios epidemiológicos indican que los factores genéticos constituyen componentes importantes en la susceptibilidad de la enfermedad. Varios alelos del HLA (clases I y II) se asocian con el desarrollo de cuadros hemorrágicos, así como el polimorfismo de genes que codifican el factor de necrosis tumoral (TNF), receptores Fc, receptor de vitamina D, CTLA-4 y factor de crecimiento transformante β . Asimismo, deficiencias de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) pueden contribuir con el incremento en la replicación de DENV en monocitos (Nkhoma *et al.*, 2009). Finalmente, Lei *et al.* (2008) y Martina *et al.* (2009) sugieren que cualquier explicación que pretenda darse a la presentación de las formas severas de la enfermedad deberá considerar las características clínicas, inmunológicas, patológicas y epidemiológicas de las infecciones por DENV.

2.2.7.- Manifestaciones clínicas de la enfermedad

Clásicamente, la enfermedad causadas por las infecciones por DENV había sido clasificada en diversas formas que podían ir desde formas asintomáticas hasta llegar a cuadros de Fiebre de Dengue (FD), Fiebre Hemorrágica del Dengue (FHD) y Fiebre Hemorrágica del Dengue/Síndrome de Choque por Dengue (FHD/SCD) que en algunos casos desencadenaban en la muerte de los pacientes (WHO, 1997; Gubler, 1998).

En el año 2009, la Organización Mundial de la Salud junto a un grupo de expertos de Latinoamérica y el Sudeste asiático acuerdan definir “el dengue es una sola enfermedad con presentaciones clínicas diferentes y a menudo con evolución clínica y resultados impredecibles”. Se reporta una nueva forma de clasificación clínica donde se establecen cuadros de dengue grave y no grave, éste último a su vez segregado en dos grupos de acuerdo a la presencia o no de signos de alarma (OMS, 2009).

El dengue grave se define por una o más de las siguientes condiciones: **(i)** extravasación de plasma que puede conducir a choque (choque por dengue) o acumulación de líquidos, con insuficiencia respiratoria o sin ella, o ambas **(ii)** sangrado grave o deterioro de órganos grave, o ambos. Para el manejo clínico de los casos se sugirieron tres fases de evolución: febril, crítica y de recuperación. A pesar de la complejidad de la enfermedad en sus manifestaciones, se ha descrito que la misma presenta un manejo relativamente sencillo, económico y muy efectivo para salvar vidas, siempre y cuando se instauren intervenciones correctas y oportunas. La clave es el reconocimiento temprano y la comprensión de los problemas clínicos que se presentan en las diferentes fases de la enfermedad, lo cual lleva a un abordaje racional del manejo de los casos y a buenos resultados clínicos (OMS, 2009).

2.2.8.- Diagnóstico de laboratorio de infecciones por DENV

El diagnóstico oportuno de dengue debe hacerse durante la fase aguda de la enfermedad cuando los niveles de viremia son elevados (0-5 días posteriores al inicio de los síntomas) cuando el ARNv y antígenos solubles (*e.g.* NS1) pueden ser detectados (OMS, 2009). Los anticuerpos de tipo IgM anti-DENV solo pueden ser evidenciados luego de 4 ó 5 días posteriores al inicio de la enfermedad. Algunos ensayos de RT-PCR, incluyendo los sistemas de tiempo real han desarrollado la posibilidad de identificación de los serotipos virales con altos niveles de sensibilidad y especificidad (Muñoz-Jordan *et al.*, 2009). Asimismo, se han automatizados los protocolos de extracción de ARN, facilitando y asegurando el diagnóstico de casos sospechosos. Es importante destacar que cada serotipo viral, pertenece a diferentes linajes genéticos denominados genotipos, los cuales difieren en su secuencia genómica en aproximadamente 5–6% (Rico-Hesse, 2007). En consecuencia, el diagnóstico molecular como herramienta diagnóstica deberá considerar la variabilidad genómica entre las cepas circulantes (Santiago *et al.*, 2013).

- **Tipo de muestras:** para la detección de las partículas virales o del genoma viral, las muestras ideales (suero, plasma, o líquido cerebroespinal o pleural) son aquellas colectadas en el período de viremia, cuya duración es de cinco días luego del inicio de la enfermedad. En el caso de fallecidos, pueden emplearse muestras frescas obtenidas de diversos órganos (hígado, bazo, nódulos linfáticos, sangre ventricular). De igual forma, es posible emplear

muestras de tejidos incluidas en parafina para detección de antígenos virales a través de métodos inmunohistoquímicos, o de genoma viral mediante técnicas moleculares. Para la detección de anticuerpos de tipo IgM es recomendable la colección de muestras luego del 5to día de inicio de los síntomas, mientras que la determinación de seroconversión de anticuerpos de tipo IgG es deseable coleccionar muestras pareadas de sueros, la primera durante los primeros 7 días y la segunda entre los días 14 y 21 posteriores al inicio de la enfermedad (Guzmán y Kourí, 1996).

-Aislamiento e Identificación Viral: para aislar la partícula viral se emplean sistemas que permitan la replicación de DENV para su posterior identificación. Estos sistemas corresponden a mosquitos adultos o larvas (*Toxorhynchites amboinensis*, *Tx splendens* o también *A. aegypti* o *A. albopictus*), cuya eficiencia en términos de sensibilidad y especificidad es elevada, pero con desventajas en términos de laboriosidad para el mantenimiento de larvas y adultos en el laboratorio y lo delicado de la técnica de inoculación (WHO, 1997). Otros sistemas corresponden a los cultivos celulares, representados por líneas de mamíferos (*e.g.* Vero, LLCMK2 y BHK-21) y mosquitos (*e.g.* C6/36, AP61) siendo estas últimas las más sensibles (Vorndam y Kuno, 1997; WHO, 1997).

De igual forma, se han empleado los ratones lactantes inoculados por vía intracerebral en los cuales se han observado evidencias de parálisis y otros signos de afectación del sistema nervioso central, las limitaciones descritas para éste sistema corresponden a cepas que no se adaptan o requieren de pases sucesivos, lo cual consume tiempo y dinero (Guzmán *et al.*, 1984). La identificación de los DENV se realiza mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) a través del uso de anticuerpos monoclonales específicos de grupo (*Flavivirus*), complejo (dengue), subcomplejo y tipo (Henchal *et al.*, 1982). La identificación viral por inmunofluorescencia se realiza una vez que los virus han sido multiplicados, por ejemplo en los cultivos celulares, es decir entre 7 y 10 días posteriores a la inoculación de muestras sospechosas de padecer infecciones por DENV (Halstead y Marchette, 2003).

-Diagnóstico inmunológico: es ampliamente utilizado mediante la detección de anticuerpos anti-DENV (WHO, 1997) y se han empleado diversas técnicas para el diagnóstico de la infección por DENV. Entre las técnicas más utilizadas, se encuentran: **1) Inhibición de la Hemaglutinación (IH):** basada en la capacidad de los DENV de aglutinar los glóbulos rojos de ganso, lo que permite la clasificación de la infección en primaria o secundaria (Clarke y Casals, 1958). **2) Ensayo de Neutralización por Reducción del Número de Placas:** es una prueba muy sensible y específica que permite la detección de anticuerpos neutralizantes. Es de gran utilidad en estudios seroepidemiológicos por su elevada especificidad al permitir identificar el serotipo causante de una infección pasada (Guzmán y Kourí, 1996). **3) Ensayos Inmunoenzimáticos (ELISA, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays*):** se usa para la detección de anticuerpos de tipo IgM y/o IgG (Gubler, 1998) mediante diferentes modalidades. Se caracterizan por ser económicos, rápidos, fáciles de ejecutar, sensibles y específicos (Vázquez et al., 1997).

-Diagnóstico molecular: entre las técnicas más utilizadas se encuentra la RT-RCP (RT-PCR, *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*) debido a su capacidad para detectar DENV en la fase aguda de la enfermedad. Permite la detección del ácido nucleico viral de forma directa en muestras de suero, células, cultivos celulares, larvas infectadas, tejidos frescos y tejidos incluidos en parafina. La RT-PCR ha sido reportada por diversos autores y cada metodología varía, principalmente, en términos de la región genómica a amplificar. Entre las metodologías más utilizadas se encuentra la descrita por Lanciotti *et al.* (1992), quienes diseñaron cebadores para amplificar la región C y prM del genoma de DENV, lo cual permite obtener un fragmento de 511 pb, y posteriormente mediante una PCR-anidada, utilizando cebadores específicos se realiza la identificación de los serotipo. De igual forma, se han diseñado RT-PCR para la amplificación de otros fragmentos del genoma viral, entre las que se encuentran la reportada por Camacho *et al.* (2012) quienes amplificaron 5'UTR-C para todos los serotipos virales, bajo una metodología altamente sensible y específica.

Otra técnica para el diagnóstico de DENV se refiere a la RT-PCR en tiempo real. Recientemente, Santiago *et al.* (2013) reportaron el desempeño de este tipo de ensayo,

incluyendo su capacidad para detectar DENV a partir de múltiples linajes. En el mismo, se utilizaron cebadores con capacidad para amplificar NS5 (DENV-1), E (DENV-2), prM (DENV-3 y DENV-4). La técnica en tiempo real tiene múltiples ventajas, entre ellas no requiere la manipulación post-amplificación, minimizando así los riesgos de contaminación.

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1.- Tipo de Investigación

Se realizó una investigación clasificada como experimental y descriptiva. Experimental, debido a que en el proceso se realizó la manipulación de diferentes variables para la construcción de los clones recombinantes, así como para la realización de las reacciones de transcripción y traducción e inhibición de esta última. Descriptiva, en vista de que los elementos, objeto de estudio fueron caracterizados de acuerdo a diferentes propiedades, lo que permitió dar respuesta al proceso de traducción *in vitro* de las cepas de los diferentes serotipos de DENV.

3.2.- Material biológico

3.2.1.- Cepas virales

Los ensayos se realizaron utilizando cepas genotipificadas de los diferentes serotipos de DENV, los cuales fueron utilizados como fuente de ARN para la obtención de diversas regiones del genoma de DENV, así como para ensayos de traducción *in vitro*. Los virus autóctonos correspondieron a aislados obtenidos de sueros colectados, a partir de pacientes, sospechosos de padecer infección por DENV. Las muestras fueron analizadas mediante aislamiento e identificación viral a través de técnicas virológicas (Henchal *et al.*, 1982; Gubler *et al.*, 1984) y su genoma amplificado mediante la técnica molecular de RT-PCR (Lanciotti *et al.*, 1992). En la tabla 1 se muestran los datos de las cepas utilizadas.

Tabla 1. Cepas de DENV seleccionadas para el estudio

Aislado Viral	
Serotipo	Código de identificación
DENV-1	16007*
DENV-2	1693**
	19094**
	28105**
	29681**
	21241QT*
	16681*
DENV-3	H87*
DENV-4	H241*

*Cepas foráneas donadas gentilmente por el Dr. Kevin Russell (NMRCD, Lima, Perú)

**Cepas autóctonas

3.2.2.- Plásmido pGEM®-T Easy

Se utilizó el plásmido pGEM®-T Easy, cuya longitud es de 3015 pb, y contiene en su secuencia el promotor T7 ARN polimerasa seguido por el sitio de clonaje múltiple dentro de la región codificante del péptido alfa de la enzima β -galactosidasa. La inactivación insercional del péptido alfa permite reconocer rápidamente los clones recombinantes mediante la identificación directa de colonias azules y blancas. Además, contiene numerosos sitios de restricción enzimática dentro del sitio de clonaje múltiple, entre los que destacan las secuencias diana para las enzimas *ApaI* y *EcoRI*, y una secuencia nucleotídica correspondiente al gen resistente a ampicilina, lo que permite su crecimiento en medios suplementados con este antibiótico a una concentración de 100µg/ml. pGEM®-T Easy se utilizó para el clonamiento de las secuencias amplificadas de 320 pb iniciales del genoma de las cepas de DENV-2 (5'UTR-C) (Figura 8).

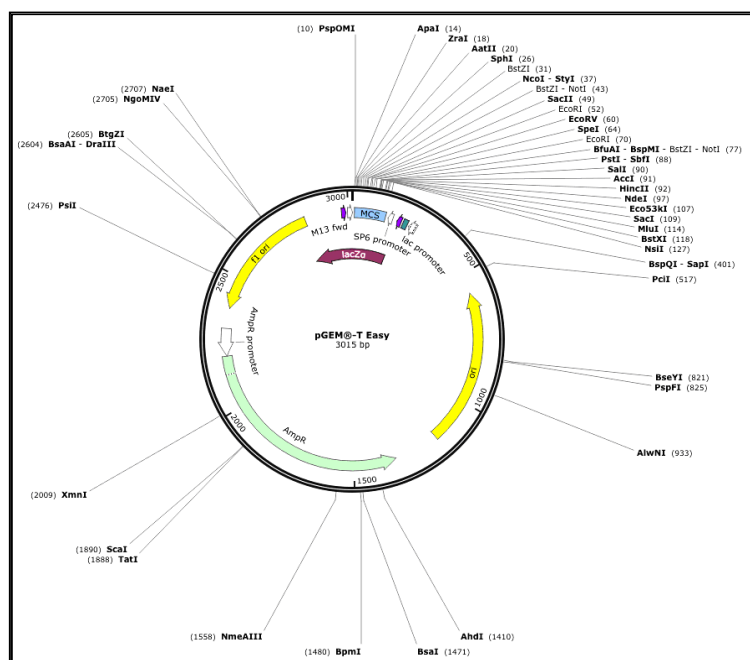


Figura 8. Representación esquemática del plásmido pGEM®-T Easy y principales regiones referenciales en su secuencia nucleotídica para la clonación de fragmento 5'UTR-C de DENV-2 (SnapGene® Viewer).

3.2.3.- Cepa bacteriana

Se emplearon células de *Escherichia coli* XL1-Blue MRF⁻ (Stratagene) [genotipo: *supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA46*, *thiA1*, *lacf* (*proAB+* *lacI* *lacZ* Δ *M15*, *Tn10*, *Tet^r*), para la multiplicación y mantenimiento del plásmido (pGEM®-T Easy) con el inserto del ARN viral.

3.2.4.- Placenta humana

Las placentas humanas frescas se obtuvieron de pacientes embarazadas, a las cuales se practicó al momento del parto el procedimiento conocido como cesárea segmentaria. Tales pacientes cumplieron con un perfil de laboratorio que implicó seronegatividad a agentes infecciosos tales como: VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana), *Trypanosoma cruzi*, *Treponema pallidum* y *Toxoplasma gondii*. De igual forma, las madres donantes firmaron un consentimiento informado (Anexo 1) aprobado por el Comité de Bioética y Bioseguridad vigente del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco

J. Triana Alonso” de la Universidad de Carabobo (BIOMED-UC), el cual fue redactado de acuerdo a las normas establecidas por la Comisión de Bioética y Bioseguridad del Ministerio de Ciencia y Tecnología del Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias-Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Investigación (FONACIT). Las placentas fueron usadas para obtener el sistema traduccional humano libre de células.

3.3.- Análisis de secuencias nucleotídicas correspondientes al genoma total y parcial de cepas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4

3.3.1.- Análisis filogenético de secuencias completas de los genomas de cepas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4

Se obtuvieron secuencias nucleotídicas depositadas en el banco de genes (*GenBank*), las cuales correspondieron a los genomas completos de cepas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4, así como la secuencia nucleotídica del gen de la envoltura (E) de la cepa de DENV-2 (1693) objeto de estudio. Una vez realizados los alineamientos, se procedió a la construcción de un árbol filogenético con el programa de computación MEGA versión 5 (Tamura *et al.*, 2011). El árbol filogenético óptimo fue generado mediante el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). En cada una de las ramas se indicaron los porcentajes ≥ 60 de las réplicas de los árboles mediante el *test de bootstrap* de 1000 réplicas. Las distancias evolutivas fueron calculadas mediante el método de Tamura-Nei. Cada cepa fue denominada considerando el serotipo viral, el código LARDIDEV, número de acceso al GenBank (Anexo 2). En el caso de la cepa DENV-2/1693, la relación filogenética se realizó comparando la secuencia nucleotídica correspondiente al gen de la envoltura (E).

3.3.2.- Alineamientos de las secuencias nucleotídicas correspondientes la región 5'UTR de los diferentes serotipos virales

Con el fin de analizar las secuencias nucleotídicas de la región 5'UTR de las cepas de los distintos serotipos virales de DENV, se procedió a la realización de alineamientos múltiples de las secuencias nucleotídicas de las cepas objeto de estudio, con secuencias correspondientes a cepas autóctonas de DENV. Los alineamientos permitieron valorar las diferencias y/o similitudes de las regiones SLA y SLB (OligoU y 5'UAR) descritas para 5'UTR.

-Alineamiento de la secuencia nucleotídica de la región 5'UTR de DENV-1: haciendo uso del método de alineamiento Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) se realizó la comparación de la secuencia de la cepa 16007 (Genotipo II) con 14 secuencias nucleotídicas de cepas autóctonas de DENV-1 aisladas entre los años 1997 y 2008.

-Alineamiento de la secuencia nucleotídica de la región 5'UTR de DENV-2: mediante el método de alineamiento Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) se realizó la comparación de la secuencia de las cepas 16681 (Genotipo Asiático), 1950IQT (Genotipo Americano), con las secuencias nucleotídicas de cepas correspondientes al genotipo Asiático/Americano (19094, 28105, 29681). Las mismas fueron comparadas con 10 secuencias nucleotídicas de cepas autóctonas (Genotipo Asiático/Americano) aisladas entre los años 1996 y 2008.

-Alineamiento de la secuencia nucleotídica de la región 5'UTR de DENV-3: con el método de alineamiento Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) se realizó la comparación de la secuencia de la cepa H87 (Genotipo II) con 17 secuencias nucleotídicas de cepas autóctonas de DENV-3 aisladas entre los años 2001 y 2008.

-Alineamiento de la secuencia nucleotídica de la región 5'UTR de DENV-4: a través del método de alineamiento Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) se realizó la comparación de la secuencia de la cepa H241 (Genotipo I) con 15 secuencias nucleotídicas de cepas autóctonas de DENV-4 aisladas entre los años 1998 y 2008.

3.4.- Obtención de ARN viral

Para la ejecución de los diversos ensayos fue necesario obtener los ARN virales (ARNv) o genómicos. Los ARNv completos de las cepas Hawaii (DENV-1), 1693, 19094, 16681 (DENV-2), H87 (DENV-3) y H241 (DENV-4) fueron empleados para los ensayos de traducción *in vitro* descritos posteriormente (3.7.); mientras que los ARNv de las cepas 16681, 2124IQT, 28105 y 29681 (DENV-2) fueron utilizados como molde para la obtención de ADNc correspondiente a la región 5' terminal no traducible y parte del gen de la cápside (5'UTR-C). Estos últimos fueron empleados para obtener ARNm sintético, a partir de los ensayos de transcripción descritos posteriormente (3.9. y 3.11.) Para obtener los diferentes ARNv se realizaron, en primer lugar, los cultivos de DENV de las diferentes cepas, tal como se describe en la siguiente sección.

3.4.1.- Cultivos virales

-Cepas autóctonas: las cepas autóctonas de DENV se aislaron de acuerdo al protocolo descrito por Gubler *et al.* (1984). Para ello, se procedió a inocular los sueros de los pacientes en tubos con monocapa confluyente de la línea celular C6/36-HT (derivada de *Aedes albopictus*) para su posterior incubación a 33°C durante 10 días. La identificación del serotipo viral se realizó mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta, en la cual se enfrentaron las células infectadas contra un panel de anticuerpos monoclonales (AcMc) dirigidos contra todos los serotipos de DENV. Los AcMc utilizados fueron HB47 (15F3-1) para DENV-1, HB46 (3H5) para DENV-2, HB49 (5D4-11) para DENV-3 y HB48 (1H10-6) para DENV-4 (Henchal *et al.*, 1982), provistos gentilmente por el Dr. Jorge Muñoz del *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC, San Juan, Puerto Rico).

-Cepas foráneas: 16007 (DENV-1), 16681 y 2124IQT (DENV-2), H87 (DENV-3) y H241 (DENV-4) fueron multiplicadas una vez en monocapa confluyente de la línea celular C6/36-HT en medio de cultivo MEM suplementado con suero de ternera fetal (STF) al 2% a 33°C para luego ser almacenadas a -70 °C hasta su uso.

En el caso de las cepas Hawaii (DENV-1), 1693, 19094, 16681 (DENV-2), H87 (DENV-3) y H241 (DENV-4) fueron adicionalmente sembradas a una multiplicidad de infección (MOI) DE 0,01 en frascos de 250 cm² con monocapa confluyente de C6/36-HT en MEM suplementado con STF al 2% en las mismas condiciones de temperatura especificadas. Esto, con el fin de obtener un volumen aproximado de 500 mL, los cuales fueron posteriormente concentrados para obtener ARNv en cantidad suficiente para los subsiguientes ensayos.

-Concentración de cepas de DENV: una vez culminado el tiempo de incubación de los cultivos de las cepas de DENV [Hawaii (DENV-1), 1693, 19094, 16681 (DENV-2), H87 (DENV-3) y H241 (DENV-4)] en la línea C6/36-HT, se procedió a su colección y centrifugación a 4000 rpm durante 20 min a 4°C en rotor IEC™224 con el fin de eliminar restos celulares. Los sobrenadantes fueron sometidos al mismo procedimiento de centrifugación dos veces más, hasta no observar ningún tipo de elemento forme por microscopia óptica. Los sobrenadantes clarificados de las cepas virales fueron ultracentrifugados a 16000 rpm durante 3 horas a 4°C en rotor SW-28 (Beckman Coulter Optima™ L-90K) en tres rondas sucesivas de ultracentrifugación. Se almacenaron alícuotas del sobrenadante y sedimento final, este último fue resuspendido en solución TEN (Tris-HCl 10 mM pH: 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 5M) y almacenado a -80°C hasta su uso para la extracción de ARN (Ichim y Wells, 2011).

3.4.2.- Obtención del ARN viral genómico

Los virus concentrados [Hawaii (DENV-1), 1693, 19094, 16681 (DENV-2), H87 (DENV-3) y H241 (DENV-4)] fueron sometidos a extracción de su ARNv mediante el uso de tres estuches comerciales [ARN *QIAamp* QIAGEN® (QIAGEN Inc.; California, E.U.A), FavorPrep™ Viral Nucleic Acid Extraction Estuche II (Favorgen® Biotech Corporation), SV Total RNA Isolation System Technical Manual, (©Promega Corporation)]. Esta comparación permitió determinar cuál de ellos tuvo un mejor rendimiento en relación a la cantidad de los ARNv obtenida. Cada una de las extracciones se hizo siguiendo estrictamente las instrucciones de los fabricantes, los productos obtenidos

se resuspendieron en 120 µL de agua libre de nucleasas y almacenados a -80°C para su posterior uso en los ensayos de síntesis de proteínas.

3.5.- Obtención del fragmento 5'UTR-C de ADNc del ARN viral por amplificación de la región del genoma viral correspondiente a la secuencia 5' no traducible y parte del gen de la Cápside (5'UTR-C, *Untranslated Region-Capside*)

Para obtener los fragmentos 5'UTR-C de las diferentes cepas virales se siguió el siguiente procedimiento: extracción del ARNv, diseño de oligonucleótidos para amplificar la región 5'UTR-C del genoma viral, Transcripción Reversa acoplada a Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR, *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*) para obtener el ADNc correspondiente al fragmento y purificación de los productos de RT-PCR.

Posteriormente, se realizó el análisis de restricción de los productos de PCR para comprobar la identidad de las secuencias amplificadas. En el caso específico de DENV-2, el procedimiento se utilizó además para acondicionar con las enzimas de restricción los extremos de los productos de RT-PCR (5'UTR-C) y del vector de clonamiento (plásmido pGEM®-T Easy). Seguidamente, se llevó a cabo la ligación del producto de PCR y el plásmido, y la subsiguiente transformación de las células competentes de *Escherichia coli* XL1-Blue con la mezcla de ligación.

Los clones recombinantes obtenidos fueron identificados mediante las técnicas de PCR de colonias a partir de las colonias evidenciadas en placas de Petri, las colonias que resultaron positivas fueron sometidas a un proceso de extracción de los ADNp recombinantes con el fin de reconfirmar la inserción de los fragmentos 5'UTR-C. Con estos últimos, se realizaron dos ensayos, el primer consistente en ensayos de liberación de inserto, luego del tratamiento con enzimas de restricción y el segundo en una PCR que permitió la amplificación de la región 5'UTR-C. Una vez verificada la recombinación se realizó maxipreparación de los ADNp para su posterior linearización y transcripción *in vitro*. Los diferentes procedimientos empleados se describen a continuación.

3.5.1.- Extracción del ARN viral

El ARNv de cada una de las cepas de DENV a ser utilizado como molde para amplificar el fragmento 5'UTR-C, se obtuvo a partir de 140 µL de cada uno de los cultivos virales mediante el uso del estuche de extracción viral de ARN *QIAamp* QIAGEN® (QIAGEN Inc.; California, E.U.A), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de la extracción se resuspendieron en 120 µL de agua libre de nucleasas y se almacenaron en alícuotas de 10 µL cada una a -80°C para su posterior uso.

3.5.2.- Diseño de oligonucleótidos

Se obtuvieron las secuencias de los genomas completos de las cepas correspondientes a los serotipos DENV-1 (16007), DENV-2 (16681), DENV-3 (H87) y DENV-4 (H241), depositadas en el banco de genes (GenBank) con los números de acceso: AF180817, NC_001474, M93130 y AY957539; respectivamente. En principio, se realizó la edición de la secuencia nucleotídica con el programa BioEdit versión 7.0.9.0 (Hall, 1999) para obtener una secuencia de 350 nucleótidos (nt) correspondiente a la región 5'UTR y parte del gen de la Cápside (C). Posteriormente, haciendo uso del programa Gene Runner Versión 3.05. (Spruyt y Buquicchio, 1994) y tomando en consideración secuencias de 20 nucleótidos se escogieron cebadores, cuyas características principales fueron ausencia de posibilidad de formación de estructuras secundarias y adecuado porcentaje de G-C y A-T.

El oligonucleótido directo correspondió a los primeros 20 nt de la secuencia de DENV, común entre todos los serotipos, mientras que los oligonucleótidos reversos fueron diseñados de acuerdo a las características previamente referidas. En relación a los cebadores del serotipo DENV-2, es necesario mencionar que al cebador directo se añadió una secuencia de nucleótidos correspondientes a la diana de restricción de las enzimas *Apa* I (GGGCC▼C), mientras que al reverso se adicionó la secuencia de la diana de restricción de la enzima *Eco*RI (G▼AATTC) con el propósito de generar un fragmento de ADNc con extremos cohesivos que fueran capaces de unirse por complementariedad de bases con el

plásmido pGEM®-T Easy, para su respectiva clonación en el mismo. En este caso, el fragmento obtenido tuvo un tamaño de 320 nt considerando la adición de las secuencias diana previamente descritas. Todos los cebadores fueron evaluados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante al 20%.

3.5.3.- Transcripción Reversa acoplada a Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR, *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*)

Con el fin de obtener fragmentos de 275 pb (DENV-1), 300(DENV-2), 320 pb (DENV-2), 274 pb (DENV-3) y 339 pb (DENV-4) correspondientes a la región inicial de los genomas de DENV y parte del gen que codifica la Cápside (5'UTR-C), se optimizaron las condiciones de la reacción en un volumen final de 50 µL mediante la variación de concentraciones de algunos componentes de la reacción. Las concentraciones ensayadas de los oligonucleótidos diseñados fueron: 0,5 µM, 0,75 µM y 1 µM, MgCl₂ (1 mM), desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs, *2'-desoxynucleoside 5'-triphosphate*) (0,2 mM), *Taq* polimerasa (1, 25 U/µL y 2,5 U/µL) y Reverso Transcriptasa (1,25 U/µL y 2,5 U/µL). A las mezclas de reacción se agregaron 5 µL de los ARN correspondientes a los genotipos de DENV. Las condiciones de tiempo y temperatura de la reacción fueron las siguientes:

Reacción	Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
Transcripción reversa	1	45°C	45 min
Desnaturalización inicial	1	95°C	2 min
Desnaturalización	34	94°C	30 seg
Hibridación		55°C	1 min
Extensión		68°C	2 min
Extensión final	1	68°C	7 min

Los productos finales se visualizaron en geles de agarosa al 2%. El tamaño final esperado para los productos [275 (DENV-1), 300(DENV-2), 320 (DENV-2), 274 (DENV-

3) y 339 (DENV-4) pb] fueron comparadas con el marcador comercial de tamaño molecular 100 bp DNA *step ladder* (Axygen).

3.5.4.- Purificación de los productos de RT-PCR

El ADNc correspondiente a los fragmentos de 320 pb de las cepas de DENV-2 fueron purificados mediante el uso del estuche comercial Wizard® *SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Específicamente, se cortaron las bandas en el gel de agarosa contentivos de los fragmentos amplificados de ADNc de 5'UTR-C, los cuales se resuspendieron en la solución denominada *Membrane Binding Solution* para ser incubados a 65°C durante aproximadamente 10 minutos o hasta que el gel estuviese disuelto. Esta solución se agregó en su totalidad a la minicolumna SV insertada en un tubo de colección para su incubación durante 1 minuto a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos. El líquido eluido en el tubo de colección se descartó y se procedió al lavado de la minicolumna SV con 500 µL de la solución *Membrane Wash Solution* diluida previamente en 95% de etanol. Este procedimiento se repitió una vez más con 700 µL de la misma solución. Posteriormente, la minicolumna fue insertada en un microvial de 1,5 mL para agregarle 25 µL de agua libre de nucleasas, se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos, para su posterior centrifugación a 14000 rpm por 1 minuto. Finalmente, la minicolumna fue descartada y el ADNc eluido fue cuantificado espectrofotométricamente y almacenado a -20 °C.

3.6.- Análisis de restricción enzimática de los productos 5'UTR-C obtenidos mediante RT-PCR

Con el fin de confirmar que las secuencias de los productos de RT-PCR amplificados correspondieran a la región esperada, se realizó el análisis de las dianas de restricción presentes en la secuencia nucleotídica correspondiente a las regiones 5'UTR-C de cepas de DENV. Inicialmente, se realizó un mapa de restricción con enzimas endonucleasas mediante el programa Gene Runner Versión 3.05. (Spruyt y Buquicchio,

1994) de las mencionadas secuencias. Con este análisis se determinó la selección de las enzimas *Sal* I (DENV-1), *Pst* I (DENV-2), *Hae* III (DENV-3) y *Msp* I (DENV-4) para realizar la digestión enzimática. Los ensayos se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante en un volumen final de 25 µl. Específicamente, se incubaron los ADNc de 5'UTR-C de DENV-2 con las diferentes enzimas, en reacciones individuales, en una proporción 1 µg de ADN por cada 5 U de enzima en las condiciones iónicas apropiadas. La reacción se llevó a cabo durante 3 horas a 37 °C. Los productos de digestión se observaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. El resultado de la migración electroforética se observó en un equipo de fotodocumentación (Gel Doc™ 2000 *Gel Documentation Systems*, Bio-Rad. Los productos esperados, especificados en la tabla 5, fueron comparados con el marcador 100 bp *DNA step ladder* (Axygen).

3.7.- Ensayos de Traducción *in vitro*

3.7.1.- Obtención del sistema traduccional libre de células de placenta humana

Las placentas se obtuvieron como se especificó en la sección 3.2.4. y siguiendo el protocolo descrito por Ferreras *et al.* (2004) con algunas modificaciones. Se realizó un homogeneizando de tejido placentario con una solución de ruptura fría (Tris-HCl 20 mM pH: 7,5; KCl 125 mM; Mg (CH₃COO)₂ 10 mM; EDTA 0,5 mM, β-Mercaptoetanol 4 mM, Sacarosa 250 mM) en una licuadora durante 15 ciclos de 20 segundos a máxima velocidad, considerando períodos de enfriamiento de aproximadamente 30 segundos por cada ciclo. Esta mezcla se centrifugó a 4400 x g durante 7 minutos a 4°C (rotor JA10 Beckman©), posteriormente el sedimento contentivo de restos de membrana, núcleos, restos celulares se descartó; mientras que el sobrenadante se sometió a centrifugación a 30150 x g durante 15 minutos a 4°C haciendo uso del rotor JA20 Beckman© con el fin de obtener la fracción postmitocondrial S-30 que contenía los componentes del sistema de traducción de células eucariotas. Posteriormente, la fracción S-30 obtenida se sometió a cromatografía por Sephadex® G-25 para eliminar componentes de bajo peso molecular, como ATP, GTP, así como aminoácidos. Para ello, la fracción S-30 se filtró en la resina de exclusión molecular mencionada, la cual fue previamente equilibrada en una solución amortiguadora (Hepes-

KOH 20 mM pH 7,5; Mg (CH₃COO)₂ 3 mM; CH₃CO₂K 100 mM; 2-mercaptoetanol 5 mM y glicerol 20%). El volumen de S-30 filtrado correspondió a 10% del volumen de la resina. En el proceso de filtración, se colectaron fracciones de 1 ml a las que se determinó las D.O. a 280 nm. Una vez obtenidas las lecturas de las fracciones, se realizó una curva (fracción vs. D.O.₂₈₀) y las fracciones con máxima A₂₈₀ se unieron para luego ser almacenadas en alícuotas de 100 µl a -80°C.

3.7.2.- Traducción de los ARN virales en el sistema libre de células de placenta humana

3.7.2.1.- Ensayo de síntesis de proteínas con moléculas de ARNv de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4

Se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Ferreras *et al.*, (2004). Para ello se prepararon mezclas de reacción que contenían: solución amortiguadora [HEPES-KOH 20 mM pH: 7,5), MgAc₂ 2,5 mM, Kac 150 mM, β-mercaptoetanol 4 mM, Espermidina 3,5 mM; Glicerol 10%], ATP 0,9 mM, GTP 0,1 mM, fosfocreatina 0,02 mM, ARN_t 0,5 O.D. (A₂₆₀), mezcla de [¹⁴C] aminoácidos 26,6 µM (metionina, cisteína, triptófano, ácido glutámico y ácido aspártico), mezcla de aminoácidos fríos 0,014 mM y metionina 0,043 mM. Los ARNm correspondieron a los ARNv de los diferentes serotipos virales, extraídos previamente (3.4.2.), a partir de las partículas virales concentradas (3.4.1.). Inicialmente, se optimizó la cantidad adecuada de ARNv genómico mediante ensayos con cantidades entre 0,25 µg y 8 µg totales de los ARNv de las cepas de DENV-2. Una vez preparadas las mezclas, se procedió a agregar las diferentes cantidades de los ARNv mencionados para incorporar un volumen determinado de la fracción post-mitocondrial S-30 (0,28 A₂₆₀) en el ensayo. Finalmente, se añadió agua libre de nucleasas en cantidad suficiente para completar el volumen de reacción. Las mezclas se incubaron a 37°C durante diferentes tiempos de incubación (0, 20, 40, 60 y 80 min) con el fin de determinar el tiempo de máxima estimulación del sistema traduccional S-30 por parte de los ARN. Transcurrido este tiempo, se realizó el análisis cuantitativo de la reacción mediante la medición de la radiactividad retenida de material insoluble precipitado por acción de ácido tricloroacético (TCA).

Específicamente, se tomaron 23 µL de reacción a los cuales se agregaron 1,5 mL de TCA al 10% que fueron calentados a 90°C durante 20 min, luego fueron enfriados a 0°C durante 15 min para su retención en filtros de fibra de vidrio (Fisherbrand®), los cuales fueron colocados en un vial al que posteriormente se agregaron 4 mL de líquido de centelleo (Optiphase Hisafe 2) para la determinación de la radiactividad contenida en los filtros en un contador de centelleo (Wallac 1414 Liquid Scintillation Counter, Win Spectral™). La lectura se expresó en DPM (desintegración por minuto).

3.7.2.2.- Ensayo de síntesis de proteínas con los diferentes ARNv en presencia de oligonucleótidos antisentido

Los ensayos se llevaron a cabo de la misma forma ya descrita (3.7.2.1.) con la cantidad óptima de ARNv e incorporando individualmente oligonucleótidos antisentido contra diferentes regiones del fragmento 5'UTR-C (Tabla 2), que fueron previamente diseñados mediante el uso del programa Gene Runner Versión 3.05. (Spruyt y Buquicchio, 1994). Para el diseño de los mismos, se consideraron determinadas posiciones de hibridización en la región 5'UTR-C. Además del posicionamiento de los oligonucleótidos antisentido, fue importante tomar en cuenta la ausencia de posibilidad de formación de estructuras secundarias y un adecuado porcentaje de G-C y A-T (Tabla 2). En un primer ensayo se consideraron relaciones molares de 1:5 y 1:10, para luego realizar el resto de los ensayos en una relación 1:5 de ARNv y oligonucleótido. Las condiciones iónicas y energéticas fueron las mismas empleadas para los ensayos de síntesis de proteínas. Para facilitar la hibridación de los oligonucleótidos, los ARNv fueron calentados a 70°C durante 3 minutos antes de agregar el resto de los reactantes del ensayo de síntesis. La incubación se llevó a 37°C durante 1 h. El análisis cuantitativo correspondió a la medición de la radioactividad retenida en el material insoluble precipitado por TCA al 10% contenida en los filtros en un contador de centelleo de acuerdo a la metodología descrita en 3.7.2.1.

Tabla 2. Características bioquímicas de los oligonucleótidos diseñados para inhibir el proceso de traducción de DENV-2

Oligonucleótidos	PM *	Tm □ (°C)	GC ¥ (°C)	nt φ	Tm H §	Tm D °	Tm B †	Tm BI Ψ
------------------	------	--------------	--------------	---------	-----------	-----------	-----------	------------

(Código y secuencia nucleotídica)										
OAs1	5'-AGTTGTTAGTCTACGTGGACCG-3'	6861,5	63,3	71,3	22	0	-84,3		-59,9	
OAs2	5'-TAGAGAGCAGATCTCTGATG-3'	6261,1	52,7	66,2	20	53,3	-54,6	-38,5	-50,5	
OAs3	5'-GATCTCTGATGAATAACCG-3'	6823,5	63,2	69,5	22	0	-108,7	0	-90	
OAs4	5'-GATGAATAACCAACGAAAAAG-3'	6898,6	63,6	65,7	22	0	0	0	0	
OAs5	5'-GAAAAACACGCCTTTCAATATG-3'	6791,5	64,5	65,7	22	47	-91,4	-66,7	-66,7	
OAs6	5'-CTTTCAATATGCTGAAACGC-3'	6156,1	60,6	64,2	20	66,9	-67,4	-32,5	0	
OAs7	5'-ATGCTGAAACGCGAGAGAAAC-3'	6577,3	66,5	68,9	21	0	-43,2	0	0	

*Peso molecular, □ Temperatura *melting* (Tm), ¥ Guanina-Citocina, φ nucleótido de inicio de la secuencia nucleotídica, § Tm horquillas, °TM dímeros, † TM bucles, Ψ TM bucles internos.

3.8.- Clonamiento de la región inicial del genoma (5'UTR-C) de las cepas de DENV-2 en el plásmido pGEM®-T Easy

3.8.1.- Acondicionamiento de los productos de RT-PCR (5'UTR-C) de DENV-2

-Digestión con las enzimas de restricción *ApaI* y *EcoRI*: Los productos amplificados y correspondientes a 5'UTR-C de DENV-2 fueron tratados con el fin de acondicionar sus extremos. Se emplearon las enzimas de restricción *ApaI* (GGGCC▼C) y *EcoRI* (G▼AATTC) (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA). El tratamiento se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, las cuales consistieron en la incubación por un período de tres horas a 37°C con las mencionadas enzimas en una proporción de 1 µg de ADNc por cada 2,5 U de enzima en tampón MultiCore™. Los productos de digestión se evidenciaron en gel de agarosa al 2% (3.12.6.1.). El resultado de la migración electroforética se observó en un equipo de fotodocumentación (Gel Doc™ 2000 *Gel Documentation Systems*, Bio-Rad, donde se observaron bandas únicas de 312 pb que fueron comparadas con el marcador 100 pb DNA *step ladder* (Axygen). Los fragmentos tratados fueron purificados con una mezcla de fenol-cloroformo para su posterior cuantificación espectrofotométrica (3.12.4.) y clonamiento en el plásmido pGEM®-T Easy.

-Purificación mediante extracción con fenol: cloroformo:alcohol isoamílico: a los productos digeridos se agregó igual volumen de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló y centrifugó a máxima velocidad durante dos minutos. Transcurrido este tiempo, se tomó cuidadosamente el sobrenadante y se transfirió a un microvial de 1,5 mL donde se agregó cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló vigorosamente y centrifugó a máxima velocidad durante dos minutos. El sobrenadante obtenido fue sometido a precipitación con 2,5 volúmenes de etanol 100% durante 30 min a -20°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a máxima velocidad durante 30 min, el sedimento obtenido fue lavado con etanol 70%. Nuevamente, se centrifugó a máxima velocidad durante 5 min a 4°C. El sedimento seco fue resuspendido en agua libre de nucleasas y almacenado a -20 °C hasta su posterior uso.

3.8.2.- Preparación del vector de clonamiento (plásmido pGEM®-T Easy)

- Digestión con las enzimas de restricción ApaI y EcoRI: se trataron 500 ng de pGEM®-T Easy enzimáticamente para el acondicionamiento de los extremos correspondientes al sitio de clonación del plásmido. Se emplearon las enzimas de restricción ApaI (GGGCC▼C) y EcoRI (G▼AATTC) (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA). El tratamiento del plásmido con las enzimas se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, las cuales consistieron en la incubación por un período de tres horas a 37°C del plásmido pGEM®-T Easy junto con la mismas en una proporción de 1 µg de ADNp por cada 2,5 U de enzima en las condiciones iónicas apropiadas, provistas por el tampón MultiCore™. El producto de digestión se evidenció mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (3.12.6.1.).

- Desfosforilación del plásmido pGEM®-T Easy con la enzima fosfatasa alcalina (Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIAP): con el propósito de hidrolizar los grupos fosfato ubicados en los extremos de la secuencia nucleotídica (región 5´terminal del ADN) y evitar así su recircularización se realizó tratamiento a pGEM®-T Easy con la enzima fosfatasa alcalina (*Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal* CIAP, Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA). Específicamente, se mezcló ADN plasmídico a razón de 1

pmol por cada 0,01 U de la enzima CIAP en tampón (Tris-HCl 50 mM (pH=9,3 a 25°C), MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM y espermidina 1 mM). La incubación se realizó durante 30 minutos, transcurrido este tiempo se suplementó con igual cantidad de enzima, se dejó durante 30 minutos adicionales a la misma temperatura especificada. Posterior al proceso, se realizó la extracción del ADNp con una mezcla de fenol-cloroformo (3.8.1.).

La cuantificación del ADNp fue de 1,66 µg y la calidad del producto se evidenció mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (3.12.6.1.). El resultado de la migración electroforética se observó en un equipo de fotodocumentación (Gel Doc™ 2000 *Gel Documentation Systems*, Bio-Rad, donde se observó una banda única de 3015 pb que fueron comparadas con el marcador 1 kb DNA *step ladder* (Axygen).

3.8.3.- Ligación del producto de RT-PCR purificado y el plásmido pGEM®-T Easy

Para éste ensayo se empleó la enzima T4 ADN ligasa, la cual permitió la unión entre los extremos cohesivos 5' fosfato de los fragmentos del ADNc de la región 5'UTR-C de las cepas de DENV-2 y los extremos cohesivos OH-3' del plásmido pGEM®-T Easy. La mezcla de reacción se realizó en condiciones iónicas adecuadas y equimolares, para lo cual se ensayaron diferentes relaciones molares. Específicamente, se evaluaron las relaciones 10/1 (diez partes del inserto y una parte del plásmido) y 5/1 (cinco partes del inserto y una parte del plásmido) con el fin de comprobar cuál era la relación idónea para la ligación entre pGEM®-T Easy y los fragmentos del ADNc de DENV-2. El tampón de las reacciones estuvo constituido por Tris-HCl 30 mM (pH 7,8), MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 1 mM. Las reacciones se incubaron a 4 °C durante toda la noche.

3.8.4.- Preparación de las células competentes

Las células *E. coli XL1B* criopreservadas se sembraron en placas de Petri con medio LB sólido (triptona 10g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7, tetraciclina 12,5 µg/ml), las cuales fueron incubadas a 37 °C durante toda la noche. Luego, se realizó el pre-inóculo en tubos cónicos de 15 ml a partir de una colonia de cada placa, el cual se inoculó en 5 ml de medio LB líquido (triptona 10g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7)

(Sambrook y Russel, 2001). Los cultivos fueron incubados durante toda la noche a 37 °C con agitación constante de 200 rpm, posteriormente se tomaron 800 µl de cultivo más 200 µl de glicerol estéril para su criopreservación a -80 °C. De igual forma, se diluyó 1 ml de cultivo en 50 ml de medio LB y se incubó a 37°C con una agitación constante de 250 rpm hasta alcanzar una densidad celular aproximada de 5×10^7 cel/ml. Los cultivos fueron trasvasados a tubos cónicos estériles de 50 ml y se centrifugaron por 15 min a 3015 rpm a 4 °C, el sobrenadante fue descartado y el sedimento resuspendido en 10 ml de CaCl₂ 100 mM. Esta mezcla fue nuevamente centrifugada por 15 min a 3015 rpm a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con 4 ml de una solución de CaCl₂ 100 mM y glicerol 20%. Se prepararon alícuotas de 200 µl en microviales que fueron almacenados a -80 °C hasta su uso.

3.8.5.- Transformación de las células *Escherichia coli* XL1-Blue competentes

Cada una de las mezclas de ligación entre inserto y vector en sus distintas relaciones molares, así como los respectivos controles se vertieron en tubos de 15 mL de capacidad junto a 200 µL de las células competentes *Escherichia coli* XL1-Blue para realizar el proceso de transformación mediante choque térmico. Este proceso consistió en incubaciones de las mezclas a diferentes temperaturas en tiempos determinados (30 min a 4°C, 90 seg a 42 °C y 2 min a 4 °C). Finalmente, a cada uno de los tubos se agregaron 800 µL de medio LB sin antibiótico precalentado para proceder a su incubación a 37°C a 220 rpm durante 1 hora. Transcurrido éste tiempo, se procedió a la siembra de 200 µL de células provenientes de las diferentes preparaciones en placas de Petri contentivas de medio LB-Ampicilina 100 µg/mL. Estas placas fueron previamente tratadas con una solución (X-Gal 20 mg/mL, IPTG 1 M, LB líquido). La incubación se realizó a 37°C durante 12 horas con el fin de permitir el crecimiento de las células transformadas resistentes a ampicilina en forma de colonias. Transcurrido este tiempo, se pudieron observar colonias azules y blancas, lo cual orientó acerca de las colonias portadoras del plásmido recombinante. Se seleccionaron las colonias blancas.

3.8.6.- Identificación de los clones recombinantes

-Reacción en Cadena de la Polimerasa de las colonias recombinantes (PCR de colonias): una vez transcurrido el tiempo de incubación y al evidenciar la presencia de las colonias en las respectivas placas, se realizó tomando como material una mínima porción de cada una de las colonias seleccionadas, este procedimiento se llevó tocando ligeramente el borde superior de las colonias con una punta de micropipeta e introduciendo la misma en una mezcla de reacción constituida por: oligonucleótidos (0,2 mM), solución de MgCl₂ (1 mM), dNTPs (0,2 mM), *Taq polimerasa* (*GoTaq® Flexi, Promega*)(*GoTaq® Flexi, Promega*) (1,25 U) y tampón de reacción. Los tubos de reacción se sometieron a las siguientes condiciones de tiempo y temperatura en un termociclador PTC-100™ (MJ Research, INC):

Reacción	Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	1	94°C	5 min
	30	94°C	30 seg
Hibridación		50°C	30 seg
		72°C	2 min
Extensión		1	72°C

Los productos de la PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2% (3.12.6.1.). El tamaño esperado para el producto era de 320 pb, el mismo se comparó con el marcador comercial de tamaño molecular 100 bp *DNA step ladder* (Axygen).

-Elaboración de placas “Master”: se realizó de forma simultánea a la técnica anteriormente descrita, específicamente con la misma punta de micropipeta empleada para la ejecución de la PCR de colonias se sembró cada colonia en placas de LB-Ampicilina 100 µg/mL e incubadas a 37°C hasta observar el crecimiento bacteriano.

3.8.7.- Extracción de ADNp pGEM®-T Easy recombinante con el inserto de DENV-2 (5'UTR-C)

Una vez obtenido el resultado de la PCR de colonias, se procedió a seleccionar todas aquellas que resultaron positivas a la mencionada técnica, a partir de la placa *Master*. Para ello, se transfirieron bacterias a un tubo de 15 mL de capacidad contentivo de 4 mL de medio LB-Ampicilina 200 µg/mL. Los tubos se incubaron a 37°C a 220 rpm durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se hicieron alícuotas de 800 µL del cultivo celular con un volumen de 200 µL glicerol para su almacenamiento a -20 °C. El volumen remanente se empleó para la extracción de ADNp y se realizó mediante el uso del estuche comercial FavorPrep™ *Plasmid DNA Extraction Mini Kit* (Favorgen, Biotech Corp.).

3.8.8.- Comprobación de la presencia del inserto de DENV-2 en el ADNp

-Ensayo de liberación de inserto mediante digestión enzimática: los ADNp obtenidos fueron digeridos con las enzimas de restricción: *ApaI* (GGGCC▼C) y *EcoRI* (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA). El ensayo se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para ello, se incubaron a 37 °C durante tres horas, los ADNp en una proporción de 1 µg por cada 2,5 U de las enzimas en las condiciones iónicas apropiadas. Los productos de digestión se evidenciaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (3.12.6.1.), consistieron en una banda única de 320 pb que fue comparada con el marcador 100 pb *DNA step ladder* (Axygen). El resultado de la migración electroforética se observó en un sistema de fotodocumentación (Gel Doc™ 2000 *Gel Documentation Systems*, Bio-Rad).

-Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de los ADNp recombinantes: con el objetivo de verificar la inserción del fragmento 5'UTR-C del genoma de los DENV-2 se realizó una PCR a los ADNp extraídos. El procedimiento consistió en agregar 5 µl de la muestra en una mezcla de reacción preparada de acuerdo a las condiciones descritas para la PCR de colonias (3.8.6.) y con las mismas condiciones de tiempo y temperatura especificadas para la misma. Los productos se analizaron en geles de agarosa al 2%

(3.12.6.1.). El tamaño esperado para el producto era de 320 pb y se comparó con el marcador comercial de tamaño molecular 100 bp DNA *step ladder* (Axygen).

3.8.9.- Maxipreparación de ADNp

Las células *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene) transformadas con el plásmido pGEM®-T Easy recombinante con las secuencias 5'UTR-C de las cepas de DENV-2, se cultivaron en medio líquido Luria-Bertani (LB) con el fin de amplificarlas a gran escala. Para ello, se realizó un pre-inóculo al sembrar 50 µL de las células en 5 mL de medio LB suplementado con Ampicilina 100 µg/mL, la incubación se realizó a 37°C con agitación permanente a 220 rpm durante toda la noche. Una vez cultivadas las células en medio LB-Ampicilina 100 µg/mL se prepararon alícuotas de 800 µL del cultivo celular con un volumen de 200 µL de Glicerol 20% para su almacenamiento a -20 °C. El cultivo celular restante se utilizó para la obtención del ADNp. Para ello, este fue sembrado en 200 mL de medio LB- Ampicilina 100 µg/mL e incubadas a 220 rpm a 37 °C. El cultivo bacteriano obtenido se centrifugó durante 15 min a 6000 rpm en un rotor JA10 (©Beckman Coulter, USA) para obtener un sedimento contentivo de las células bacterianas que fue resuspendido en 15 mL de Solución I (EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0). Posteriormente, se añadieron 20 mL de Solución II (NaOH 200 mM, SDS 1%) para mezclar por inversión suave 4 a 6 veces e incubar durante 5 min a temperatura ambiente.

Transcurrido éste tiempo se agregaron 15 mL de Solución III (Acetato de Potasio 3 M, pH 5,0) y se mezcló por inversión suave 4 a 6 veces y se incubó en baño de hielo durante 10 min. Luego se procedió a centrifugar durante 40 min a 8000 rpm en un rotor JA 13.1 (©Beckman Coulter, USA) a 4°C. El sobrenadante fue removido inmediatamente y transferido a un tubo estéril, al cual se le agregó ARNsa A (20 µg/mL) y se incubó durante 30 min a 37°C. Luego, se agregó Proteinasa K (10 µg/mL) y se incubó en baño de María durante 1 h a 37°C. Transcurrido este tiempo, el volumen obtenido se dividió en cuatro tubos de 50 mL y se añadió un volumen equivalente de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol

isoamílico (25:24:1). Se agitaron vigorosamente durante 3 min y se centrifugaron a 8000 rpm por 10 min a 4°C. La fase acuosa obtenida se transfirió a un nuevo tubo, al cual se le agregó un volumen equivalente de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) con el cual se mezcló para luego centrifugar durante 10 min a 8000 rpm a 4°C en rotor JA 10 (©Beckman Coulter, USA). La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo, al cual se le agregaron 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío para incubar a -20 °C durante 30 minutos. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 8000 rpm por 10 min a 4°C en un rotor JA 10 (©Beckman Coulter, USA), se eliminó el etanol por inversión y el precipitado fue lavado con etanol frío al 70% mediante centrifugación a 8000 rpm por 10 min a 4°C en un rotor JA 10 (©Beckman Coulter, USA).

Finalmente, los tubos fueron colocados en estufa a 37 °C, el ADN obtenido fue resuspendido cuidadosamente en agua libre de nucleasas a 4°C y almacenado a -20 °C (Sambrook y Russell, 2001). La calidad del ADN obtenido se verificó mediante gel de agarosa al 0,8% (3.12.6.1.). El resultado de la migración electroforética se observó en un equipo de fotodocumentación (Gel Doc™ 2000 *Gel Documentation Systems*, Bio-Rad) y fueron comparados con el marcador 1 Kb bp *DNA step ladder* (Axygen).

3.9.- Transcripción *in vitro* a partir de los plásmidos recombinantes pGEM®-T Easy-5'UTR-C DENV-2

3.9.1.- Linearización de los clones recombinantes (pGEM®-T Easy-5'UTR-C DENV-2)

Una vez obtenida la cantidad suficiente de los ADNps (pGEM®-T Easy recombinantes con los 5'UTR-C de DENV-2) se procedió a la linearización de los mismos, mediante el uso de la enzima de restricción *Eco RI* (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA). Para ello, se incubó el ADNp junto con la enzima en una relación de 1 µg de ADNp por cada 2,5 U de enzima en las condiciones iónicas apropiadas durante 3 horas a 37°C. Posterior al proceso de digestión enzimática, se procedió a la verificación de linearización del plásmido mediante gel de agarosa al 0,8% (3.12.6.1.). Una vez

comprobada la presencia en el gel de una banda nítida y única de 3335 pb, se realizó la purificación de ADN con una mezcla de fenol-cloroformo (3.8.1.), así como el análisis de la calidad e integridad del ADNp mediante electroforesis de ADN en gel de agarosa al 0,8% (3.12.6.1.).

3.9.2.- Estandarización de las condiciones de los ensayos de transcripción *in vitro* a partir de los plásmidos recombinantes pGEM®-T Easy-5'UTR-C DENV-2 linealizados

Para lograr la obtención de ARNm sintético de 320 nt a partir de cada uno de los plásmidos recombinantes linearizados (pGEM®-T Easy-5'UTR-C) de cepas de DENV-2, se realizó la estandarización de un ensayo de transcripción siguiendo el protocolo descrito por Triana-Alonso *et al.* (1995) con algunas modificaciones y considerando un protocolo previo de optimización descrito por Pérez *et al.*, (2015). Previo al inicio de los ensayos se midió el grado de hidrólisis de los nucleótidos trifosfato (ATP, CTP, GTP y UTP) y la actividad de la enzima pirofosfatasa (PPasa) mediante la determinación de fosfato inorgánico libre (3.12.1.).

Una vez verificada la condición de los nucleótidos y la actividad de pirofosfatasa se procedió a estandarizar la reacción de transcripción, evaluando las concentraciones de T7 ARN polimerasa (0,2 a 1 U/μL), plásmidos (0,015 hasta 0,035 ó 0,045 μg/μL), MgCl₂ (6-25 mM), pirofosfatasa (0,001 a 0,1 U/μL), la temperatura (30, 37 y 42 °C) y el tiempo de reacción (0-12 h). Cada una de las reacciones realizadas fue evaluada cuantitativamente mediante la determinación de la liberación de fosfato (Pi) (3.12.1.) y cualitativamente a través de electroforesis en geles de poliacrilamida y agarosa de acuerdo a los procedimientos descritos (3.12.6.1. y 3.12.6.2.).

3.10.- Obtención de fragmentos de ADN por amplificación de la región promotora de T7 y la secuencia 5' no traducible y parte del gen de la Cápside (5'UTR-C, *Untranslated Region-Capside*) a partir de plásmidos pGEM®-T Easy clonados con las secuencias 5'UTR-C de cepas de DENV-2

Con el objetivo de amplificar un fragmento de ADN, que incluyera las secuencias nucleotídicas correspondientes a la región promotora de T7 y el fragmento 5'UTR-C DENV-2, a partir de los ADNp extraídos (3.8.7.), se realizó una PCR con las condiciones que se describen a continuación. En una mezcla de reacción constituida por el oligonucleótido sentido de la región promotora T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') (0,2 µM) y el oligonucleótido antisentido UTRR-2 (0,2 mM), solución de MgSO₄ (1 mM), dNTPs (0,2 mM), *Taq polimerasa* (*Tfl DNA polymerase*®, Promega) (1,25 U) y tampón de reacción se agregaron 5 µl de cada uno de los ADNp. Los tubos de reacción se sometieron a las condiciones de tiempo y temperatura en un termociclador PTC-100™ (MJ Research, INC) especificadas previamente (3.8.6.). El tamaño esperado para el producto era de 340 pb, las bandas obtenidas se compararon con el marcador comercial de tamaño molecular 100 bp DNA *step ladder* (Axygen).

Los productos de la amplificación fueron purificados mediante la metodología previamente descrita (3.5.4.) con el estuche comercial Wizard® *SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La integridad y rendimiento de los productos purificados fueron verificados en electroforesis en gel de agarosa al 2% (3.12.6.1.).

3.11.- Transcripción *in vitro* a partir de los productos de amplificación de la región promotora T7 y 5'UTR-C mediante PCR

Para lograr la obtención de ARNm correspondiente a la región 5'UTR-C de cepas de DENV-2, se realizó un ensayo de transcripción de acuerdo a las condiciones obtenidas de la estandarización de la reacción de transcripción previamente descrita (3.9.). Las reacciones realizadas fueron evaluadas cuantitativamente mediante la determinación de la liberación de fosfato (Pi) (3.12.1.) y cualitativamente a través de electroforesis en gel de poliacrilamida de acuerdo a procedimiento descrito posteriormente (3.12.6.2.).

3.12.- Técnicas empleadas para evaluar las muestras y productos de reacción

3.12.1.- Determinación de fosfato liberado en la reacción de transcripción

El fosfato inorgánico (Pi) liberado durante las reacciones de transcripción fue determinado mediante una adaptación del protocolo descrito por González-Romo *et al.* (1992). Para ello, se agregaron 2,5 µL de las muestras colectadas en microviales de 1,5 mL que contenían 147,5 µL de agua y 150 µL SDS 12%, luego se agregaron 300 µL de reactivo de color (1:1) (Acido acórbico 12% en HCl 1N y molibdato de amonio 2% en HCl 1N) y se incubaron durante tres min a temperatura ambiente (TA). Transcurrido este tiempo se agregaron 450 µL del reactivo estabilizante (citrato de sodio 2%, metaarsenito de sodio 2% y ácido acético 2%) para su incubación durante 20 min a temperatura ambiente, momento en el cual se midió la absorbancia de las reacciones a 850 nm en un espectrofotómetro Beckman Coulter - DU®-50. La cantidad de Pi liberado se determinó mediante una curva de calibración realizada con una solución de fosfato ácido de potasio (K₂HPO₄) a diferentes cantidades de Pi (0-0,5-1-2-4-8-16-32 nm).

3.12.2.- Concentración y pureza de los ácidos nucleicos

3.12.3.- Determinación de la concentración y pureza del ARN

-Concentración de ARN: se determinó mediante la lectura de O.D. en un espectrofotómetro de luz UV a una longitud de onda de 260 nm (A₂₆₀). Considerando que una unidad de O.D. equivale a 40 µg/mL de ARN de cadena sencilla, la concentración de ARN se obtuvo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$[\text{ARN}] = A_{260} \times D \times 40 \text{ µg/mL}$$

D= Factor de dilución

-Pureza de ARN: se determinó mediante el cálculo de la relación A₂₆₀/A₂₈₀ (Sambrook y Russell, 2001).

3.12.4.- Determinación de la concentración y pureza del ADN

-Concentración de ADN: se determinó mediante la lectura de O.D. en un espectrofotómetro de luz UV a una longitud de onda de 280 nm (A_{280}). Considerando que una unidad de O.D. equivale a 50 µg/mL de ADN de doble cadena, la concentración de ADN se obtuvo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$[\text{ADN}] = A_{280} \times D \times 50 \text{ µg/mL}$$

D= Factor de dilución

-Pureza de ADN: se determinó mediante el cálculo de la relación A_{260}/A_{280} (Sambrook y Russell, 2001). Se consideraron muestras de ácidos nucleicos puras cuando la relación A_{260}/A_{280} estuvo en el rango 1,8-2.

3.12.5.-Transcripción Reversa acoplada a Reacción en Cadena de la Polimerasa de las regiones 5'UTR-C, C/prM-M y NS5 de los genomas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4

Con el fin de valorar la integridad de los ARNv se realizó la amplificación de diferentes fragmentos genómicos, ubicados a lo largo del genoma viral. Para ello, se utilizaron las reacciones descritas a continuación.

- Amplificación de la región 5'UTR-C: la obtención de los fragmentos se realizó conforme a las indicaciones descritas en la sección 3.3.3.3. Una metodología similar, pero sin la adición de las secuencias nucleotídicas de las dianas de restricción previamente señaladas (3.5.), se llevó a cabo para lograr la amplificación de los fragmentos 5'UTR-C de los serotipos virales. Específicamente, los fragmentos obtenidos corresponderían a 275 pb (DENV-1), 300 pb (DENV-2), 274 pb (DENV-3) y 339 pb (DENV-4).

-Amplificación de la región C/prM: utilizada para la amplificación del fragmento C/prM de 511 pb (nt 134 al 644). Esta región es común para todos los serotipos de DENV y para obtenerla se siguieron de forma estricta las instrucciones descritas por Lanciotti *et al.* (1992).

-Amplificación de la región NS5: este fragmento de 1385 pb corresponde al gen NS5 (nt 7871 al 9107) común entre los flavivirus, y se obtuvo siguiendo la metodología descrita por Sánchez-Seco *et al.* (2005) con algunas modificaciones en relación a algunos de los reactantes. Los cambios para esta RT-PCR consistieron en el uso de MgSO_4 a 2 mM y oligonucleótidos a razón de 50 pmol. El resto de los reactantes se mantuvo igual, así como las condiciones de tiempo y temperatura establecidas por los mencionados autores.

3.12.6.- Electroforesis en geles de Agarosa y poliacrilamida

3.12.6.1.- Electroforesis en geles de agarosa para ADN

Con el fin de verificar la presencia de bandas íntegras y nítidas, correspondientes a los ADNc y/o ADNp en su forma natural o linealizados -estos últimos producto de tratamiento mediante digestión enzimática-, producto de las diversas metodologías aplicadas, se realizaron los análisis mediante electroforesis en gel de agarosa a distintas concentraciones (0,8 y 2%, según el tamaño de los productos esperados. Para ello, se pesaron cantidades entre 0,8 y 2 gr de Agarosa D-1 LE GQT (Scientific Trade Corp) y disueltas en 100 mL de una solución de tampón TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 0,5 M pH 8,0) a alta temperatura para su total disolución. Una vez disuelta se agregó Bromuro de Etidio (0,5 $\mu\text{g/mL}$) y se vertió en la bandeja de una cámara de electroforesis horizontal (M U-202T, C.B.S. Scientific CO.). Luego de la polimerización del gel se procedió a resuspender 5 μL de las muestras en solución de carga (azul de bromofenol 0,42%, Xilencianol 0,42%, glicerol 5%) para colocarlas en los pozos del gel dispuestos para ello. Se incluyó un marcador de tamaño molecular (100 bp DNA *step ladder*, Axygen o 1 Kb DNA *step ladder*, Axygen)). La cámara de electroforesis se conectó a una fuente de poder EC-250-90 (E-C Apparatus Corporation) a un voltaje constante de 100 V durante 40 minutos. El resultado de la migración electroforética se observó en un equipo de documentación de geles (Gel Doc™ 2000 Gel Documentation Systems, Bio-Rad). El tamaño esperado se comparó con los marcadores previamente mencionados.

3.12.6.2.- Electroforesis en geles de poliacrilamida

Con el fin de valorar la calidad de los oligonucleótidos empleados en los ensayos, bien para obtener productos por RT-PCR o para valorar su acción antisentido, se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante al 20%. La misma se preparó a partir de una solución de poliacrilamida 38%-N,N-metil bis acrilamida 2%, urea 7,5 M, Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8), SDS 0,1%, persulfato de amonio 1 mg/mL y N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) 1 uL/mL. Esta mezcla se vertió en una cámara vertical para electroforesis. Una vez polimerizado el gel se colocó en contacto con solución amortiguadora TBE (Tris-Base 90 mM, EDTA 2 mM) y el polímero fue precalentado durante 20 minutos a 300 voltios. Transcurrido éste tiempo, las muestras se ajustaron a una O.D. igual a 0,2 mediante dilución en un volumen final de 20 uL. Las muestras fueron inyectadas en los pocillos del gel dispuestos para ello. La migración electroforética se realizó a 20 mA durante 30 minutos para su tinción posterior (3.12.6.4.1. y/o 3.12.6.4.2.).

3.12.6.3.- Electroforesis en geles de poliacrilamida de los productos de transcripción *in vitro*

Siguiendo el procedimiento anteriormente descrito, se realizaron las electroforesis a las muestras producto de los ensayos de transcripción *in vitro* (3.9.2.). En este caso, los geles de poliacrilamida se realizaron a una concentración de 10%. En relación a las muestras, se inyectaron 10 µL obtenidos en los ensayos de transcripción diluidos en 10 µL de solución amortiguadora (Tris-HCl 40 mM pH 8; MgCl 22 mM, Espermidina 1 mM) que habían sido previamente calentados a 90 °C durante tres minutos. La migración electroforética se realizó a 20 mA durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo se procedió a la respectiva tinción (3.12.6.4.1. y/o 3.12.6.4.2.). El control de tamaño molecular correspondió a una muestra de ARN total de *E. coli* suministrada gentilmente por la M.Sc. Ana Celia Ferreras, de la sección de ácidos nucleicos del BIOMED-UC. La imagen del gel se captó en un sistema de fotodocumentación de geles (Gel Doc™ 2000 Gel

Documentation Systems, Bio-Rad) para el respectivo análisis.

3.12.6.4.- Tinción de geles de poliacrilamida

3.12.6.4.1.- Tinción con azul de toluidina (0,1%)

Los geles para detección de oligonucleótidos y productos de transcripción fueron sometidos a inmersión en una solución de azul de Toluidina al 0,1% (p/v) en ácido acético 10% durante tres minutos, luego en una solución de etanol 10% y ácido acético 10% hasta observar la presencia de las bandas correspondientes a los productos.

3.12.6.4.2.- Tinción con Nitrato de Plata

Los geles de poliacrilamida también fueron teñidos mediante el uso de nitrato de plata de acuerdo al siguiente procedimiento. En principio, se sumergieron en una solución de etanol al 10% y ácido acético al 7% durante 10 minutos en dos oportunidades, posteriormente se procedió al lavado de los mismos con agua destilada para luego añadir una solución de ácido nítrico al 1% en la cual se incubaron durante 15 minutos para lavar nuevamente con agua destilada. Luego, el gel se sumergió en una solución de nitrato de plata al 0,1% durante quince minutos en oscuridad. Transcurrido éste tiempo, se descartó la solución de nitrato de plata para proceder a evidenciar la presencia de bandas con una solución reveladora (Na_2CO_3 3%), luego se añadieron 300 μL formaldehído (37%) hasta la aparición de bandas. Finalmente, se agregó ácido acético al 5%.

CAPÍTULO IV

4.- RESULTADOS

Para cumplir con los objetivos planteados se analizaron cepas de los cuatro serotipos descritos para el DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4), con especial énfasis en cepas de DENV-2 de acuerdo a los diversos ensayos descritos en la metodología.

4.1.- Análisis filogenético de secuencias completas de los genomas de cepas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4

Con el objeto de establecer la relación filogenética de las cepas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4, así como para determinar la variabilidad de la región genómica del fragmento 5'UTR-C entre los diversos serotipos, así como entre cepas de cada serotipo se realizaron los análisis de secuencias. El resultado del cálculo en la identidad en las secuencias nucleotídicas entre los genomas completos de cada uno de los serotipos osciló entre 66,1 y 72,2 %. Sin embargo, la variación intraserotípica entre los genomas de las cepas de DENV-2 estuvo en el rango de 89,1 y 99,2%. Al realizar un árbol de relación filogenética (Figura 9) se observa como los DENV se segregan de acuerdo a su serotipo viral. En el caso particular de DENV-2, se evidencia el agrupamiento entre los mismos, y a su vez la segregación genotípica que sitúa a las cepas autóctonas (1693, 19094, 28105, 29681) dentro de lo que ha sido denominado el genotipo asiático/americano (As/Am), aparte de los genotipos asiático (As) y americano (Am).

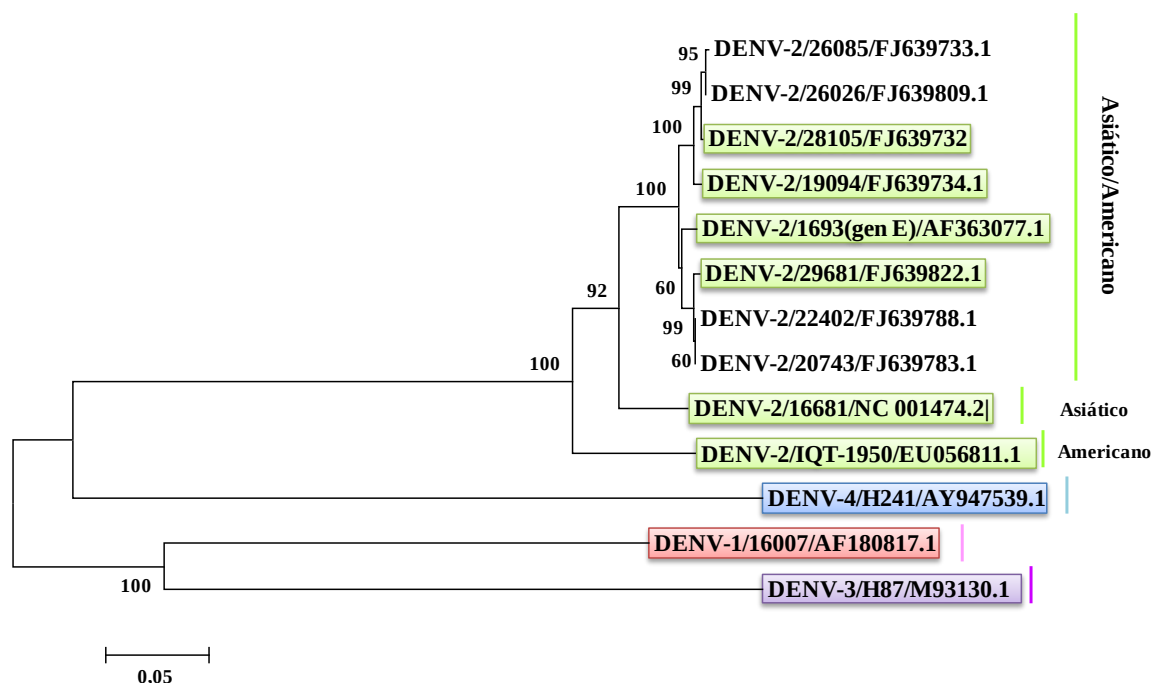


Figura 9. Relación filogenética de cepas de DENV-1, DENV-3, DENV-4 y dos cepas foráneas y ocho (08) cepas autóctonas de DENV-2 basadas en las secuencias del genoma completo (excepto DENV-2/1693) realizado con el programa de computación MEGA5. El árbol filogenético óptimo fue generado mediante el método Neighbor-Joining. En cada una de las ramas se indican los porcentajes ≥ 60 de las réplicas de los árboles mediante el *test de bootstrap* de 1000 replicas. Las distancias evolutivas fueron calculadas mediante el método de Tamura-Nei (Tamura-Nei, 2011). Cada cepa fue denominada considerando el serotipo viral, el código LARDIDEV, número de acceso al *GenBank*. En el caso de la cepa DENV-2/1693, la relación filogenética se realizó comparando la secuencia nucleotídica correspondiente al gen de la envoltura (E).

4.1.1.- Análisis de las secuencias nucleotídicas del fragmento 5'UTR de DENV.

Una vez determinada la identidad nucleotídica de los genomas de los serotipos de DENV, se procedió a la ejecución del alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de los primeros 100 nt de los genomas de los diferentes serotipos virales. Este análisis fue particularmente interesante, ya que permitió conocer la variabilidad de la región genómica objeto de estudio. Tal variabilidad se ubicó entre 77-96% de identidad nucleotídica, destacando de forma particular las diferencias establecidas por la secuencia nucleotídica de los serotipos DENV-1 y DENV-4, específicamente en la secuencia de regiones importantes para la supervivencia viral, tales como la región SLA (Figura 10). Se observa, además

como la zona espaciadora oligoU, ubicada entre SLA y SLB permanece idéntica entre las secuencias analizadas.

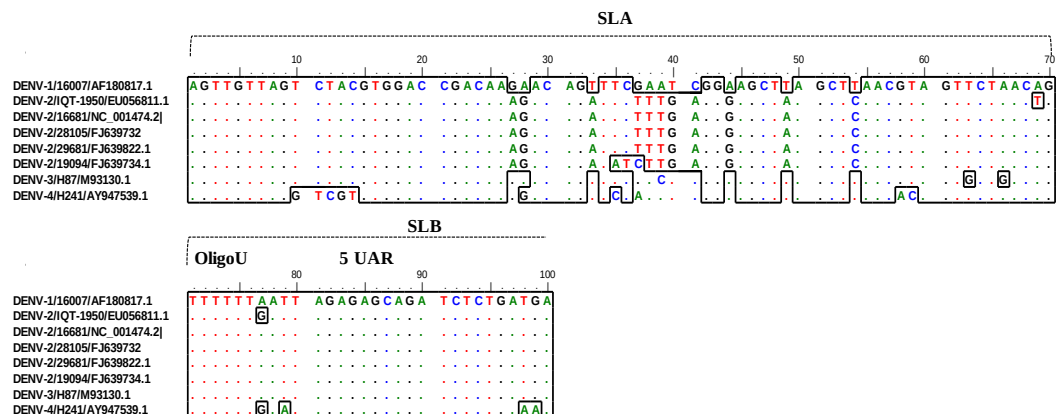


Figura 10. Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de la región inicial del genoma (5'UTR) de ocho cepas de los diferentes serotipos de DENV mediante el método Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Se indican las zonas SLA y SLB (OligoU y 5'UAR) descritas para 5'UTR de DENV.

-Alineamiento de la secuencia nucleotídica del fragmento 5'UTR de DENV-1:

se realizó el alineamiento haciendo uso de la secuencia nucleotídica de la cepa 16007 y las correspondientes a 14 secuencias de cepas autóctonas, aisladas en el estado Aragua entre el año 1997 y 2008, se observó un rango de identidad entre 94 y 100% en las secuencias. Las diferencias estuvieron dadas por la diversidad de nucleótidos ubicados entre las posiciones 39 y 53 de la región SLA. El codón de iniciación ATG se ubicó en la posición 95 (Figura 11).

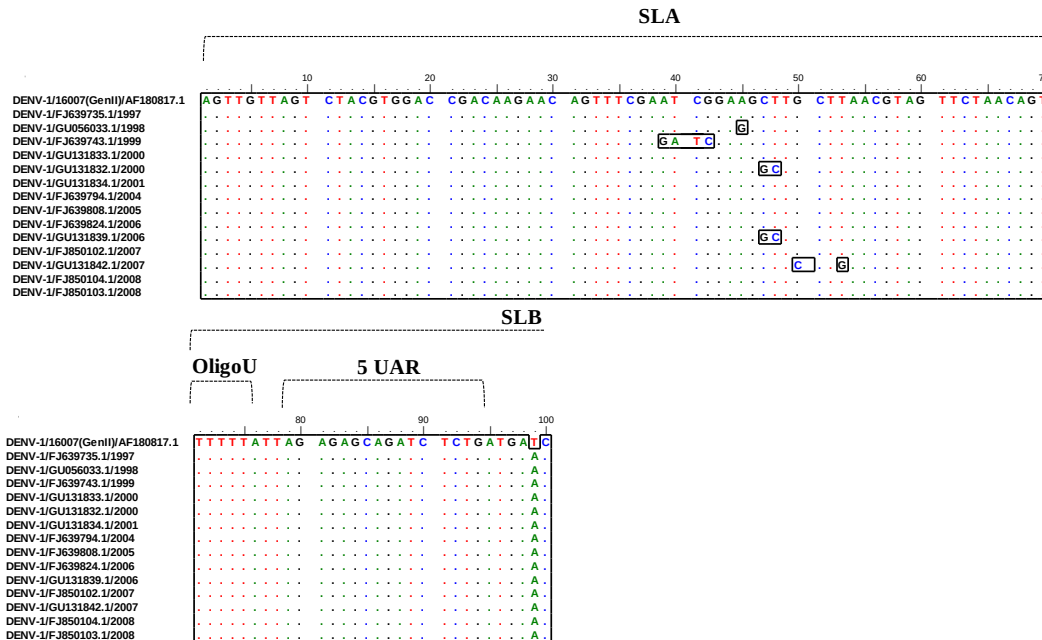


Figura 11. Alineamiento múltiple de 14 secuencias nucleotídicas de 100 nt correspondientes a la región inicial del genoma (5'UTR) de cepas autóctonas de DENV-1 teniendo como referencia la secuencia de la cepa 16007 (DENV-1/Nº de acceso GenBank: AF180817.1).

-Alineamiento de la secuencia nucleotídica del fragmento 5'UTR de DENV-2:

las secuencias iniciales del genoma de las cepas de DENV-2 presentaron un valor de identidad intraserotípico de 94-100%, una vez se alinearon los primeros 100 nt de la cepa 16681, con una cepa correspondiente al genotipo Am y el resto de autóctonas pertenecientes al genotipo Am/As, aisladas entre 1996 y 2008 en el estado Aragua. Ahora bien, si el alineamiento se circunscribe por ejemplo a dos de las cepas utilizadas en el estudio (16681 y 19094) la identidad nucleotídica es de 97%, debido a la diferencia establecida en las posiciones 35,36 y 37 de la secuencia nucleotídica, donde para la cepa 16681 se observan los nucleótidos TCT, mientras que para 19094 es ATC. Destaca en este caso, que las diferencias observadas en el patrón de identidad nucleotídica ocurre por cambios de bases entre las posiciones 33 y 37, así como entre los nucleótidos 66 y 70 de SLA. El codón de iniciación ATG se ubicó en la posición 97 (Figura 12).

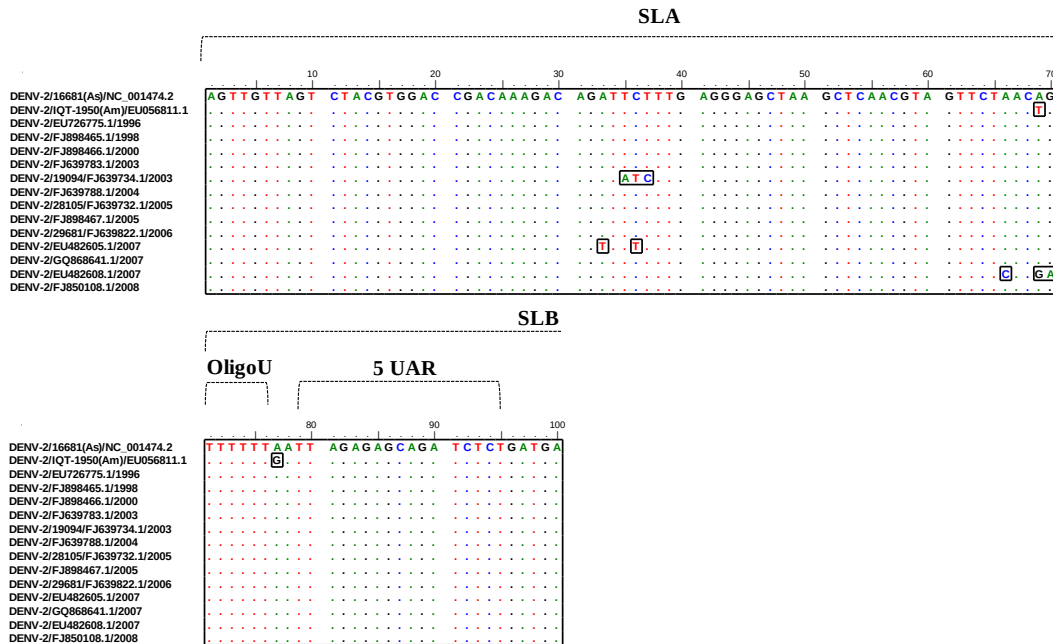


Figura 12. Alineamiento múltiple de 13 secuencias nucleotídicas de 100 nt correspondientes a la región inicial del genoma (5'UTR) de cepas autóctonas de DENV-2 teniendo como referencia las secuencias de las cepas: 16681 (DENV-2/Nº de acceso GenBank: NC_001474.2) y 1950IQT (DENV-2/Nº de acceso GenBank: EU056811.1).

-Alineamiento de la secuencia nucleotídica del fragmento 5'UTR de DENV-3:

en relación a este serotipo, la comparación de la secuencia H87 con las correspondientes a aislados aragüesños, circulantes en el estado entre los años 2000 y 2008, se observa que la identidad nucleotídica intraserotípica se ubica entre 92 y 100%, dada por la diferencia de nucleótidos entre las posiciones 38 y 54, así como de un cambio único observado en la posición 64, específicamente para la cepa H87 corresponde la base Guanina (G), mientras que para el resto de las cepas predomina la base Adenina (A). Para estas cepas, el codón ATG se ubica en la posición 94 (Figura 13).

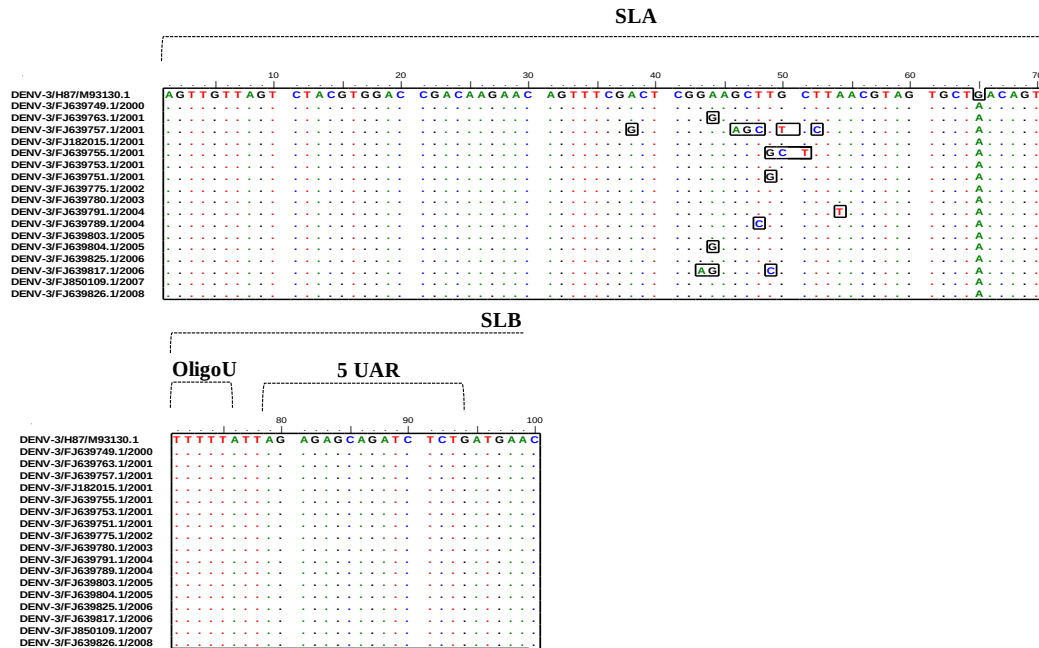


Figura 13. Alineamiento múltiple de 17 secuencias nucleotídicas de 100 nt correspondientes a la región inicial del genoma (5'UTR) de cepas autóctonas de DENV-3 teniendo como referencia la secuencia de la cepa: H87 (DENV-3/Nº de acceso GenBank: M93130.1).

-Alineamiento de la secuencia nucleotídica del fragmento 5'UTR de DENV-4: este serotipo viral destaca por su amplia variabilidad en relación a los valores de identidad en la secuencia nucleotídica, que en este caso están entre 85 y 100%. Se observa una secuencia TCT entre los nucleótidos 10 y 12, común entre las cepas venezolanas a diferencia de lo observado en esa misma posición para la cepa H241, además de variabilidad nucleotídica entre las posiciones 26 y 40 de la cadena genómica 5'UTR-C, así como en los nucleótidos 77 y 78. El codón de inicio (ATG) de las cepas de DENV-4 se describe a partir de la posición nucleotídica 101 (Figura 14).

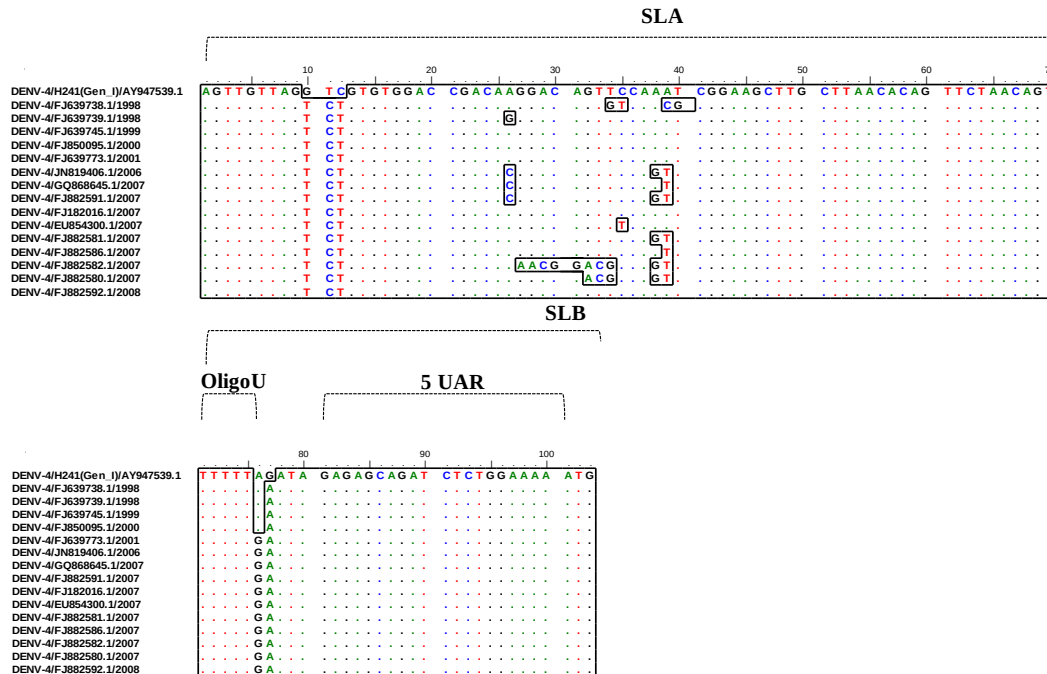


Figura 14. Alineamiento múltiple de 15 secuencias nucleotídicas de 100 nt correspondientes a la región inicial del genoma (5'UTR) de cepas autóctonas de DENV-4 teniendo como referencia la secuencia de la cepa: H241 (DENV-4/Nº de acceso GenBank: AY947539.1).

De acuerdo a lo expuesto, cuando se comparan las secuencias de nucleótidos que conforman la región 5'UTR-C de los diferentes serotipos virales, resulta interesante observar, como la mayor variabilidad destaca en la región SLA, mientras que la región espaciadora oligoU permanece idéntica en todas las secuencias. A diferencia de SLA, la cadena de nucleótidos ubicados antes del codón de inicio (ATG), la región denominada 5'UAR permanece muy conservada entre los DENV. Estas diferencias resultan de especial interés, debido a que la variabilidad mostrada entre los serotipos, inclusive entre cepas de un mismo serotipo, pueden determinar la clasificación filogenética, así como aspectos relacionados con eventos de supervivencia viral (*e.g.* replicación y síntesis de proteínas) y la orientación en el diseño de estrategias destinadas a modular la expresión genética.

4.2.- Amplificación de la región de iniciación de síntesis de proteínas (5'UTR-C) del genoma viral de cepas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4.

Con el fin de obtener el fragmento 5'UTR-C de las cepas de los diferentes serotipos de DENV, se procedió a la estandarización de las condiciones de la técnica de RT-PCR. Las muestras biológicas utilizadas correspondieron a los ARNv obtenidos de cepas de DENV [DENV-1 (16007), DENV-2 (16681), DENV-3 (H87), DENV-4 (H241)], cuyas secuencias nucleotídicas, se encontraban depositadas en el GenBank bajo los números referidos en la metodología (3.3.3.2.). Para lograr la amplificación de los mencionados fragmentos, se diseñaron cuatro cebadores reversos (UTRR-1, UTRR-2, UTRR-3 y UTRR-4), uno para cada serotipo viral, ya que el cebador directo contenía la misma secuencia nucleotídica para todos los serotipos virales (Tabla 3). Estos oligonucleótidos fueron analizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, tal como se especificó en la metodología (3.5.4.3.), donde se pudo observar como las bandas de ADN de cada cebador presentaron una migración acorde a lo esperado, asimismo fue posible comprobar la integridad de los mismos.

Las condiciones de ensayo de la RT-PCR se estandarizaron mediante la variación de las concentraciones de los reactantes (cebadores y enzimas *Taq* polimerasa y Reverso Transcriptasa). Inicialmente, se evaluó la preparación de las mezclas de reacción utilizando dos soluciones amortiguadoras diferentes, así como distintas concentraciones de cebadores para amplificar la región 5'UTR-C de la cepa 16007 (DENV-1). En la Figura 15 se observan las mejores bandas de ADN cuando se utilizó la solución B, correspondiente al tampón comercial de la enzima *Taq* polimerasa (GoTaq® Flexi DNA Polymerase) (© Promega Corporation), así como una concentración mínima de cebadores (0,5 μ M) para amplificar una cepa de DENV-1 (16007). En el caso de DENV-2, DENV-3 y DENV-4, las concentraciones ideales de uso de los cebadores fueron 1 μ M, 0,5 μ M y 0,75 μ M; respectivamente (Figura 16). Posteriormente, se analizaron las cantidades de enzimas *Taq* polimerasa y AMV y se observó que con 1,25 U de esta última era suficiente para la obtención de bandas íntegras, mientras que en el caso de la enzima *Taq* polimerasa los serotipos virales amplificaban con 1,25 U, a excepción del serotipo DENV-4 que amplificó con 2,5 U (Figura 17 y 18). Con las condiciones óptimas establecidas (Tabla 4), se logró la amplificación del fragmento 5'UTR-C de cepas de los diversos serotipos virales, incluyendo las cepas autóctonas de DENV-2 (1693, 19094, 28105 y 29681) referidos en la

metodología (3.2.1.). En todos los casos, se obtuvieron bandas íntegras y nítidas en correspondencia con los tamaños moleculares esperados [275 pb (DENV-1), 300(DENV-2), 274 pb (DENV-3) y 339 pb (DENV-4)] (Figura 19).

Tabla 3. Secuencias de los cebadores directos y reversos diseñados mediante el programa Gene Runner Versión 3.05. para la amplificación de los fragmentos 5'UTR-C de los diferentes serotipos de DENV

Serotipo viral	Cebadores ^a	Secuencias de los cebadores (Dirección 5'-3')	Posición en la secuencia ^b	Tamaño del producto (pb)
DENV-1	UTRD-1	AGTTGTTAGTCTACGTGGAC	1-20	275
	UTRR-1	GAGGTATGGCTAGAAATCTT	256-275	
DENV-2	UTRD-2	AGTTGTTAGTCTACGTGGAC	1-20	300
	UTRR-2	TCTCTTCAATATCCCTGCTG	281-300	
DENV-3	UTRD-3	AGTTGTTAGTCTACGTGGAC	1-20	274
	UTRR-3	TGGAATGGCTAGAAATCTGA	255-274	
DENV-4	UTRD-4	AGTTGTTAGTCTACGTGGAC	1-20	339
	UTRR-4	GTATCTTGATGGCCTTATTT	320-339	

^a Los nombres de los cebadores que contienen "D" indican el sentido directo del genoma, los cebadores con "R" indican la orientación complementaria en sentido reverso.

^b Las posiciones del genoma son de acuerdo a las secuencias nucleotídicas de DENV-1(Nº de acceso 001477.1), DENV-2(Nº de acceso: 001474.2), DENV-3 (Nº de acceso: 001475.2), DENV-4 (Nº de acceso: 002640.1)] obtenidas del GenBank.

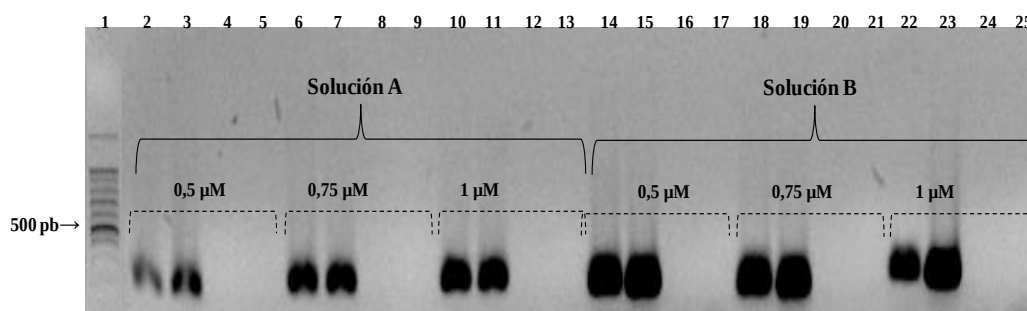


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los fragmentos correspondientes a la región genómica 5'UTR-C de DENV-1 amplificados con diferentes concentraciones (0,5 μ M, 0,75 μ M y 1 μ M) de cebadores (UTRD-1 y UTRR-1), así como con diferentes soluciones amortiguadoras. **A.** Buffer AMV® *Reverse Transcriptase* y **B.** GoTaq® *Flexi Buffer colorless*). **RT-PCR realizada con la solución A.** **1:** Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen), **2-3:** DENV-1 [16007 (0,5 μ M)], **4:** Control negativo, **5:** Control de mezcla, **6-7:** DENV-1 [16007 (0,75 μ M)], **8:** Control negativo, **9:** Control de mezcla, **10-11:** DENV-1 [16007 (1 μ M)], **12:** Control negativo, **13:** Control de mezcla. **RT-PCR realizada con la solución B.** **14-15:** DENV-1 [16007 (0,5 μ M)], **16:** Control negativo, **17:** Control de mezcla, **18-19:** DENV-1 [16007 (0,75 μ M)], **20:** Control negativo, **21:** Control de mezcla, **22-23:** DENV-1 [16007 (1 μ M)], **24:** Control negativo, **25:** Control de mezcla.

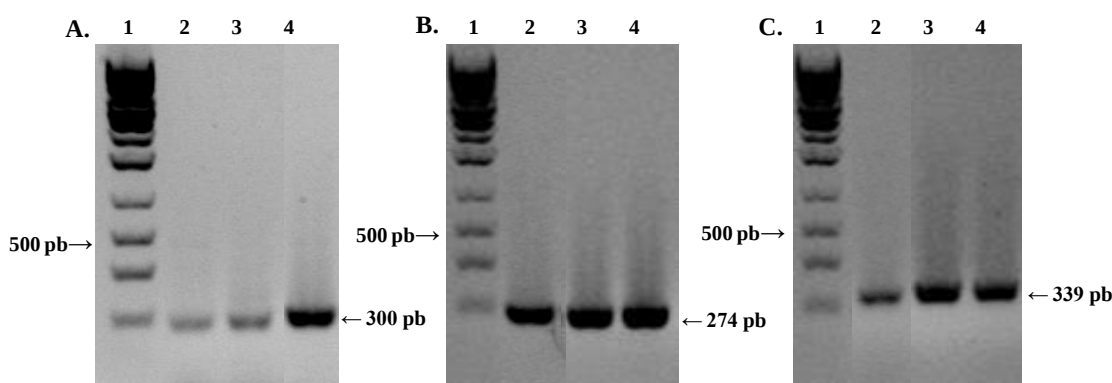


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los fragmentos correspondientes a la región genómica 5'UTR-C de los serotipos DENV-2, DENV-3 y DENV-4 amplificados con diferentes concentraciones (0,5 μ M, 0,75 μ M y 1 μ M) de cebadores. **A.** **1:** Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen), **2:** DENV-2 [16681 (0,5 μ M)], **3:** DENV-2 [16681 (0,75 μ M)], **4:** DENV-2 [16681 (1 μ M)]. **B.** **1:** Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen), **2:** DENV-3 [H87 (0,5 μ M)], **3:** DENV-3 [H87 (0,75 μ M)], **4:** DENV-3 [H87 (1 μ M)]. **C.** **1:** Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen), **2:** DENV-4 [H241 (0,5 μ M)], **3:** DENV-4 [H241 (0,75 μ M)], **4:** DENV-4 [H241 (1 μ M)].

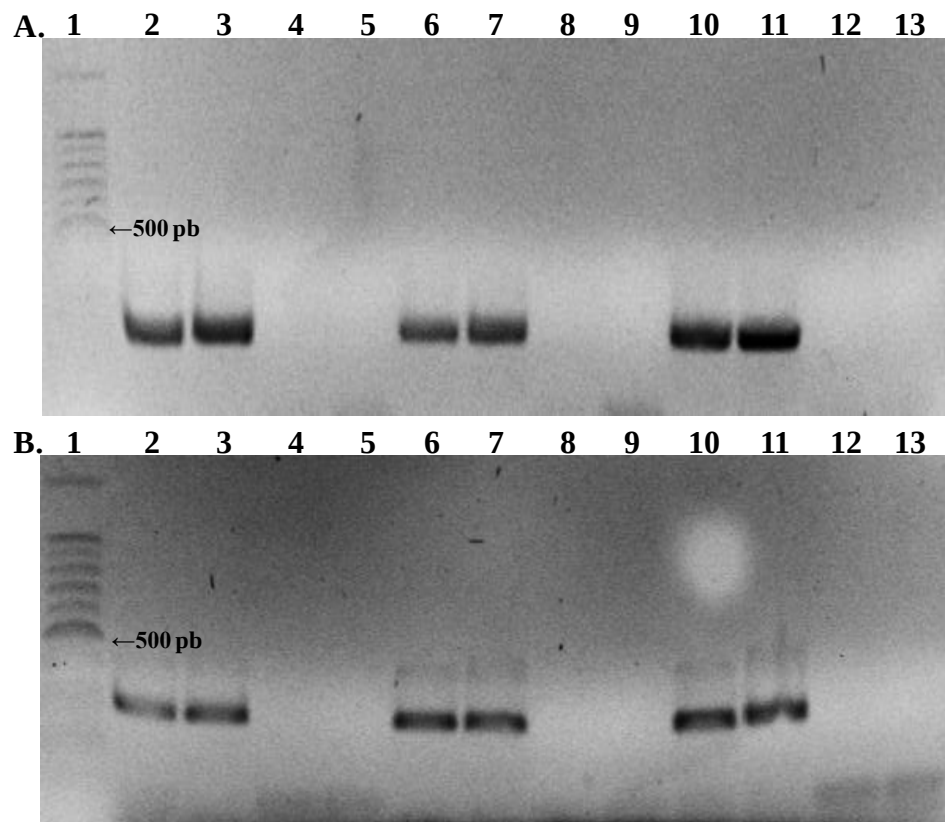


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los fragmentos correspondientes a la región genómica 5'UTR-C de los serotipos DENV-1 y DENV-2 amplificados con diferentes cantidades de la enzima *Taq* polimerasa (0,5 U, 1,25 U y 2,5 U). **A.** 1: Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen), 2-3: DENV-1 [16007 (0,5 U)], 4: Control negativo, 5: Control de mezcla, 6-7: DENV-1 [16007 (1,25 U)], 8: Control negativo, 9: Control de mezcla, 10-11: DENV-1 [16007 (2,5 U)], 12: Control negativo, 13: Control de mezcla. **B.** 1: Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen), 2-3: DENV-2 [16681 (0,5 U)], 4: Control negativo, 5: Control de mezcla, 6-7: DENV-2 [16681 (1,25 U)], 8: Control negativo, 9: Control de mezcla, 10-11: DENV-2 [16681 (2,5 U)], 12: Control negativo, 13: Control de mezcla.

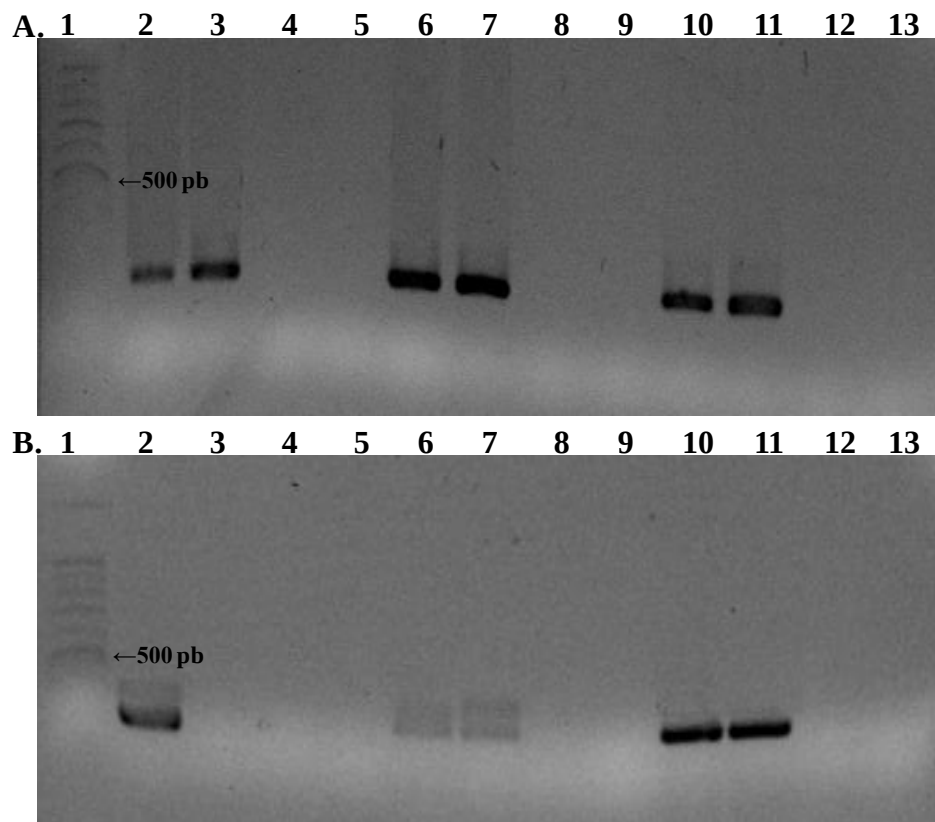


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los fragmentos correspondientes a la región genómica 5'UTR-C de los serotipos DENV-3 y DENV-4 amplificados con diferentes cantidades de la enzima *Taq* polimerasa (0,5 U, 1,25 U y 2,5 U). **A. 1:** Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen), **2-3:** DENV-3 [H87 (0,5 U)], **4:** Control negativo, **5:** Control de mezcla, **6-7:** DENV-3 [H87 (1,25 U)], **8:** Control negativo, **9:** Control de mezcla, **10-11:** DENV-3 [H87 (2,5 U)], **12:** Control negativo, **13:** Control de mezcla. **B. 1:** Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen), **2-3:** DENV-4 [H241 (0,5 U)], **4:** Control negativo, **5:** Control de mezcla, **6-7:** DENV-4 [H241 (1,25 U)], **8:** Control negativo, **9:** Control de mezcla, **10-11:** DENV-4 [H241 (2,5 U)], **12:** Control negativo, **13:** Control de mezcla.

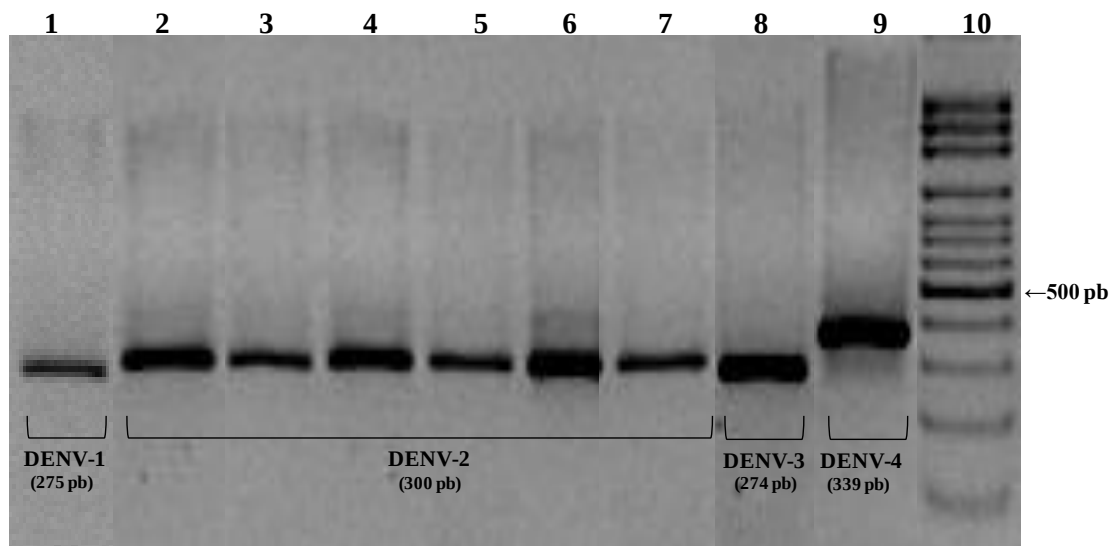


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los fragmentos correspondientes a la región 5'UTR-C de las diferentes cepas del DENV. **1:** DENV-1 (16007), **2:** DENV-2 (1693), **3:** DENV-2 (19094), **4:** DENV-2 (28105), **5:** DENV-2 (29681), **6:** DENV-2 (2124IQT), **7:** DENV-2 (16681), **8:** DENV-3 (H87), **9:** DENV-4 (H241), **10:** Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen).

Tabla 4. Condiciones óptimas establecidas para los ensayos de amplificación de la región 5'UTR-C de cepas de los diferentes serotipos de DENV mediante RT-PCR

Reactantes	Concentración			
	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
Tampón de reacción (GoTaq® <i>Flexi Buffer colorless</i>) 5X	1X	1X	1X	1X
MgCl ₂ 25 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
Cebador directo	0,5 µM	1 µM	0,5 µM	0,75 µM
Cebador reverso	0,5 µM	1 µM	0,5 µM	0,75 µM
Taq polimerasa (GoTaq® <i>Flexi DNA Polymerase</i>)	1,25 U	1,25 U	1,25 U	1,25 U
Transcriptasa Reversa (AMV® <i>Reverse Transcriptase</i>)	1,25 U	1,25 U	1,25 U	1,25 U
ARN viral	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL

Con las condiciones establecidas para la amplificación de los fragmentos 5'UTR-C de DENV, se realizaron ensayos para la obtención de estos mismos fragmentos, pero haciendo uso de los cebadores directo y reverso de DENV-2, a los cuales se añadieron las

dianas de restricción GGGCC▼C y G▼AATTC; respectivamente (3.3.3.2.). Con estos nucleótidos incorporados, las secuencias de estos cebadores fueron las siguientes: cebador directo (**UTRD-2/DR**: 5'-GAGAGAATTCTCTCTTCAATATCCCTGCTG-3') y cebador reverso (**UTRR-2/DR**: 5'-GAGAGGGGCCCAGTTGTTAGTCTACGTGGAC-3'). Los resultados de la amplificación de 5'UTR-C de las cepas de DENV-2 foráneas (16681, 2124IQT) y autóctonas (28105 y 29681) haciendo uso de los mencionados cebadores resultó en la amplificación de productos de 320 pb, tal como se observa en la Figura 20, estos productos fueron posteriormente utilizados para la clonación de 5'UTR-C en el plásmido pGEM®-T Easy.

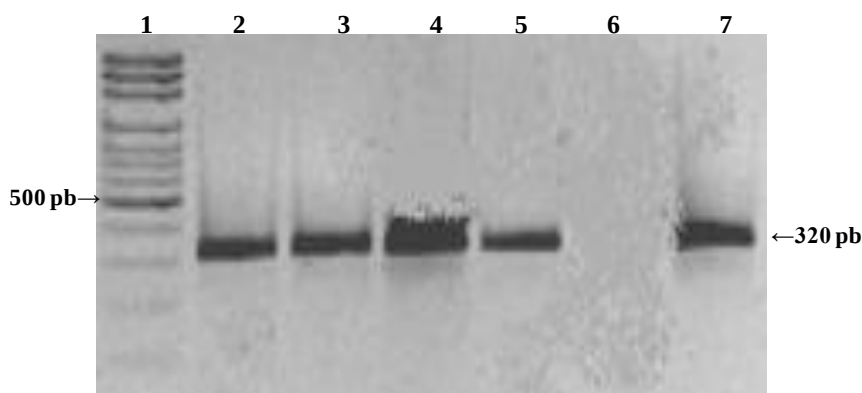


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los fragmentos de 320 pb correspondientes a la la región 5'UTR-C de cepas de DENV-2. **1:** Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen), **2:** DENV-2 (16681), **3:** DENV-2 (2124-IQT), **4:** DENV-2 (28105), **5:** DENV-2 (29681), **6:** Control negativo, **7:** Control positivo.

4.3. Especificidad de la RT-PCR para la amplificación de la región de iniciación de síntesis de proteínas (5'UTR-C) del genoma viral de cepas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 y sensibilidad analítica para la obtención del fragmento 5'UTR-C de DENV-2.

Luego de optimizadas las condiciones de la RT-PCR, se valoró la especificidad y sensibilidad analítica del ensayo. En relación a la especificidad de la técnica, se realizó inicialmente el análisis bioinformático de las secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados, específicamente se realizó la comparación de las mismas, a través del programa

BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) con las secuencias de flavivirus depositadas en el *GenBank*, observándose que los mismos, coincidían exclusivamente con secuencias nucleotídicas correspondientes a los fragmentos de los genomas para los cuales habían sido diseñados. Asimismo, haciendo uso de los ARNv de las cepas de DENV [DENV-1 (16007), DENV-2 (16681), DENV-3 (H87) y DENV-4 (H241)] se realizaron ensayos independientes, en los cuales cada ARNv fue sometido a amplificación por RT-PCR haciendo uso de los distintos juegos de cebadores. En cada caso, se observó amplificación de cada serotipo viral en estrecha concordancia con los cebadores específicos diseñados para cada uno (Figura 21). El parámetro sensibilidad analítica, se analizó utilizando el ARNv de diluciones seriadas del cultivo celular de la cepa 16681 (DENV-2). Los resultados evidenciaron que la técnica fue capaz de amplificar hasta 10 UFP/mL de la mencionada cepa (Figura 22).

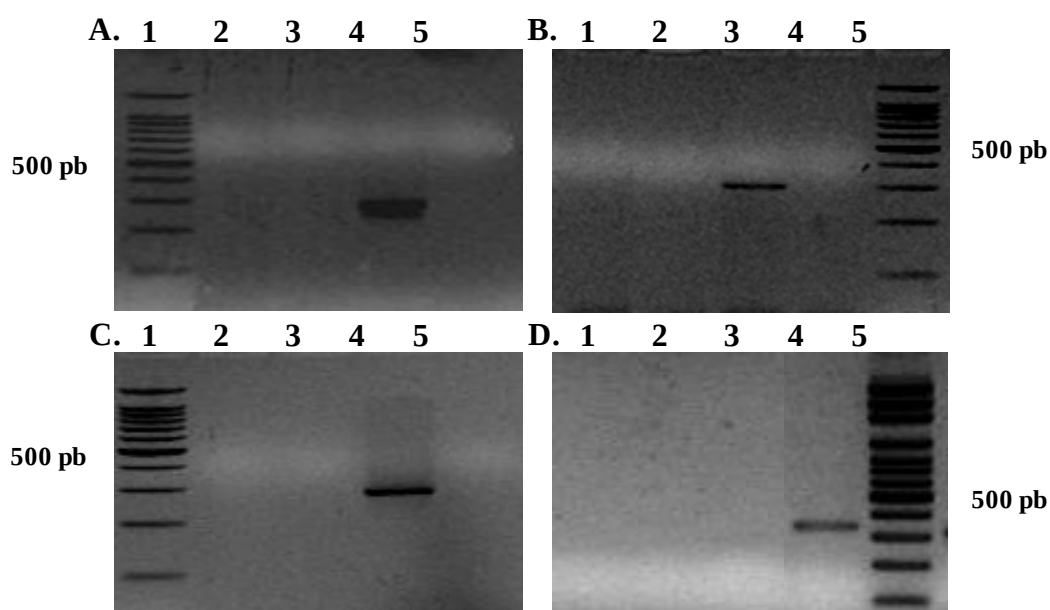


Figura 21. Especificidad del ensayo de amplificación del fragmento 5'UTR-C de las cepas de DENV haciendo uso de los diferentes juegos de cebadores. **A. Amplificación con los cebadores UTRD-1 y UTRR-1.** 1: DENV-1 (16007), 2: 16681 (DENV-2), 3: H87 (DENV-3), 4: H241 (DENV-4), 5: Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen). **B. Amplificación con los cebadores UTRD-2 y UTRR-2.** 1: 16007 (DENV-1), 2: 16681 (DENV-2), 3: H87 (DENV-3), 4: H241 (DENV-4), 5: Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen). **C. Amplificación con los cebadores UTRD-3 y UTRR-3.** 1: 16007 (DENV-1), 2: 16681 (DENV-2), 3: H87 (DENV-3), 4: H241 (DENV-4), 5: Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen). **D. Amplificación con los cebadores UTRD-4 y UTRR-4.** 1: 16007

(DENV-1), **2:** 16681 (DENV-2), **3:** H87 (DENV-3), **4:** H241 (DENV-4), **5:** Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen).

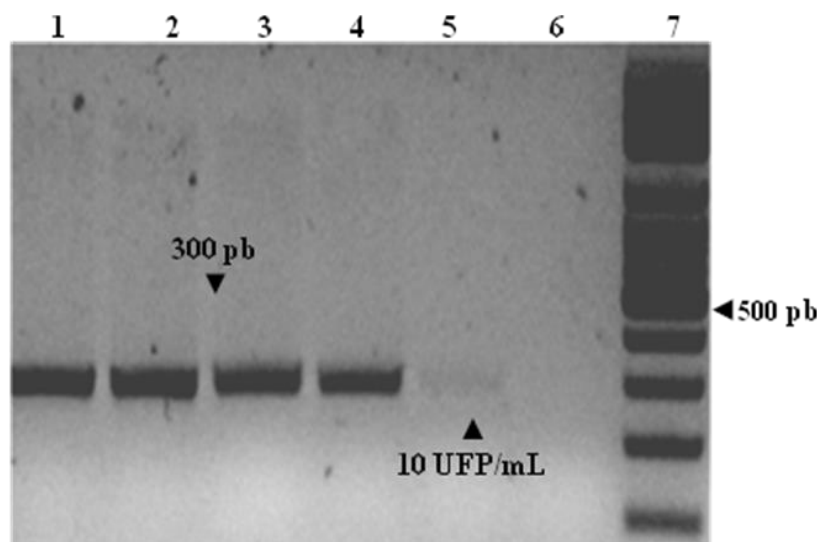


Figura 22. Sensibilidad analítica del ensayo mediante amplificación por RT-PCR del fragmento 5'UTR-C a partir ARNv obtenido de diluciones seriadas de la cepa 16681 (DENV-2). **1:** 100.000 UFP/mL, **2:** 10.000 UFP/mL, **3:** 1000 UFP/mL, **4:** 100 UFP/mL, **5:** 10 UFP/mL, **6:** Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen).

4.4. Análisis de restricción enzimática de los productos 5'UTR-C obtenidos mediante RT-PCR cepas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4.

Después de obtener los productos de la región 5'UTR-C de las cepas de DENV, se realizaron ensayos que complementarían el análisis de la identidad de los fragmentos amplificados de las diferentes cepas analizadas. Para ello, se efectuó un análisis de las dianas de restricción sobre las secuencias nucleotídicas de las cepas de DENV-1 (16007, Número de acceso: AF180817), DENV-2 (16681, Número de acceso: NC_001474.2), DENV-3 (H87, Número de acceso: M93130) y DENV-4 (H241, Número de acceso: AY957539) y se seleccionaron las enzimas *Sal* I (DENV-1), *Pst* I (DENV-2), *Hae* III (DENV-3) y *Msp* I (DENV-4), cuyos sitios de corte y longitud de los fragmentos esperados se observan en la tabla 5.

Tabla 5. Sitio de restricción enzimática y tamaño de los fragmentos obtenidos a partir de las secuencias correspondientes a los fragmentos 5'UTR-C de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 mediante el programa bioinformático Gene Runner Versión 3.05. (Spruyt y Buquicchio, 1994)

Serotipo viral	Enzima de restricción*	Diana de restricción	Posición del corte	Tamaño de los productos (pb)
DENV-1	<i>Sal I</i>	GTCGAC	120	155,120
DENV-2	<i>Pst I</i>	CTGCAG	212	212, 88
DENV-3	<i>Hae III</i>	GGCC	213	213,61
DENV-4	<i>Msp I</i>	CCGG	202	202,137

*©Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA

El análisis electroforético luego de la digestión completa de los fragmentos de 5'UTR-C de cada serotipo viral reveló los productos esperados en cada caso, exceptuando aquellos productos correspondientes a las cepas autóctonas de DENV-2. En este caso, se observa como estas cepas no mostraron el patrón esperado, lo que sugirió la segregación de los virus en dos grupos diferentes desde el punto de vista genómico. El primero de ellos representado por las cepas foráneas (16681 y 2124IQT), aisladas en Tailandia y Perú; respectivamente, mientras que el segundo grupo, en las cuales no se observó clivaje por parte de la enzima seleccionada, estuvo conformado por virus autóctonos, es decir virus que fueron aislados de muestras de pacientes del estado Aragua (Figura 23).

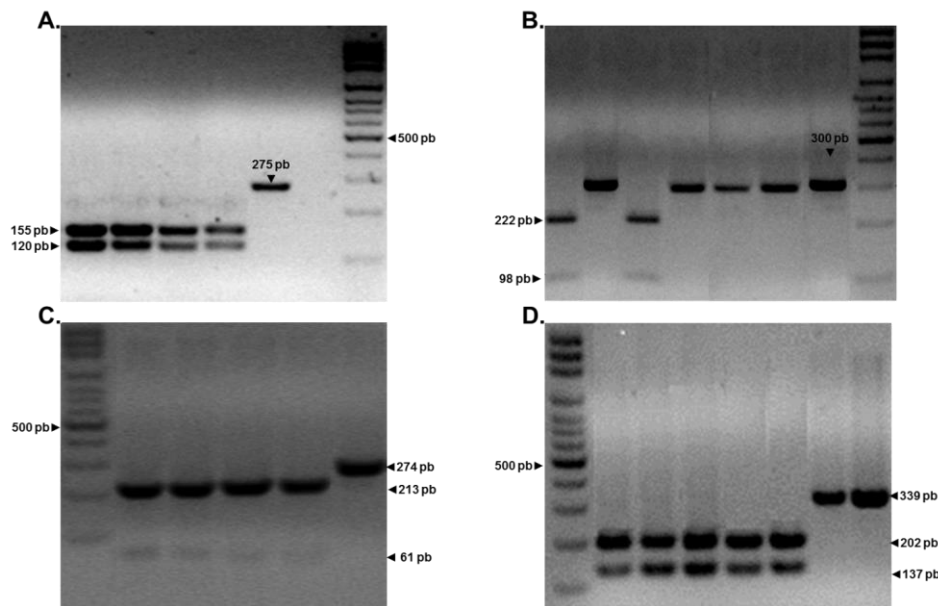


Figura 23. Electroforesis en gel de Agarosa al 2% correspondiente a los fragmentos producto de la digestión enzimática con enzimas de restricción. **A.** Digestión enzimática de la región 5'UTR-C correspondiente a la cepa 16007 (DENV-1) con la enzima *Sal* I, **1-4:** DENV-1 (16007), **5:** DENV-1 (16007) sin digerir, **7:** Marcador:100 pb *DNA step ladder* (Axygen). **B.** Digestión enzimática de la región 5'UTR-C correspondiente a cepas de DENV-2 con la enzima *Pst* I, **1:** DENV-2 (2124IQT), **2:** DENV-2 (1693), **3:** DENV-2 (16681), **4:** DENV-2 (19094), **5:** DENV-2 (28105), **6:** DENV-2 (29681), **7:** DENV-2 (16681) sin digerir, **8:** Marcador:100 pb *DNA step ladder* (Axygen). **C.** Digestión enzimática de la región 5'UTR-C correspondiente a la cepa H87 (DENV-3) con la enzima *Hae* III, **1:** Marcador:100 pb *DNA step ladder* (Axygen), **2-5:** DENV-3 (H87), **6:** DENV-3 (H87) sin digerir, **D.** Digestión enzimática de la región 5'UTR-C correspondiente a la cepa H241 (DENV-4) con la enzima *Msp* I, **1:** Marcador:100 pb *DNA step ladder* (Axygen), **2-6:** DENV-3 (H87), **7-8:** DENV-3 (H241) sin digerir.

4.5.- Traducción dirigida por los ARNv naturales de cepas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 en un sistema libre de células de placenta humana.

4.5.1.- Obtención del ARN viral para la traducción *in vitro*

La traducción de ARNv naturales se evaluó en un sistema libre de células constituido por la fracción postmitocondrial (S-30) de placenta humana. Los ensayos se realizaron con los ARNv naturales obtenidos a partir de las cepas 16007 (DENV-1), asiática (16681) y autóctonas (1693 y 19094) de DENV-2, H-87 (DENV-3) y H-241 (DENV-4). La cantidad total de los ARNv extraídos se determinó midiendo la D.O. (A_{260}) de las fracciones obtenidas (sedimento y sobrenadante) después de aplicar el procedimiento

explicado en la metodología. En la Tabla 6 se muestran los resultados para los diferentes DENV.

Los resultados permitieron observar como los sedimentos virales de todas las cepas de DENV mostraron valores de ARN (μg totales) por encima de los obtenidos en los sobrenadantes (Tabla 6). Con el método empleado el sedimento debe contener los ARNv, al obtener una proporción respecto al total (sedimento más sobrenadante) entre 65 y 79%, lo que indica que el procedimiento permite obtener una fracción enriquecida con los ARNv.

Tabla 6. Cantidad y porcentaje de los ARN en los sedimentos y sobrenadantes obtenidos de la ultracentrifugación a 16000 rpm en rotor SW-28 (Beckman Coulter Optima™ L-90K) de los cultivos celulares de cepas de DENV

Cepas DENV	Sedimento		Sobrenadante	
	μg	%	μg	%
DENV-1 (16007)	483,0	72	188,0	28
DENV-2 (16681)	303,6	70	129,5	30
DENV-2 (1693)	424,9	72	167,0	20
DENV-2 (19094)	920,0	79	247,3	21
DENV-3 (H-87)	501,9	73	183,4	27
DENV-4 (H-241)	324,3	65	178,3	35

Estos ARNv fueron evaluados con el fin de comprobar que en efecto, estas moléculas de ARN correspondían a los ARNv de los diferentes serotipos virales. De forma particular, era indispensable comprobar la presencia e integridad de la región de iniciación

para la traducción, correspondiente a 5'UTR. Sin embargo, también se analizaron otras regiones del genoma en los distintos sedimentos obtenidos, lo cual permitiría poner en evidencia la integridad de los genomas virales.

Las fracciones analizadas mediante RT-PCR para amplificación del fragmento 5'UTR-C, mostraron productos de los tamaños esperados, [275 pb (DENV-1), 300 pb (DENV-2), 274 pb (DENV-3) y 339 pb (DENV-4)] para cada una de las cepas analizadas (Figura 24).

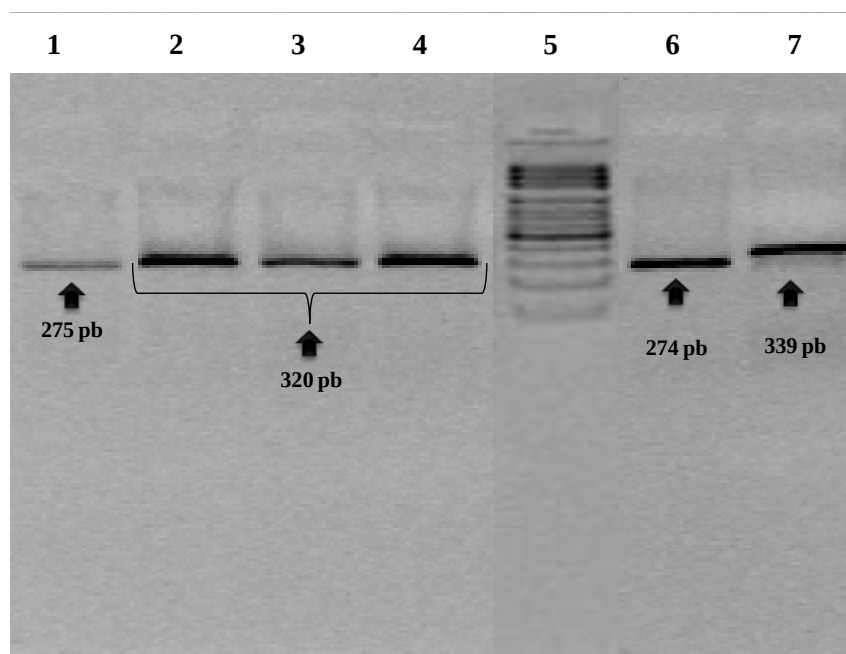


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa 2% de productos de amplificación de 5 'UTR-C de cepas de DENV. **1:** DENV-1 (16007); **2:** DENV-2 (16681); **3:** DENV-2 (1693); **4:** DENV-2 (19094); **5:** Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen); **6:** DENV-3 (H-87); **7:** DENV-4 (H-241).

Aunado al análisis anterior, se procedió a la amplificación de otras regiones de los genomas virales mediante RT-PCR. En este caso, la Figura 25 permitió demostrar, además de la amplificación de las 5'UTR-C de cada serotipo viral, los fragmentos C/prM ubicados desde el nucleótido 134 hasta el 644 y el gen NS5 ubicado entre los nucleótidos 7871 al 9107. En todos los casos, se observaron bandas correspondientes a los tamaños esperados,

específicamente 511 pb (C/prM/M) y 1385 pb (NS5), sugiriendo la integridad de los ARNv que serían empleados en los subsiguientes ensayos de traducción viral.

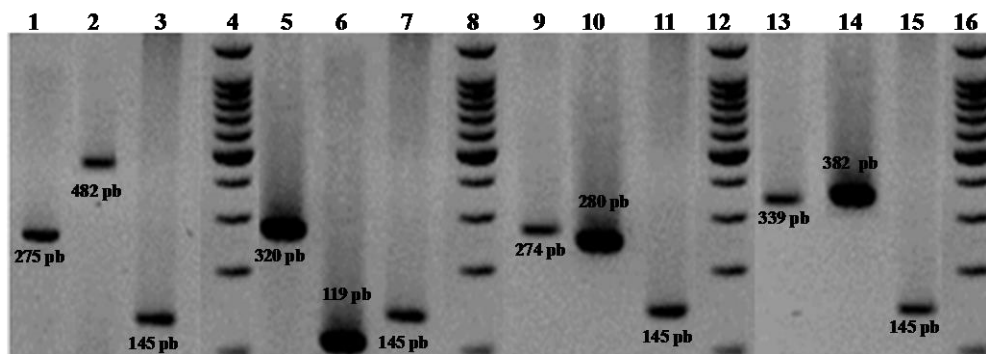


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa 2% de productos de amplificación de 5'UTR-C/ C/prM-M/ NS5 de DENV. **1:** 5' UTR-C 16007 (DENV-1); **2:** C/prM-M 16007 (DENV-1); **3:** NS5 16007 (DENV-1); **4:** Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen); **5:** 5' UTR-C 1693 (DENV-2); **6:** C/prM-M 1693 (DENV-2); **7:** NS5 1693 (DENV-2); **8:** Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen); **9:** 5'UTR-C H87 (DENV-3); **10:** C/prM-M H87 (DENV-3); **11:** NS 5 H87 (DENV-3); **12:** Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen); **13:** 5'UTR-C H241 (DENV-4); **14:** C/prM-M H241 (DENV-4); **15:** NS5 H241 (DENV-4); **16:** Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen).

4.5.2.- Actividad del sistema de traducción S-30 dirigida por ARNv natural.

Una vez analizados los ARNv de las cepas de DENV, se procedió a valorar la capacidad de los mismos para utilizar la maquinaria traduccional en un sistema libre de células constituido por la fracción post-mitocondrial (S-30) de placenta humana. Para ello, se realizaron ensayos de acuerdo a la metodología descrita por Ferreras *et al.* (2004) para este sistema de traducción *in vitro*.

Los ARNv se emplearon como fuente de ARN exógeno en el mencionado sistema, y la actividad traduccional se determinó mediante la medición de la incorporación de aminoácidos radiactivos a los polipéptidos sintetizados presentes en el material insoluble precipitado a alta temperatura (90 °C) con TCA (ácido tricloroacético 10%), tal como fue mencionado en la metodología (3.7.2.1.). Los resultados iniciales con los ARNv de dos

cepas de DENV-2 (1693 y 16681) se muestran en la Figura 26. Se observa que el sistema traduccional S-30 tiene actividad aun sin agregar ARNv. Esa actividad es dirigida por el ARNm endógeno de placenta que se encuentra en el sistema y se detecta por la radiactividad ^{14}C de 460 dpm incorporada en los polipéptidos sintetizados (Figura 27). Cuando al sistema se añadieron diferentes cantidades de los ARNv, la síntesis de proteínas aumentó en relación al control del ensayo, al observarse un aumento en las dpm ^{14}C incorporadas en el material insoluble que fue dependiente de la concentración de los ARN exógenos en el ensayo. En el caso específico del ARNv (16681) se evidencia que la máxima actividad de estimulación alcanza un valor alrededor de 60% sobre el control con una concentración de ARNv de aproximadamente 31 $\mu\text{g/mL}$. A concentraciones mayores (40 $\mu\text{g/mL}$) se observa una disminución de la actividad, posiblemente por saturación del sistema. Asimismo, con el ARNv de la cepa 1693, la máxima actividad fue de 70 % con valores alrededor de 40 $\mu\text{g/mL}$ del ARNv y también se observó la tendencia a una disminución de la actividad a mayores concentraciones a ésta. Estos resultados, comparados a los valores obtenidos con los ARNm endógenos, demostraron la eficiencia de los ARNv de DENV-2 en la formación del complejo traduccional *in vitro* de placenta humana

. De igual forma, este ensayo permitió determinar la concentración óptima del ARNv de DENV-2, como fuente de ARN exógeno en el sistema de traducción *in vitro*, demostrándose que la síntesis de proteínas con los ARNv resulta eficiente al emplear un rango que oscila entre 31 y 40 $\mu\text{g/mL}$.

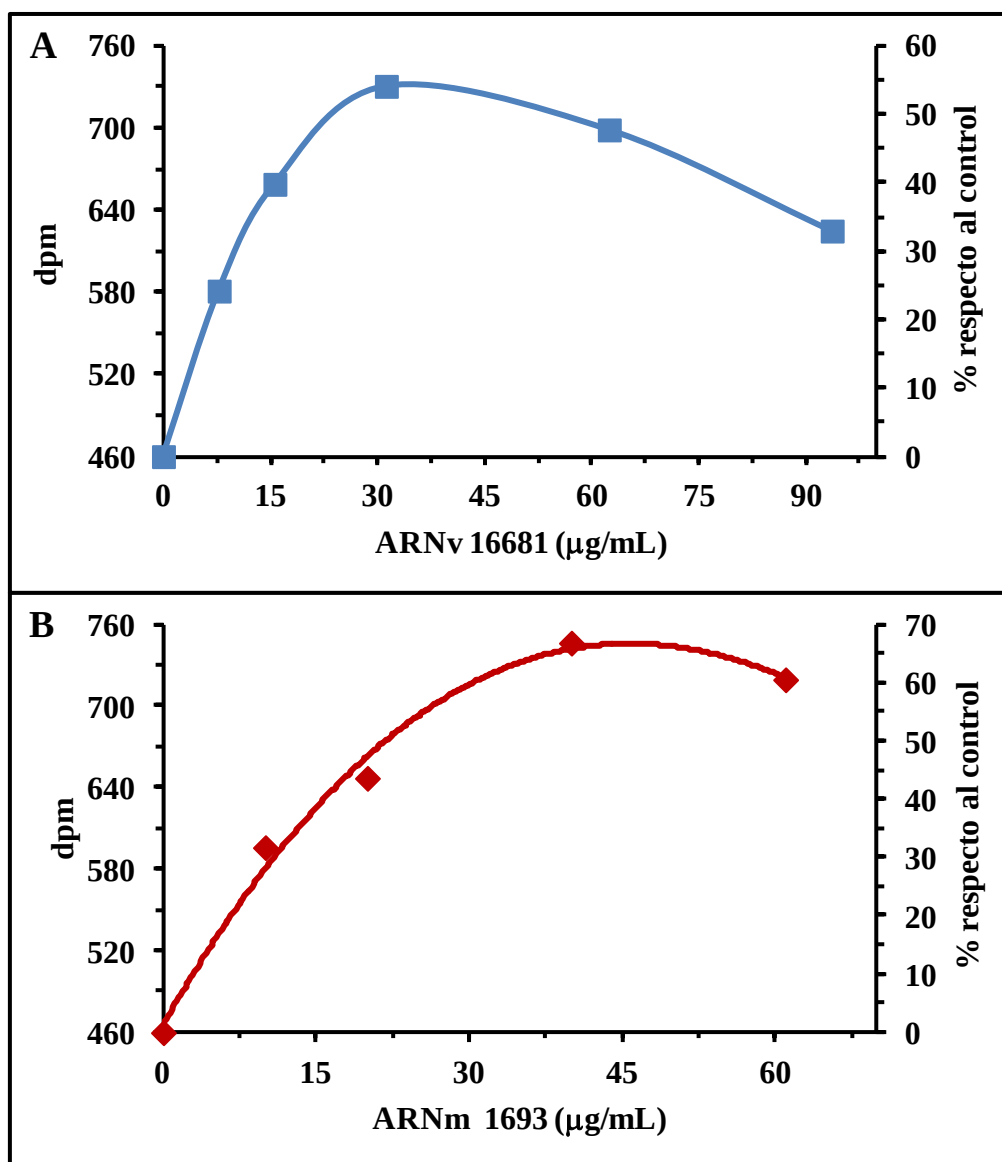


Figura 26. Actividad del sistema traduccional de placenta con los ARNV obtenidos a partir de las cepas de DENV-2 (16681 y 1693). El S-30 de placenta fue incubado bajo condiciones de síntesis de proteínas (Metodología 3.7.) con diferentes cantidades del ARNV de la cepa de referencia DENV-2 (16681) en (A) y del ARNV de la cepa autóctona (1693) en (B), Se indican las dpm de los ^{14}C aminoácidos incorporados en los polipéptidos sintetizados y el porcentaje de actividad frente al ARNm endógeno de placenta (control).

Con las concentraciones establecidas para los ARNV de las dos cepas en estudio, donde se observó la máxima actividad traduccional se calculó el promedio de varios ensayos. De igual forma, se analizaron los resultados mediante una prueba de múltiples

comparaciones, con el control, donde se comprobó que la estimulación traduccional con los ARNv era significativa respecto a la síntesis de proteínas con el ARNm endógeno de placenta o control del ensayo (Figura 27).

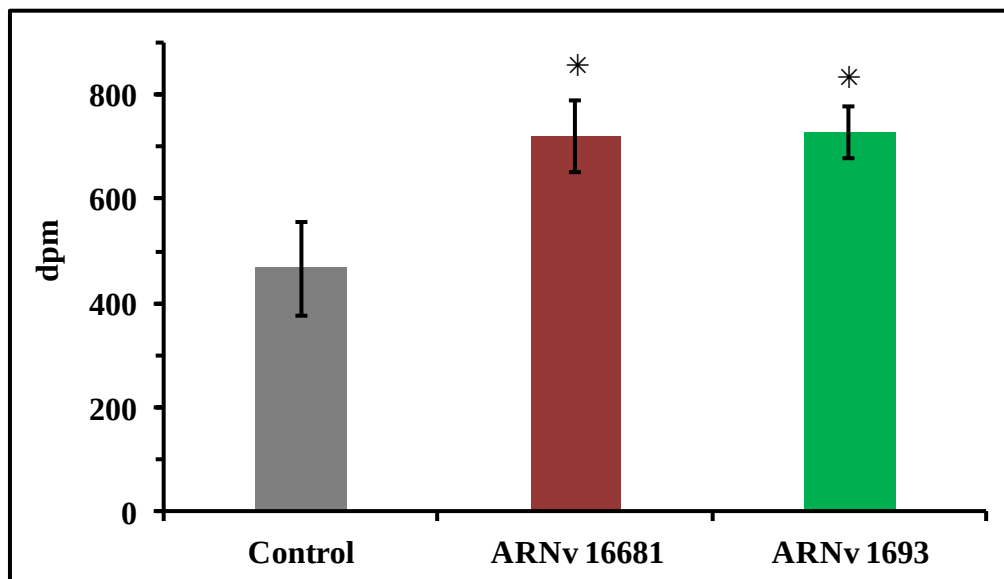


Figura 27. Máxima actividad traduccional del S-30 de placenta con los ARNv. Los ensayos se realizaron como se especifica en la Metodología (3.7.) y utilizando la concentración de ARNv donde se observó máxima actividad (Figura 26) de 31 $\mu\text{g/mL}$ del ARNv DENV-2 (16681) y 40 $\mu\text{g/mL}$ del ARNv DENV-2 (1693). Se muestra el promedio y la desviación estándar de cuatro ensayos independientes. Prueba de múltiples comparaciones con el control de Dunnett: *Significativamente superior al control ($P < 0,001$).

Una vez establecidas y analizadas las concentraciones óptimas de estimulación del sistema traduccional del S-30 de placenta, por parte de los ARNv exógenos de las cepas de DENV-2, se estandarizó el tiempo de reacción utilizando el ARNv de la cepa de referencia de DENV-2 (16681). En la Figura 28 se muestra la cinética de la reacción de síntesis de proteínas en presencia de una concentración de ARNv (31 $\mu\text{g/mL}$) donde se observó el máximo de estimulación. La mayor incorporación de aminoácidos radiactivos ^{14}C , que indica a su vez la mayor síntesis de polipéptidos, se detectó alrededor de los 40 minutos de reacción. Después de este tiempo se observa una disminución de la radiactividad en los polipéptidos sintetizados, que podría indicar la acción de proteasas en el sistema traduccional. De igual forma, se observa como la velocidad inicial de incorporación de los aminoácidos radiactivos ^{14}C fue de 15,4 dpm por minuto.

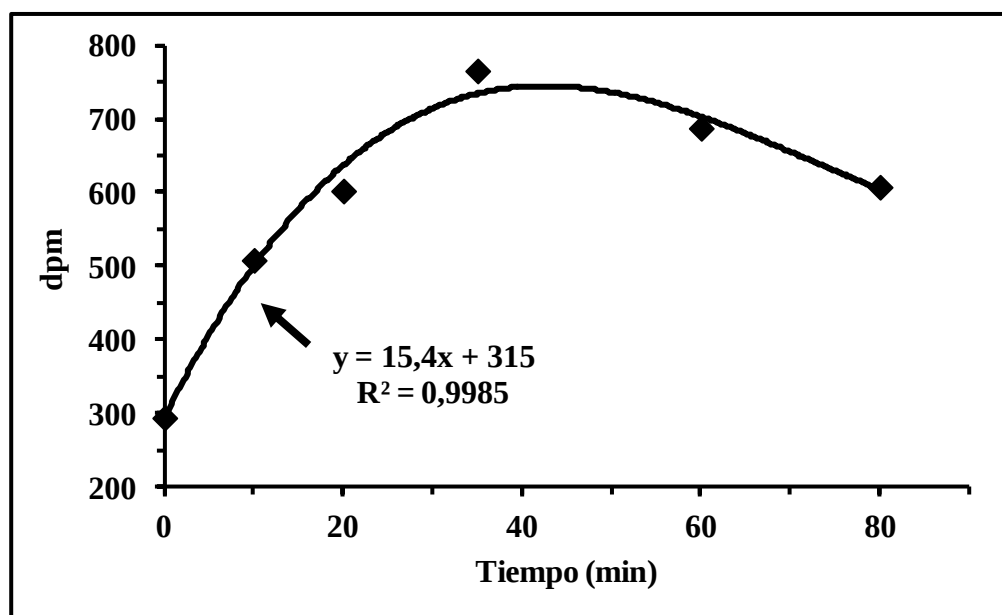


Figura 28. Cinética de la actividad traduccional del S-30 de placenta con el ARNv de la cepa de referencia de DENV-2 (16681). 31 mg/mL del ARNv fueron incubados con el sistema traduccional humano bajo condiciones de síntesis de proteínas (Metodología 3.7.). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 23 μ L de la mezcla de reacción para el conteo de la radiactividad en los polipéptidos sintetizados.

La estimulación traduccional usando sistemas *in vitro* y ARNm exógenos aumenta en muchos casos con el desdoblamiento de la estructura secundaria del ARNm previo a su unión a los ribosomas. Uno de los procedimientos para favorecer este proceso es la incubación del ARNm exógeno a una temperatura alrededor de 70°C. La Figura 29 muestra como el sistema traduccional es estimulado hasta un valor de 74% respecto al control cuando el ARNv fue tratado a 70°C previo al ensayo traduccional y la actividad aumenta en un 20 % respecto al uso del ARNv no incubado a dicha temperatura.

Este hecho dejó ver la capacidad de conservación de estructura y funcionalidad molecular del ARNv de 16681, así como la influencia de las estructuras secundarias del ARNv de DENV-2 en la eficiencia de la iniciación del proceso de traducción en el sistema mencionado.

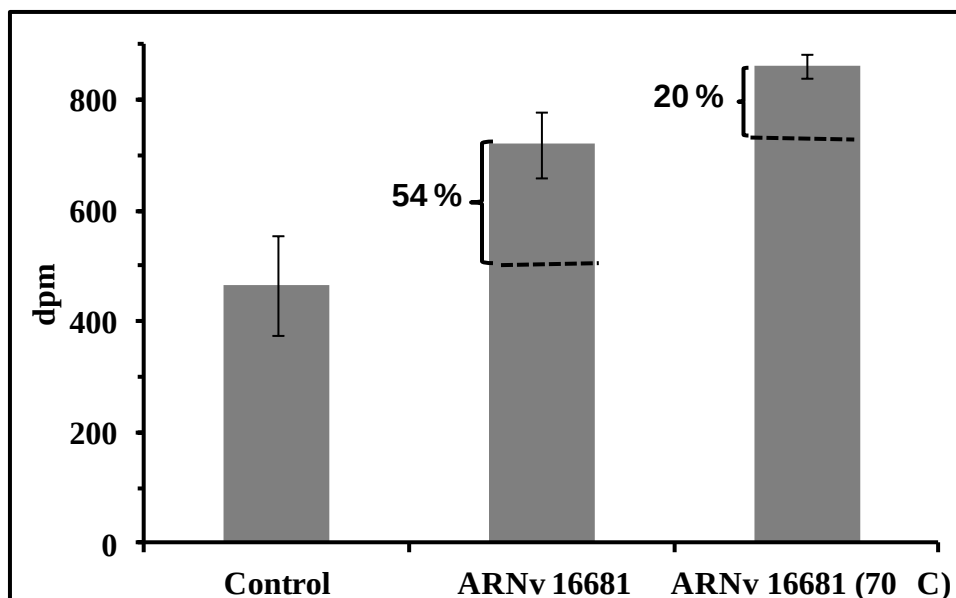


Figura 29. Actividad traduccional de la fracción S-30 dirigida por ARNv DENV-2 (16681) incubado a una temperatura de 70 °C. El ARNv (31 µg /mL) previamente incubado, o no, a 70 °C por 3 min fue agregado al sistema traduccional bajo condiciones de síntesis de proteínas. Se muestra el promedio de cuatro ensayos con la desviación estándar y el porcentaje de aumento de estimulación traduccional por la incubación del ARNv.

También se analizó la capacidad traduccional del sistema de placenta en presencia de otras cepas virales [DENV-1 (Hawaii), DENV-3 (H-87), DENV-4 (H-241)] y la cepa autóctona de DENV-2 (19094). En la Figura 30 se representa la incorporación de aminoácidos en los polipéptidos sintetizados por el sistema de placenta en presencia de diferentes cantidades de los ARNv de las cepas mencionadas. La máxima estimulación con DENV-1 (Figura 30.A.) fue alrededor de 45 % respecto al control con una concentración aproximada de 55 µg/mL. El ARN de la cepa autóctona de DENV-2 (Figura 30.B.) estimuló la traducción de manera similar a las demás cepas de DENV-2 (1693 y 16681) (Figura 26) con un máximo alrededor de 55% en relación al control y con una concentración de 36 µg/mL.

El comportamiento del ARNv de DENV-3 (H-87) se mostró de una forma muy particular, ya que con concentraciones más bajas que los demás ARNv (~ 15-20 µg/mL), el sistema traduccional mostró una estimulación de aproximadamente 30%, valor que se mantuvo, a pesar del incremento en las concentraciones de ARNv (Figura 30.C.). Puede

observarse, como a pesar de utilizar hasta ocho veces más del valor inicial, el ARNv de DENV-3 no es capaz de estimular el sistema más allá del valor porcentual referido, pero tampoco se detecta inhibición de la estimulación hasta la máxima concentración ensayada (150 $\mu\text{g/mL}$), a diferencia de los demás ARNv. En el caso de DENV-4, se observó como el ARNv correspondiente a este serotipo, produjo una estimulación de la traducción alrededor del 60% respecto al control con un valor cercano a 38 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 30.D.).

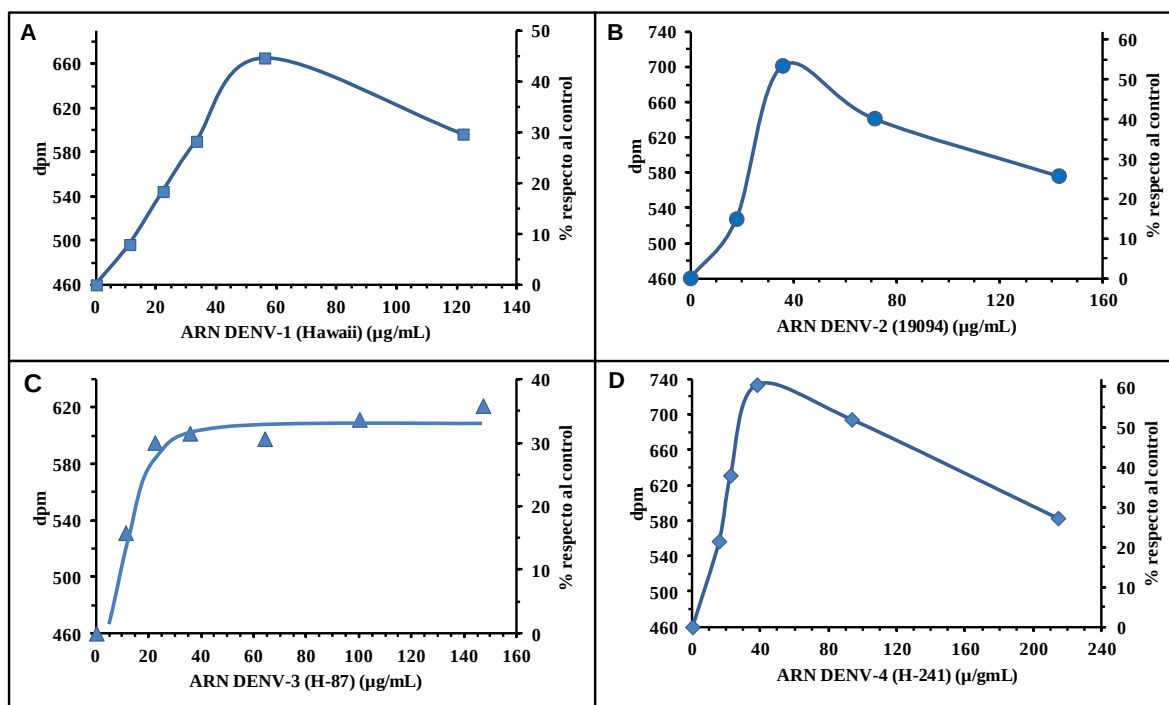


Figura 30. Actividad del sistema traduccional de placenta con los ARNv obtenidos a partir de cepas de diferentes serotipos virales DENV. El S-30 de placenta fue incubado bajo condiciones de síntesis de proteínas (Metodología 3.7.) con diferentes cantidades del ARNv de las diferentes cepas. **A)** ARNv de DENV-1 (cepa Hawaii), **B)** ARNv de DENV-2 (cepa 19094), **C)** ARNv de DENV-3 (cepa H-87), **D)** ARNv de DENV-4 (cepa H-241). Se indican las dpm de los ^{14}C aminoácidos incorporados en los polipéptidos sintetizados y el porcentaje de actividad frente al ARNm endógeno de placenta (control).

También se comprobó que la actividad traduccional del sistema S-30 de placenta con los diferentes ARNv fue significativamente superior respecto al control ($P < 0,001$) (Figura 31). Por otra parte, el promedio de la incorporación de ^{14}C aminoácidos en los polipéptidos traducidos por los ARNv de DENV-1 y DENV-4 con porcentajes sobre el

control de 44 y 61 % respectivamente, y DENV-2 con porcentajes de 53- 54 % no fueron significativamente diferentes entre sí ($P>0,05$). Sin embargo, la estimulación traduccional con DENV-3 fue significativamente inferior ($P<0,001$) a la detectada con los ARNv de DENV 2 y DENV-4, pero no fue diferente a la máxima estimulación observada con DENV-1. Esto puede indicar algunas diferencias en cuanto a la capacidad traduccional o incorporación de los ARNv a los ribosomas entre las diferentes cepas, aparentemente el de menor capacidad es el ARN de DENV-3 y el ARN de DENV-1 tiene una capacidad intermedia entre los ARN de DENV-2 y DENV-4 y el ARN de DENV-3. Sería interesante observar las diferencias de secuencia en la región 5' terminal no traducible de los diferentes ARN ya que podrían estar involucradas en las diferencias observadas.

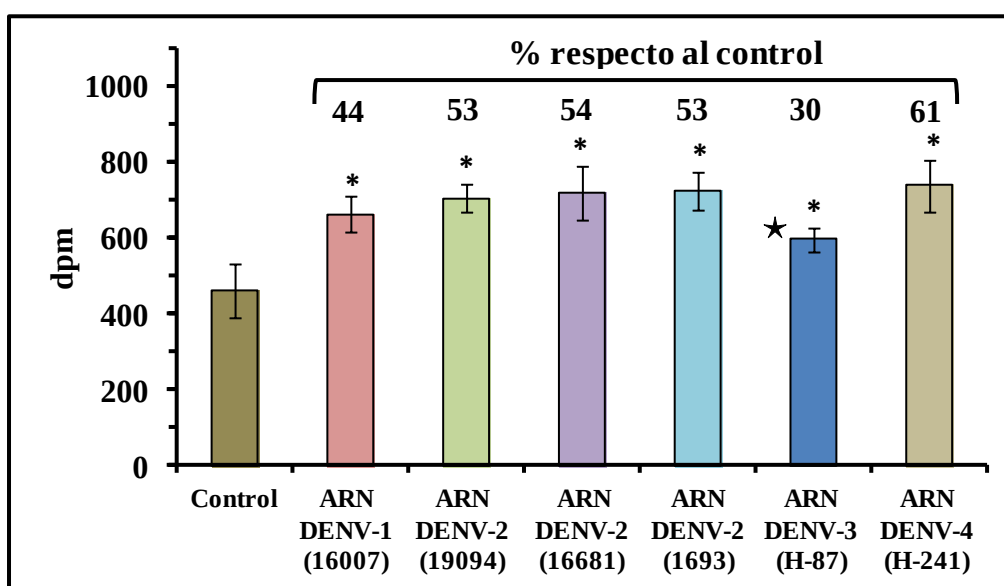


Figura 31. Máxima actividad traduccional del S-30 de placenta con los ARN de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. Los ensayos se realizaron como se especifica en la Metodología (3.7.) y utilizando la concentración de ARNv donde se observó máxima actividad. Se muestra el promedio de dpm y la desviación estándar de tres ensayos independientes, así como el % de actividad respecto al control. Prueba de múltiples comparaciones con el control de Dunnett: *Significativamente superior al control ($P<0,001$). ★Prueba de Tukey ($P<0,001$): significativamente diferente a todos menos a DENV-1.

4.5.3.- Ensayo de síntesis de proteínas en presencia de oligonucleótidos antisentido

Luego de verificar la capacidad de estimulación traduccional, por parte de los ARNv, se realizaron ensayos de inhibición de este mecanismo, haciendo uso de moléculas antisentido. El diseño de las mismas, se realizó considerando elementos estructurales clave para el proceso de síntesis de proteínas viral (*e.g.* SLA, SLB, CS1) de los ARNv.

4.5.3.1. Síntesis de proteínas con el ARNv de la cepa de DENV-2 (16681) en presencia de oligonucleótidos antisentido

Los ensayos de traducción *in vitro* del ARNv de la cepa 16681 se realizaron en presencia de oligonucleótidos antisentido, diseñados para hibridizar con diferentes secuencias de la región 5'UTR-C del genoma viral. Se consideraron los primeros 20 nucleótidos de la secuencia genómica, así como secuencias previas y posteriores a dos codones de inicio (ATG), el primero de estos codones ubicados entre los nucleótidos 97 y 99, y el segundo correspondiente a los nucleótidos 139 al 141. Específicamente, los oligonucleótidos iniciaban en las siguientes posiciones: 1, 80, 90, 95, 119, 130 y 138. En la figura 32, se muestra un esquema de la región 5'UTR-C de DENV indicando las posiciones de hibridización de los oligonucleótidos antisentido. El objetivo del diseño fue valorar la inhibición del proceso de traducción por parte de la fuente de ARN exógeno, representado en este caso por el ARNv de una cepa de DENV-2 (16681).

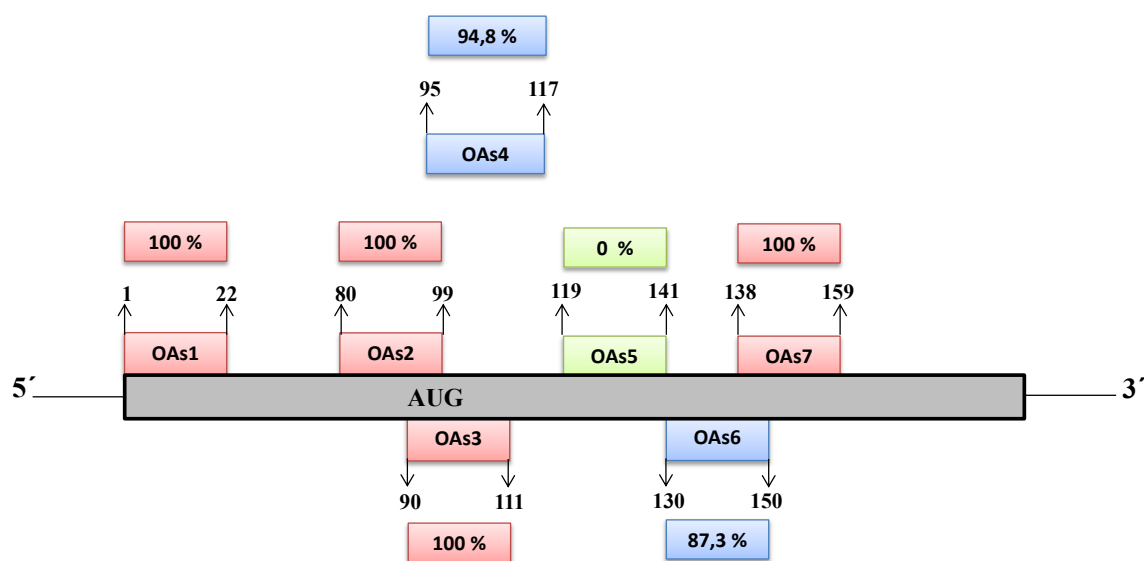


Figura 32. Esquema de hibridación esperada de cada uno de los oligonucleótidos antisentido con la secuencia nucleotídica complementaria del ARNm de DENV-2.

Los ensayos de traducción con el sistema S-30 adicionando los diferentes oligonucleótidos en ensayos repetidos e independientes, se realizaron en condiciones iónicas y energéticas óptimas. Las Figuras 33 y 34 presentan el comportamiento del ARNv DENV-2 (16681) en presencia de cada uno de los oligonucleótidos dirigidos contra diferentes secuencias de la región 5'UTR-C. Se observa claramente la estimulación de la traducción por el ARNv en comparación con el control (sin ARNv), así como el efecto inhibitorio de la mayoría de los oligonucleótidos antisentido, exceptuando al OAs5 dirigido contra una región correspondiente a parte del gen de la cápside, cuyo inicio se ubica en el nucleótido 141 y corresponde a secuencias de la cápside viral.

De igual forma, se observa un efecto no inhibitorio cuando se incubó el ARNv con una secuencia nucleotídica, correspondiente al genoma de una especie filogenéticamente no relacionada con ninguno de los serotipos de DENV, hecho que confirmó la especificidad en el diseño de las moléculas antisentido.

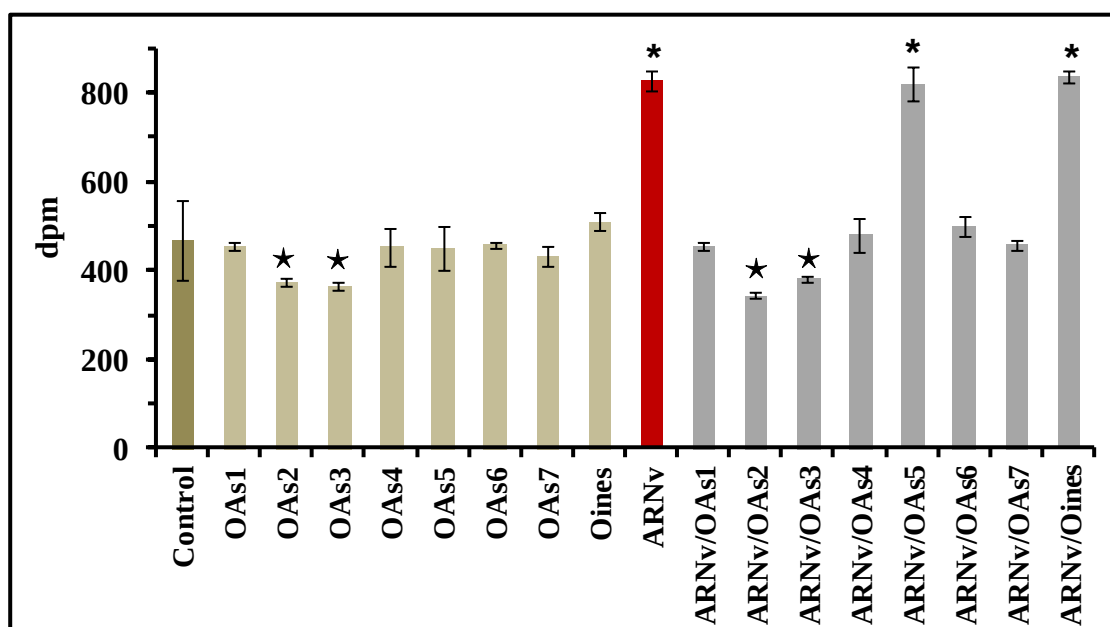


Figura 33. Actividad traduccional dirigida por ARNv DENV-2 (16681) en presencia de oligonucleótidos antisentido que hibridizan con secuencias de la región 5'UTR y de la cápside (C) del genoma viral. **Control:** ARNm endógeno de placenta. **OAs1→7 o Oines:** en presencia de los oligoantisentido sin ARNv. **ARNv:** ARN del virus sin OAs. **ARNv/OAs1→7 o Oines:** Híbridos del ARNv. Promedio de tres ensayos con la desviación estándar. Prueba de Dunnett: *P<0,0001; ★P<0,01 (significativamente superior o inferior al control, respectivamente). Oines: oligo inespecífico para el ARNv.

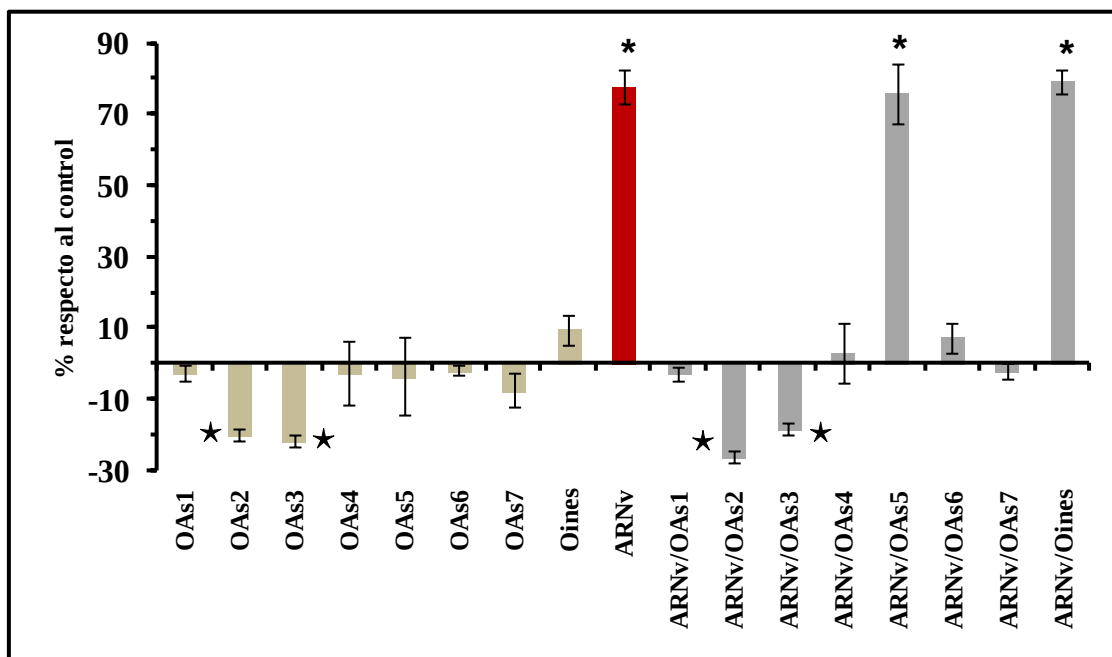


Figura 34. Actividad traduccional dirigida por ARNv DENV-2 (16681) respecto al control y en presencia de los oligonucleótidos antisentido contra secuencias del ARNv. Los valores de porcentaje respecto al control se obtuvieron de los datos indicados en la Figura 4.23. Prueba de Dunnett: * $P < 0,0001$; * $P < 0,01$ (significativamente superior o inferior al control, respectivamente).

En términos cuantitativos (Figura 35) se observó total inhibición en todos los casos, excepto cuando el ARNv fue incubado con el oligonucleótido OAs5 así como en presencia de la secuencia del oligonucleótido inespecífico, hecho que indicaba claramente como OAs5 no había sido capaz de inhibir la región contra la cual fue diseñado, demostrando de este modo incapacidad para impedir la ejecución del proceso de síntesis de proteínas dirigido por la región inicial del genoma de DENV-2.

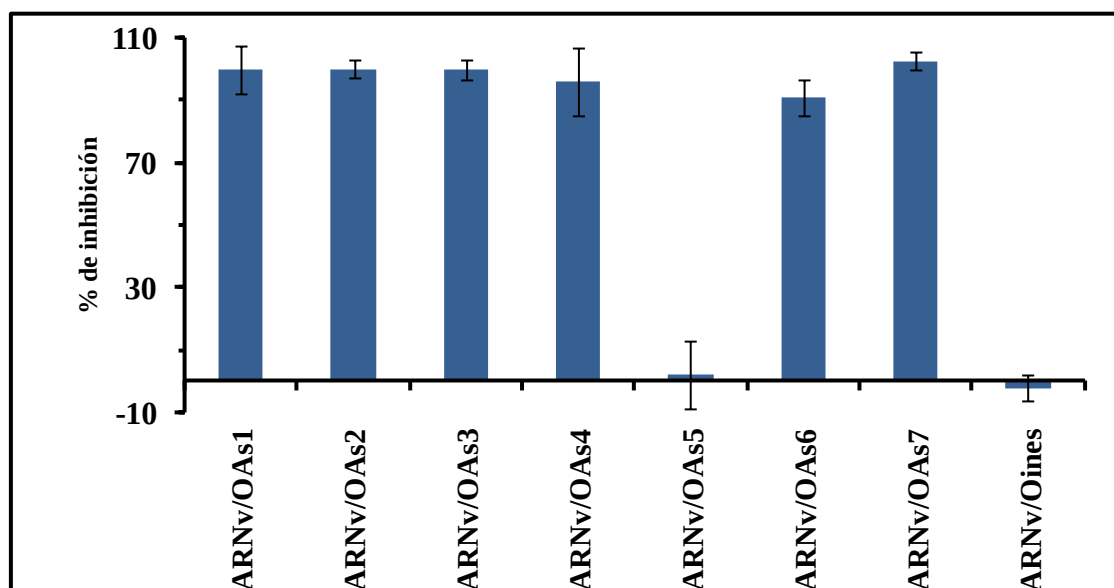


Figura 35. Efecto inhibitorio de los oligonucleótidos antisentido sobre el sistema de traducción S-30 dirigido por ARNv DENV-2 (16681). Se presenta el porcentaje de inhibición de los polipéptidos radiactivos sintetizados por los ARNv hibridizados, frente a la actividad traduccional dirigida por el ARNv sin oligonucleótidos antisentido. Promedio de tres ensayos con la desviación estándar.

4.5.3.2. Síntesis de proteínas con los ARNv de las cepas de DENV-1 (16007), DENV-2 (16681), DENV-3 (H-87) y DENV-4 (H-241) en presencia de un oligonucleótido antisentido (OAs2)

Los resultados obtenidos en los ensayos de traducción *in vitro* del ARNv de DENV-2 (cepa 16681) en presencia de oligonucleótidos antisentido resultaron de gran importancia, debido a que abrieron un espectro de posibilidades para estudiar además de la inhibición *per se* como estrategia antiviral, el mecanismo de síntesis de proteínas dirigidos por los genomas naturales de DENV. Por ello, luego de analizar el alineamiento de la secuencia nucleotídica del fragmento de 5'UTR-C, se procedió a la ejecución de ensayos de síntesis de proteínas con los ARNv de las cepas de DENV-1, DENV-3 y DENV-4 junto al OAs2. Esta molécula aunque no se había diseñado originalmente para hibridizar con secuencias de otros serotipos virales que no fueran DENV-2, el análisis bioinformático de la secuencia nucleotídica ofreció evidencias de una elevada identidad de las secuencias entre los serotipos. Por esta razón, se valoró la posibilidad de inhibición de la síntesis de

proteínas *in vitro* haciendo uso de la mencionada molécula. Los resultados evidenciaron la estimulación del sistema por los diferentes ARNv, tal como se describió previamente y un valor de inhibición de la reacción que se ubicó en valores de 47, 38 y 100%, para los ARNv de DENV-1, DENV-3 y DENV-4 respecto al control con ARNv sin OAs2; respectivamente (Figura 36).

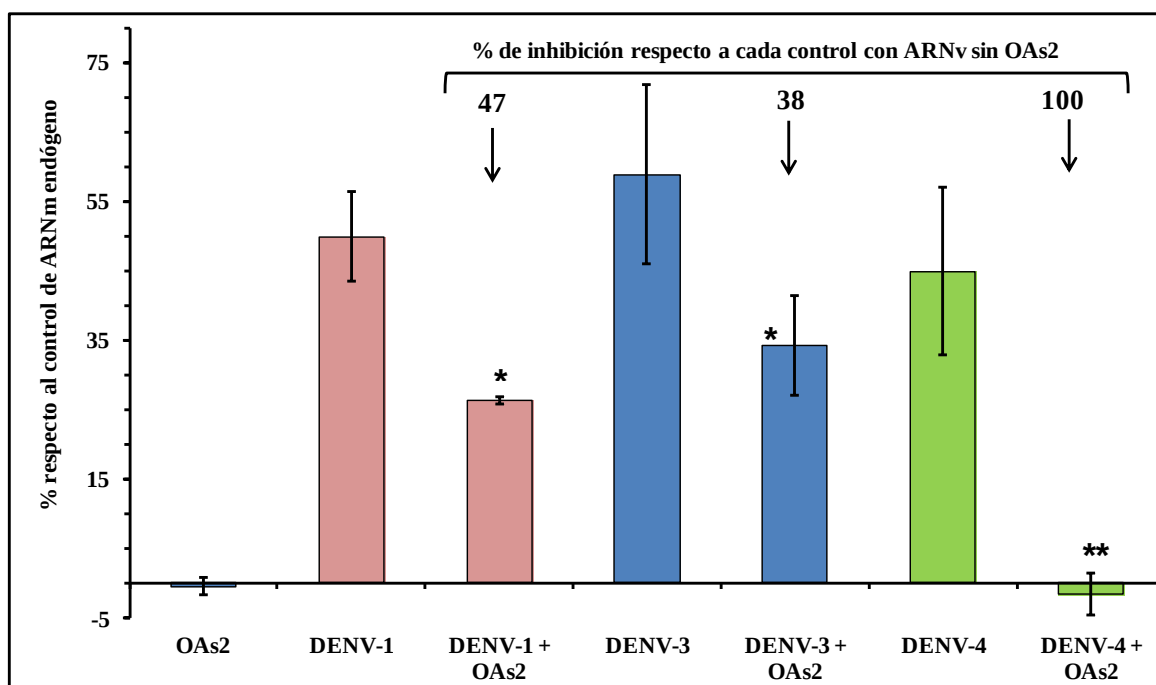


Figura 36. Efecto inhibitorio de los oligonucleótidos antisentido sobre el sistema de traducción S-30 dirigido por ARNv de los serotipos DENV-1 (16007), DENV-3 (H87) y DENV-4 (H241). Se presenta el porcentaje de inhibición de los polipéptidos radiactivos sintetizados por los ARNv hibridados con el OAs2, frente a la actividad traduccional dirigida por los ARNv sin el oligonucleótido antisentido. Promedio de tres ensayos con la desviación estándar.

4.6.- Clonamiento de la región inicial del genoma de cepas de DENV-2 en el plásmido pGEM®-T Easy

Con el fin de lograr la inserción del fragmento 5'UTR-C de cepas de DENV-2 en el plásmido comercial pGEM®-T Easy, se realizó un tratamiento enzimático previo sobre ambas moléculas (5'UTR-C y pGEM®-T Easy), el mismo consistió en la digestión de parte de su secuencia haciendo uso de las enzimas (*ApaI* y *EcoRI*) con el fin de generar

extremos cohesivos complementarios entre las secuencias nucleotídicas terminales de ambas moléculas. El tratamiento con la enzima *ApaI* favorecería el corte de una región en la secuencia nucleotídica cercana a la región promotora para la enzima T7 ARN polimerasa, como se observa en el esquema mostrado en la Figura 37. La proximidad a la región promotora fue conveniente para lograr al final del proceso, un transcrito con pocos nucleótidos adicionales a la secuencia amplificada de 5'UTR-C de DENV-2.

4.6.1.- Acondicionamiento de los productos de RT-PCR (5'UTR-C) de DENV-2

Los fragmentos 5'UTR-C de las cepas 16681, *2124IQT*, 28105 y 29681 de DENV-2 obtenidos mediante la RT-PCR fueron acondicionados con el fin de clonarlos en el vector pGEM®-T Easy. Tal como se explicó previamente (4.6.), el acondicionamiento consistió en la digestión enzimática con las enzimas *ApaI* y *EcoRI*, el tratamiento no afectó la integridad de los fragmentos amplificados de 320 pb, como se observa en el gel de agarosa al 2% (Figura 38). Por otra parte, el procedimiento empleado permitió obtener un rendimiento, cuya cantidad [**16681** (1,9 µg), **2124IQT** (2,3 µg), **28105** (1,4 µg), **29681** (2,4 µg)] fue suficiente para su posterior clonamiento en el vector pGEM®-T Easy (©Promega).

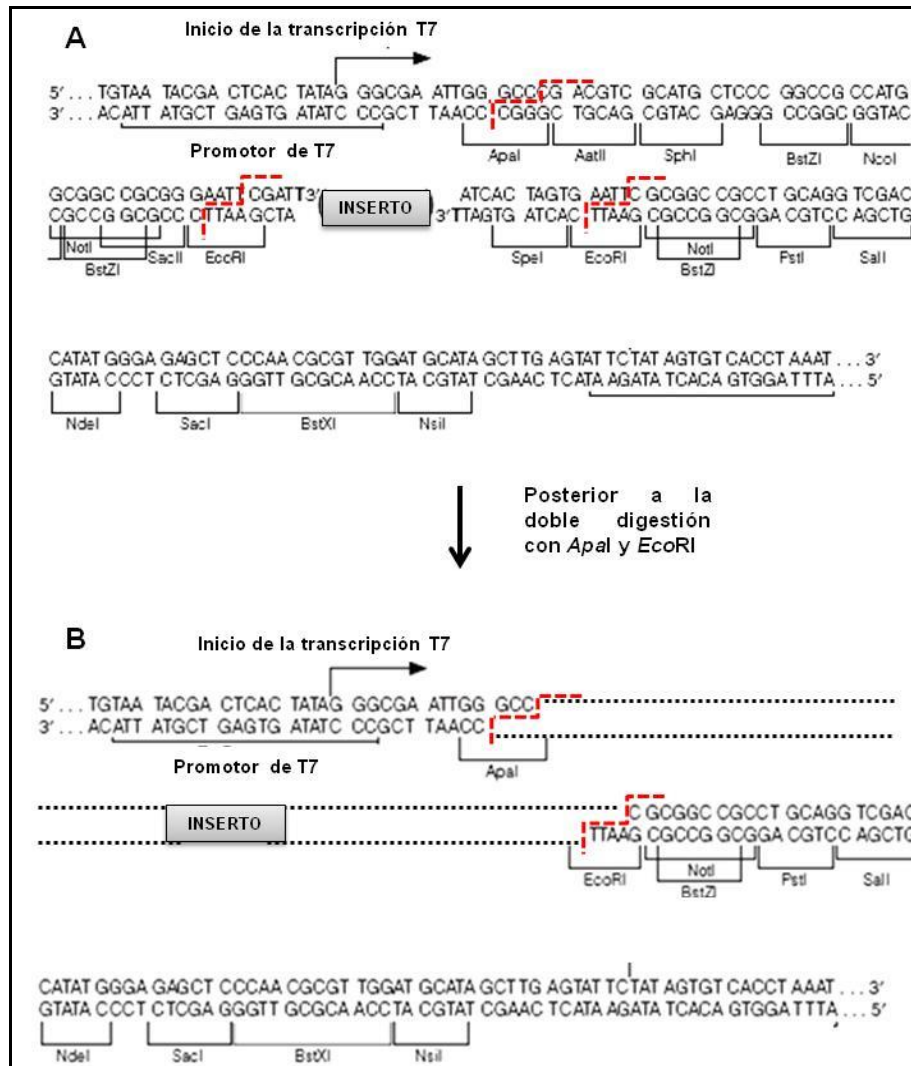


Figura 37. Esquema correspondiente a la región del promotor de T7 ARN polimerasa, sitio de clonaje múltiple y dianas de restricción enzimática en el plásmido pGEM®-T Easy. **A:** Se muestran los sitios de restricción de *ApaI* y *EcoRI* antes del proceso de doble digestión, **B:** Se observa el sitio de clonaje múltiple con los extremos cohesivos del plásmido y donde se espera la recombinación del inserto.

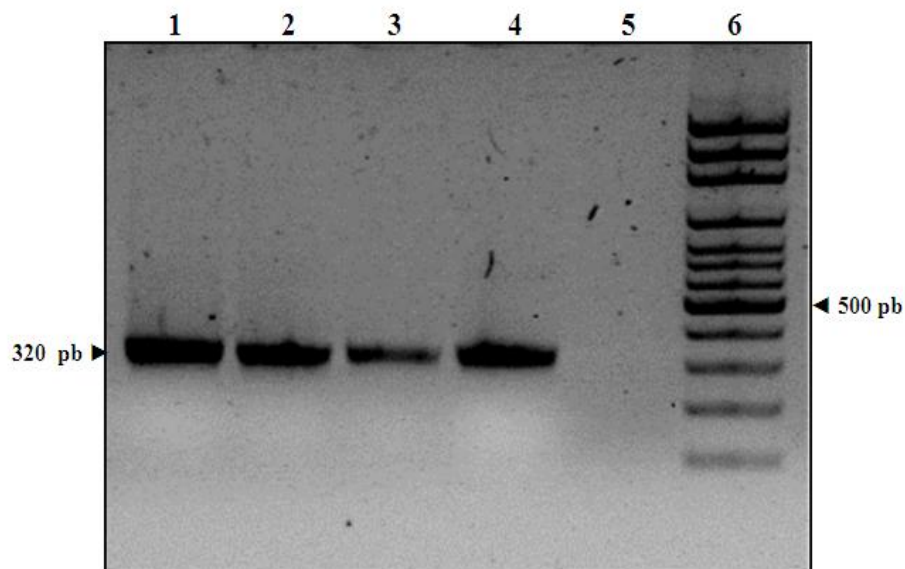


Figura 38. Electroforesis en gel de Agarosa al 2 % de los productos de ADN correspondientes a los fragmentos 5'UTR-C de las cepas de DENV-2. **1:** 16681, **2:** 2124-QT, **3:** 28105, **4:** 29681. **6:** Marcador (100 pb DNA *step ladder*, Axygen).

4.6.2.- Preparación del vector de clonamiento (plásmido pGEM®-T Easy)

En relación a pGEM®-T Easy, se realizó un tratamiento enzimático que consistió en la digestión de parte de su secuencia haciendo uso de las mismas enzimas (*ApaI* y *EcoRI*) con el fin de generar extremos cohesivos complementarios a las regiones de los extremos de 5'UTR-C. El tratamiento con la enzima *ApaI* favorecería el corte de una región en la secuencia nucleotídica cercana a la región promotora para la enzima T7 ARN polimerasa, mientras que el tratamiento enzimático con *EcoRI* generó extremos cohesivos que favorecieron la inserción del fragmento a clonar correspondiente a la región de iniciación del genoma de DENV-2 (5'UTR-C) previamente mencionada. La digestión con ambas enzimas dio lugar a un plásmido lineal con extremos cohesivos, y el rendimiento del tratamiento permitió obtener una cantidad (1,66 µg) suficiente para la reacción de recombinación inserto-vector (Figura 39)

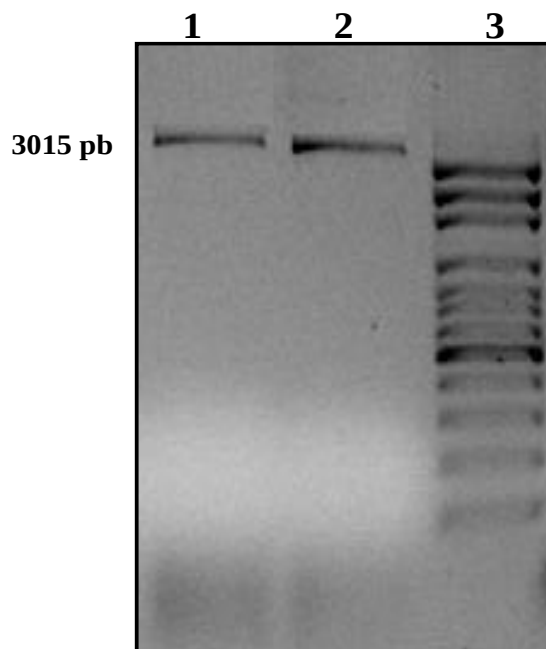


Figura 39. Electroforesis en gel de Agarosa al 0,8 % del plásmido pGEM®-T Easy (©Promega) lineal después del tratamiento con las enzimas *Apa*I y *Eco*RI. Marcador (1 kb DNA step ladder, Axygen).

4.6.3.- Construcción del plásmido recombinante luego de la ligación del producto de RT-PCR purificado y el plásmido pGEM®-T Easy y transformación de células *Escherichia coli* XL1-Blue competentes

La reacción de ligación de los fragmentos amplificados de los genomas de las cepas de DENV-2 (16681, 2124IQT, 28105 y 29681) y el plásmido pGEM®-T Easy fue realizada con la enzima T4 DNA Ligasa mediante relaciones molares inserto-vector (5/1 y 3/1), de acuerdo a lo descrito en la metodología (3.3.4.). En la placa, donde se inocularon células bacterianas sin transformar, no se observó crecimiento bacteriano, lo que evidenció que el procedimiento de transformación fue realizado en condiciones de esterilidad. Las placas contentivas de las células competentes y con reacción de ligación inserto-vector en las diferentes relaciones molares, mostraron crecimiento de entre 10-15 colonias por placa. De estas colonias, solamente fueron consideradas para identificación de recombinación, aquellas que presentaron como característica distintiva una coloración blanca.

4.6.4.- Identificación de los clones recombinantes

Las colonias seleccionadas fueron sometidas a reacción de amplificación del fragmento 5'UTR-C de las cepas de DENV-2 (16681, 2124IQT, 28105 y 29681), a partir del ADN recombinante contenido en las mismas. Las mezclas de reacción de PCR de colonias fueron validadas mediante la amplificación de los controles DH5α pTZ 3.2-320 pb (15.08.08) M2.3 y DH5α pTZ 3.2-320 pb (15.08.08), consistentes en plásmidos recombinados con fragmentos 5'UTR-C (297 pb) de la cepa 16681 de DENV-2. Los resultados de las PCR de colonias mostraron la presencia en los geles de agarosa al 2% en todas las relaciones inserto-vector ensayadas (5/1 y 3/1), una banda nítida y clara correspondiente con un tamaño molecular de 320 pb, evidencia que confirma la recombinación del inserto (5'UTR-C)-vector (pGEM®-T Easy), tal como se observa en la Figura 40, donde se muestran las mencionadas bandas, tomando como ejemplo a la cepa 16681.

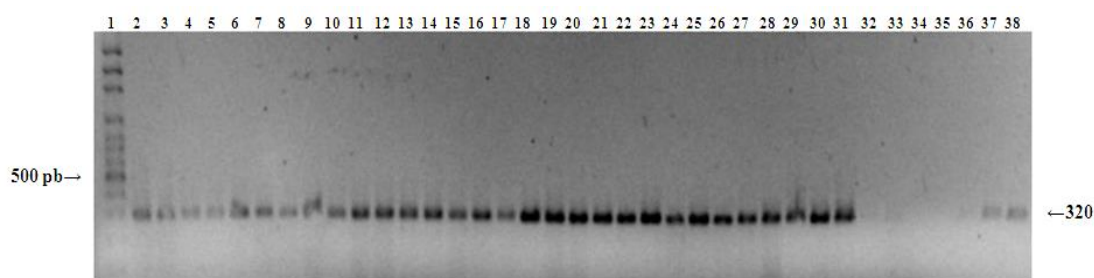


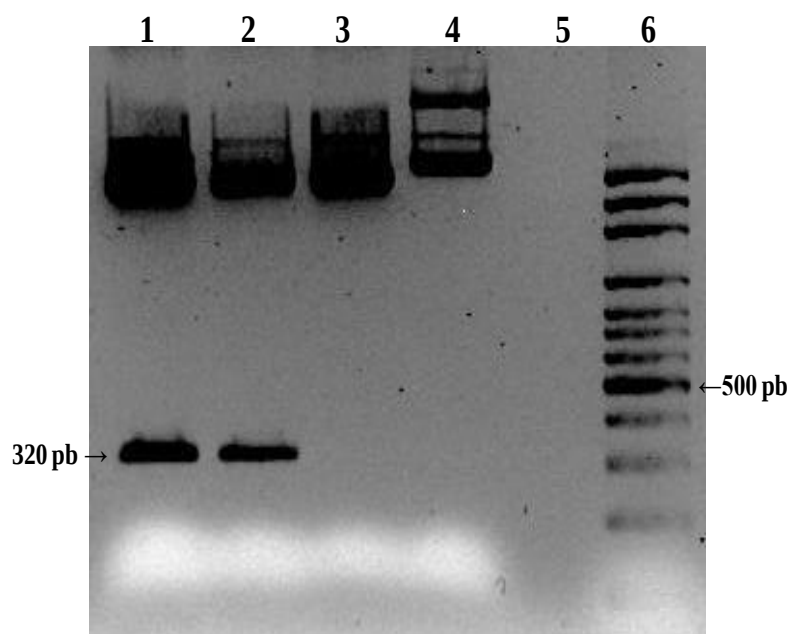
Figura 40. Electroforesis en el gel de Agarosa al 2 % de los productos de la PCR de colonias producto de la transformación de las células *E. coli* XL1 Blue con la mezcla de ligación el vector pGEM®-T Easy y 5'UTR-C de la cepa 16681 DENV-2. **1:** 100 pb DNA step ladder (Axygen), **2-16:** Colonias recombinantes en un relación molar 3/1 **17-31:** Colonias recombinantes en un relación molar 5/1, **32-36:** Colonias negativas, **37-38:** Control positivo: DH5α pTZ 3.2-320 pb (15.08.08) M2.1.

La recombinación del inserto también fue verificada mediante las técnicas de liberación del fragmento 5'UTR-C y de PCR sobre plásmidos extraídos. El primero de ellos se realizó mediante la digestión enzimática con las enzimas *ApaI* y *EcoRI* de los ADN plasmídicos extraídos a partir de las colonias que resultaron positivas al ensayo de PCR de colonias. Esta doble digestión permitió la liberación de inserto, hecho evidenciado por la presencia de dos bandas, una representativa del plásmido pGEM®-T Easy (3015 pb) y otra correspondiente a los fragmentos de 5'UTR-C de los diferentes genomas de DENV-2- En la Figura 41 (Canales 1 y 2), se observa el patrón de bandas para las cepas 16681 y

2124IQT. Los ADN plasmídicos que fueron tratados con una enzima, bien fuese *ApaI* o *EcoRI* se observan lineales, como una banda única de 3335 pb (Figura 41, canal 3), una migración distinta se observa para la molécula plásmido-inserto sin tratamiento, el cual se presenta en una configuración circular (Figura 41, canal 4).

El segundo análisis se realizó sometiendo los plásmidos extraídos a amplificación mediante PCR con los cebadores empleados para obtener el fragmento 5'UTR-C. En relación a este ensayo, se observaron bandas de 320 pb, que correspondían con los productos esperados (Figura 42). De acuerdo a estos resultados de liberación de fragmento de 5'UTR-C y de PCR sobre los plásmidos-inserto extraídos, se demostró el proceso de clonación de los fragmentos 5'UTR-C de DENV-2 en el plásmido escogido para tal fin.

Adicionalmente, y con el fin de comprobar la identificación de los DENV-2, los productos de 320 pb amplificados mediante la PCR de colonias fueron nuevamente sometidos a digestión enzimática con la enzima *Pst I*, los resultados obtenidos fueron concordantes con la segregación previamente observada para los 5'UTR-C de los DENV-2 insertados. Los plásmidos identificados fueron producidos a gran escala con el fin de contar con material suficiente para los subsiguientes ensayos de transcripción. En la Figura 43, se observan los patrones de migración electroforética de los ADN obtenidos, específicamente se evidencian tres bandas características del ADN plasmídico con predominio de la forma



superenrollada.

Figura 41. Electroforesis en el gel de Agarosa al 1% donde se observa la liberación de inserto de dos de los fragmentos (5'UTR-C) clonados en de pGEM®-T Easy. **1-2.** pGEM®-T Easy-5'UTR-C sometido a doble digestión con las enzimas *ApaI* y *EcoRI*, **3.** pGEM®-T Easy-5'UTR-C tratado con la enzima *ApaI*. **4.** pGEM®-T Easy-5'UTR-C sin tratamiento, **6.** 100 pb *DNA step ladder* (Axygen).

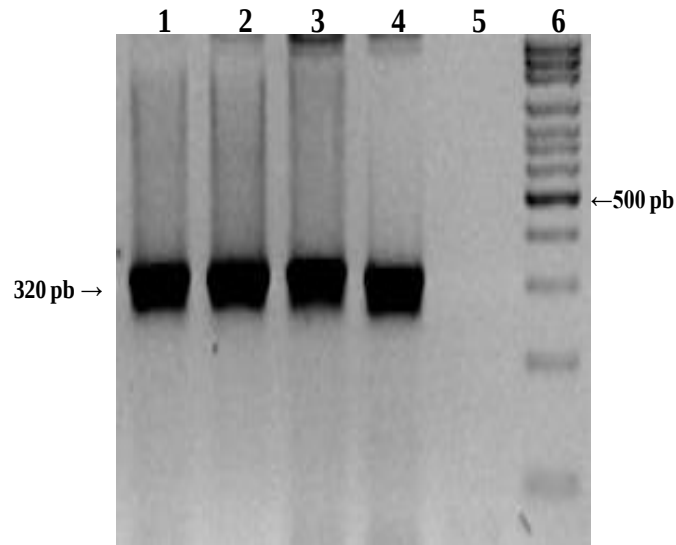


Figura 42. Electroforesis en gel de Agarosa al 2% correspondiente a la amplificación mediante PCR de los fragmentos 5'UTR-C de DENV-2 obtenidos a partir de los ADNp (pGEM®-T Easy-5'UTR-C). **1.** 16681, **2.** 2124*IQT*, **3.** 28105, **4.** 29681. **6.** Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen).

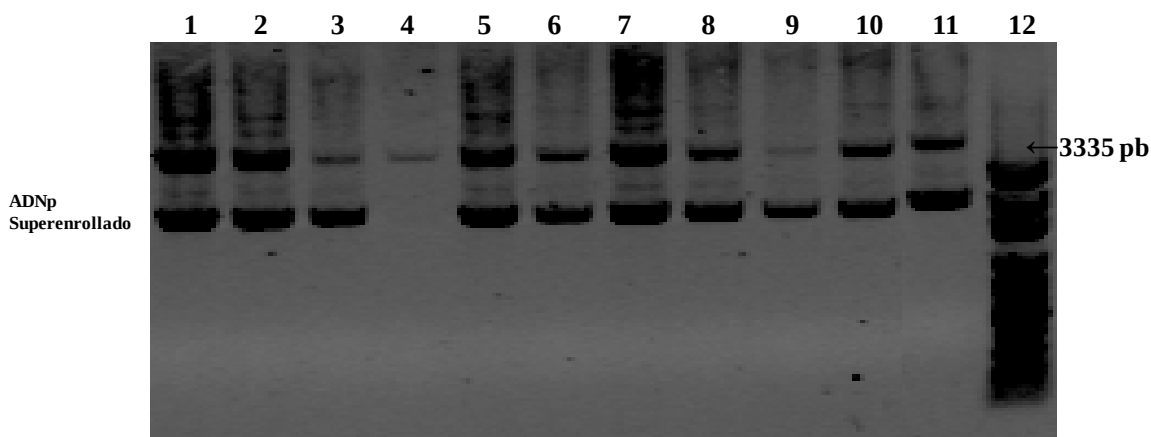


Figura 43. Electroforesis en el gel de Agarosa al 1% donde se observan los productos de extracción de ADNp de los clones recombinantes conformados por la región 5'UTR-C de DENV-2 y pGEM®-T Easy cuyo tamaño corresponde a 3335 pb **1.** 16681, **2.** 2124IQT, **3.** 28105, **4.** 29681. **5.** Marcador (1kb DNA *step ladder*, Axygen).

4.7.- Ensayos de transcripción *in vitro*

4.7.1.- Transcripción *in vitro* a partir de los plásmidos recombinantes pGEM®-T Easy-5'UTR-C DENV-2 linealizados

Verificado el clonamiento del fragmento 5'UTR-C de DENV-2, se procedió a la estandarización de la técnica de transcripción *in vitro*, cuyo objetivo fundamental es la síntesis de un fragmento de ARNm de 320 nt correspondiente a la región genómica clonada. Inicialmente, los plásmidos clonados fueron digeridos con la enzima *EcoRI* para lograr su linearización, tal como se observa en el Figura 44, donde se puede apreciar el perfil electroforético de los plásmidos de acuerdo al patrón esperado (tamaño de banda: 3335 pb), de igual forma se evidencia el control de plásmido con las diferentes conformaciones. Los plásmidos lineales fueron purificados mediante la extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, lo que permitió la obtención de ADNp en un rango entre 24,1 y 40,95 µg totales con una relación A_{260}/A_{280} igual a 1,8.

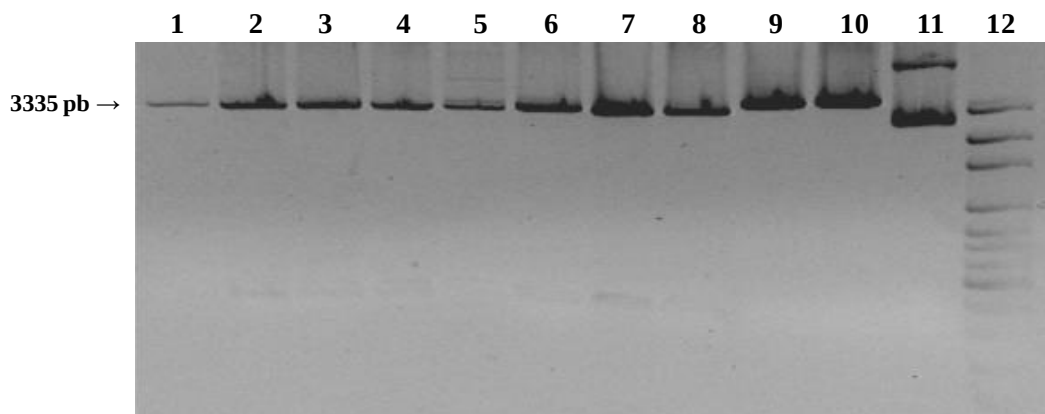


Figura 44. Electroforesis en el gel de Agarosa al 1% donde se observan los ADNp linearizados (pGEM®-T Easy-5'UTR-C DENV-2) luego de la digestión con la enzima *EcoRI*. **1-3:** ADNp (16681), **4-6.** ADNp (2124IQT) ,**7-8.** ADNp (28105), **9-10.** ADNp (29681),**11.** ADNp sin digerir con *EcoRI* (29681), **12:** Marcador tamaño molecular (1 Kb DNA step ladder, Axygen).

Previo a la realización de los ensayos de transcripción *in vitro*, se evaluó la calidad de los nucleótidos y de la enzima pirofosfatasa como componentes esenciales de la reacción de transcripción, para con ello garantizar que no fueran limitantes en dicha reacción.

-Nucleótidos trifosfato: se midió el grado de hidrólisis de cada uno de los nucleótidos trifosfato (ATP, CTP, GTP y UTP), mediante el método colorimétrico de González-Romo *et al.* (1992), con el fin de cuantificar el fosfato inorgánico libre en las soluciones de nucleótidos, lo que sería indicativo del grado de hidrólisis de los mismos y en consecuencia de su integridad en la reacción de transcripción. Para ello, a cada solución de nucleótidos se le determinó el fosfato libre mediante el método colorimétrico mencionado, tal como se especifica en la metodología (3.5.1.). Los resultados indicaron que la hidrólisis fue de 4,4%, 12,8%, 16,2% y 7,9% para los nucleótidos ATP, GTP, CTP y UTP; respectivamente. Con base a estos valores, fue necesario ajustar la concentración de nucleótidos en las reacciones, determinándose que una concentración de 3,75 mM para cada nucleótido corregía la deficiencia por hidrólisis y correspondía a la concentración óptima ya descrita según el trabajo previo de Pérez *et al.* (2015).

-Enzima pirofosfatasa: la actividad de la enzima se midió bajo las mismas condiciones iónicas empleadas en los ensayos de transcripción *in vitro* descritas por Pérez *et al.*, (2015) haciendo uso de pirofosfato inorgánico (2 mM) como sustrato de la enzima y realizando la medición mediante el método colorimétrico ya descrito (González-Romo *et al.*, 1992).

Bajo las condiciones de ensayo utilizadas, la cantidad teórica estimada de fosfato a formarse en el volumen total de ensayo era de 180 nanomoles y los resultados mostraron (Figura 45.A.) que a los diez minutos de reacción, con una cantidad de enzima de 0,005 U/ μ L, se formaron 150 nanomoles de fosfato, que correspondía a la formación de 83 % del producto en relación a la cantidad total estimada. Al aumentar la cantidad de enzima 10 y 20 veces (0,05 y 0,1 U/ μ L), la catálisis de formación de fosfato fue total alrededor del minuto de reacción, es decir, que la menor concentración de enzima utilizada (0,005 U/ μ L) también realizaba la catálisis completa a un tiempo mayor de reacción. Al mismo tiempo, se determinó que la enzima a sus diferentes concentraciones estaba saturada con el sustrato pirofosfato, al observarse una relación lineal positiva de la velocidad inicial de reacción frente a las diversas concentraciones de enzima (Figura 45.B). Por lo tanto, se comprobó que la pirofosfatasa se encontraba activa para los ensayos de transcripción.

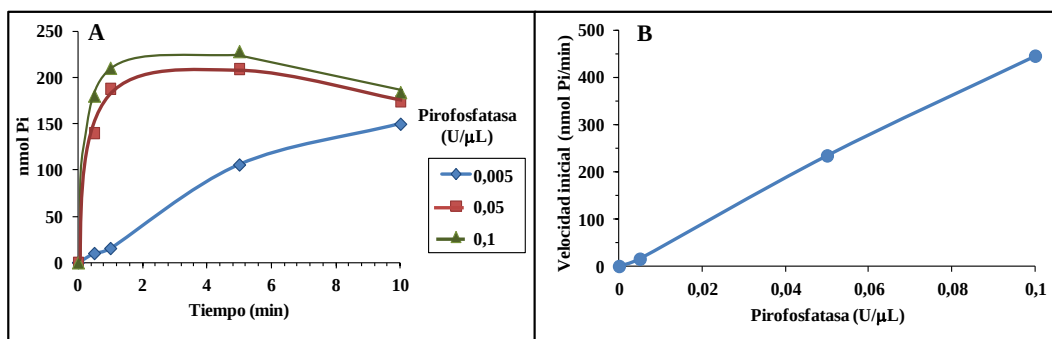


Figura 45. Actividad de la enzima pirofosfatasa. A. Cinética de reacción. La incubación se realizó con diferentes concentraciones de enzima (0,005, 0,05 y 0,1 U/ μ L), bajo las condiciones iónicas del ensayo de transcripción utilizadas por Pérez *et al.* (2015). En cada caso, la cinética de reacción se siguió midiendo el fosfato liberado como se especifica en Materiales y Métodos (3.12.1). **B.** Relación de la velocidad inicial de reacción de la pirofosfatasa con la concentración de enzima. Las velocidades iniciales de reacción se

obtuvieron de las pendientes de las rectas de las gráficas de las cinéticas a los primeros minutos de reacción.

Una vez verificada la condición de los nucleótidos y la actividad de pirofosfatasa se procedió a estandarizar la reacción de transcripción, evaluando las concentraciones de T7 ARN polimerasa, plásmidos, magnesio, pirofosfatasa, la temperatura y el tiempo de reacción.

-T7 ARN polimerasa: la actividad de la T7 ARN polimerasa fue evaluada en ensayos de transcripción utilizando 0,03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del plásmido recombinante pGEM®-T Easy-5'UTR-C DENV-2 (28105) y un rango de concentración de la polimerasa desde 0,2 a 1 $\text{U}/\mu\text{L}$, con 3,75 mM de cada nucleótido y 0,005 $\text{U}/\mu\text{L}$ de la enzima pirofosfatasa según las estandarizaciones previas de ambos componentes. Las condiciones iónicas del ensayo fueron las usadas en el trabajo previo con el plásmido recombinante pTZ18R-deng2 (Pérez *et al.*, 2015). En la Figura 46 se observan las cinéticas de reacción con las diferentes cantidades de la enzima T7 ARN polimerasa. La mayor eficiencia de transcripción (calculada en nmoles de Pi liberado) se alcanzó con 1 $\text{U}/\mu\text{L}$ de T7 ARN polimerasa, aproximadamente a las 4 horas de reacción, pero se detectó una eficiencia similar con 0,6 $\text{U}/\mu\text{L}$ de la enzima a las 6 horas de transcripción, es decir, que una cantidad menor de enzima alcanza la misma eficiencia que una cantidad mayor, al aumentar el tiempo de reacción. Los ensayos demostraron que la T7 ARN polimerasa era activa en los ensayos de transcripción.

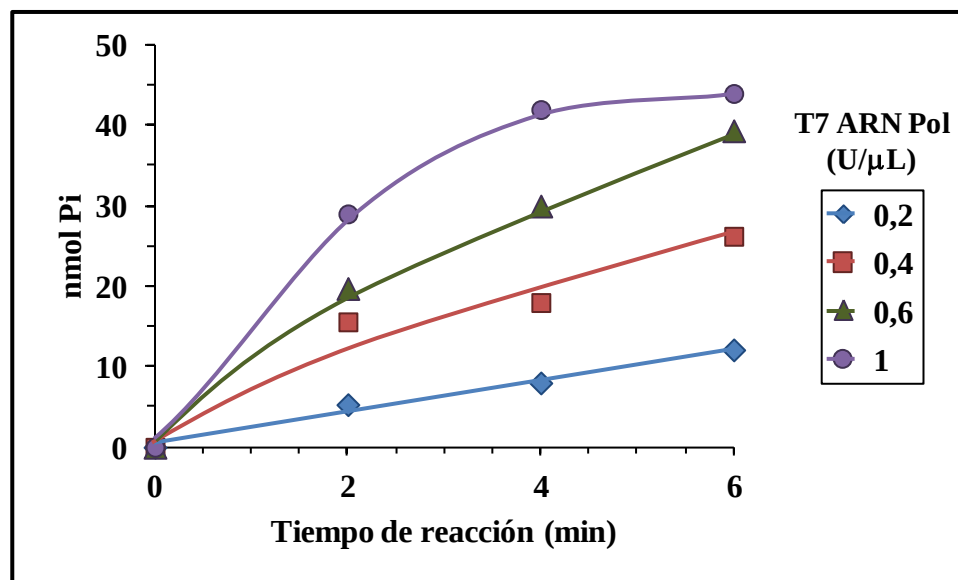


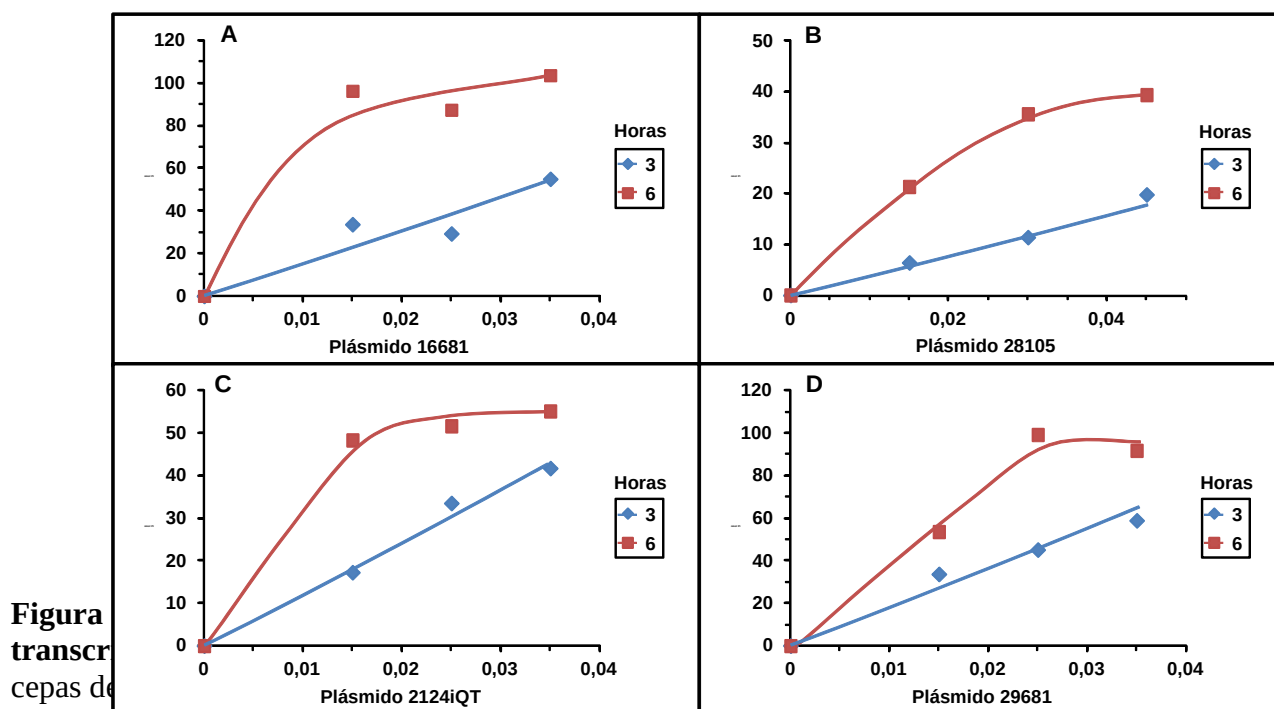
Figura 46. Actividad de T7 ARN polimerasa. Se representan las cinéticas de las reacciones de transcripción con las cantidades de T7 ARN polimerasa indicadas. Las reacciones se siguieron por la medida del fosfato liberado como se especifica en Materiales y Métodos (3.12.1). Se usaron 0,03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del plásmido recombinante pGEM®-T Easy-5'UTR-C DENV-2 (28105) y las condiciones iónicas del ensayo de transcripción previamente estandarizado por Pérez *et al.*, 2015.

-ADN plasmídico: con el fin de conocer la cantidad óptima de los ADNp (pGEM®-T Easy-5'UTR-C DENV-2) para la ejecución de los ensayos de transcripción *in vitro*, se analizaron determinadas concentraciones (0,015 hasta 0,035 ó 0,045 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de cada uno de los plásmidos en ensayos independientes. Las condiciones utilizadas fueron 3,75 mM de cada nucleótido, 0,005 U/ μL de pirofosfatasa y 0,6 U/ μL de IT7 ARN polimerasa de acuerdo a las estandarizaciones previas, el resto de las condiciones fueron las usadas por Pérez *et al.* (2015). En la Figura 47 se muestra el rendimiento –expresado en nanomoles de Pi- de la reacción de transcripción *in vitro* de diferentes concentraciones de los plásmidos clonados con las cepas de DENV-2 (16681, 28105, 2124IQT y 29681) y correspondientes a 3 y 6 horas de reacción. En todos los ensayos se observa un aumento de la cantidad de fosfato liberado en relación al tiempo de reacción (de 3 a 6 horas). Específicamente, a las 3 horas hay diferencias de actividad entre las distintas concentraciones del ADNp, observándose una relación lineal positiva entre los nanomoles de fosfato liberado y la concentración de ADNp. A las 6 horas de reacción se alcanza el máximo de actividad con todas las concentraciones ensayadas para los plásmidos

recombinantes 16681 y 2124IQT (Figura 47A y 47C). Con los plásmidos 28105 y 29681 (Figura 47B y 47D) se alcanza el máximo con las concentraciones mayores (0,025-0,035 ó 0,045 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). También se observa que el rendimiento de la reacción no es igual para cada plásmido clonado con los diferentes fragmentos 5'UTR-C de DENV-2. En las reacciones de estandarización se observa que una concentración de ADNp entre 0,025 y 0,035 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ se puede considerar como óptima en todos los casos.

-Magnesio: la concentración del ión magnesio es relevante en reacciones asociadas a la actividad enzimática de polimerasas. Por ello, se realizaron ensayos de transcripción variando la concentración de magnesio entre 6 y 25 mM y utilizando como modelo al plásmido recombinante pGEM®-T Easy-5'UTR-C DENV-2 (28105) a una concentración de 0,035 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,6 U/ μL de T7 ARN polimerasa, 0,005 U/ μL de pirofosfatasa y 3,75 mM de cada nucleótido de acuerdo a los resultados de las evaluaciones anteriores, el resto de las condiciones se mantuvieron como describe Pérez *et al.* (2015). En la Figura 48 se muestran los resultados obtenidos para 3 y 7 horas de reacción.

Se observó un aumento en la producción de fosfato a medida que aumentaba el tiempo de incubación (3 a 7 horas). También se observó un aumento de fosfato liberado en la medida que aumentaba la concentración de magnesio adicionada, alcanzándose un máximo alrededor de 15 mM (~58 nmol Pi a 3 h y ~220 nmol Pi a 7 h). El rendimiento de la reacción, a los dos tiempos, fue comparable con el que tuvo el plásmido control DH5 α pTZ 3.2-320 pb (15.08.08) (70 nmol Pi a 3 h y 290 nmol Pi a 7 h), el cual fue clonado previamente con la región 5'UTR-C de la cepa asiática de DENV-2 (16681) y que fue gentilmente donado por el laboratorio de Bioquímica de Ácidos Nucleicos y Síntesis de Proteínas (BIOMED-UC).



3,75 mM de cada nucleótido, 0,005 U/mL de pirofosfatasa y las demás condiciones de la reacción de transcripción fueron las descritas por Pérez *et al.* (2015). A las 3 y 6 horas se tomaron alícuotas de las mezclas de reacción para medir la cantidad de fosfato liberado como se indica en Materiales y Métodos (3.12.1.). Cada ensayo incluyó un blanco sin T7 ARN polimerasa.

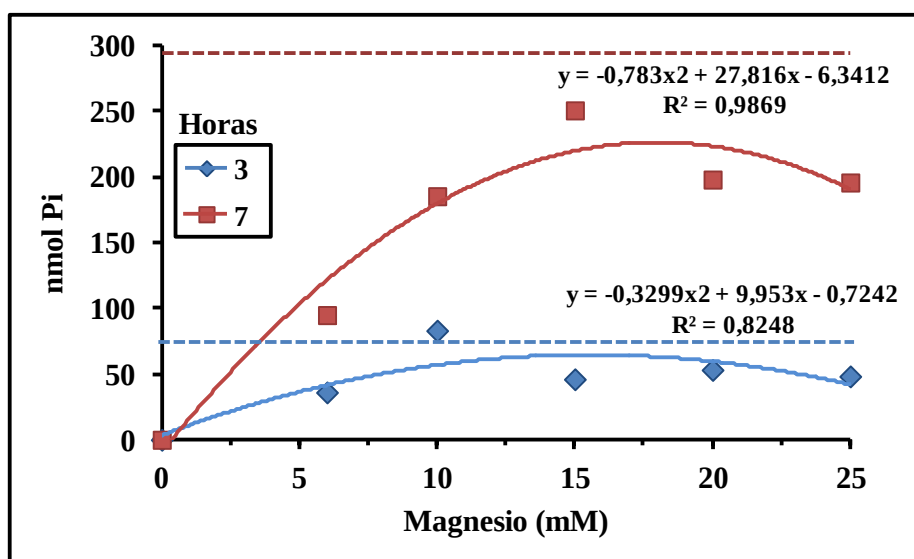


Figura 48. Estandarización de la concentración de magnesio en los ensayos de transcripción. 0,035 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ADNp pGEM®-T Easy-5'UTR-C DENV-2 (28105) fueron incubados con diferentes concentraciones del ión Mg^{+2} (6 a 25 mM), 0,6 U/ μL de T7 ARN polimerasa, 0,005 U/ μL de pirofosfatasa y 3,75 mM de cada nucleótido, el resto de las

condiciones se mantuvieron como describe Pérez *et al.* (2015). A los tiempos indicados se midió el fosfato liberado (Materiales y Métodos). Las líneas punteadas indican el valor máximo de Pi liberado a las 3 y 7 horas de reacción del plásmido control DH5α pTZ 3.2-320 pb (15.08.08) clonado con la región 5'UTR-C de la cepa asiática de DENV-2 (16681) por Pérez *et al.* (2015).

-Pirofosfatasa: con las concentraciones estandarizadas de nucleótidos (3,75 mM), plásmidos (0,025-0,045 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), T7 ARN polimerasa (0,6 $\text{U}/\mu\text{L}$) y magnesio (16 mM) se evaluó la reacción de transcripción variando la concentración de pirofosfatasa. Para ello, se utilizó el plásmido 29681 a una concentración de 0,025 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y concentraciones de la enzima en el rango de 0,001 a 0,1 $\text{U}/\mu\text{L}$. En la Figura 49 se muestran los resultados obtenidos. El máximo de actividad, representada por la liberación aproximada de 250 nmol de fosfato a las 7 horas de reacción, se alcanzó con una concentración mínima de pirofosfatasa alrededor de 0,05 $\text{U}/\mu\text{L}$.

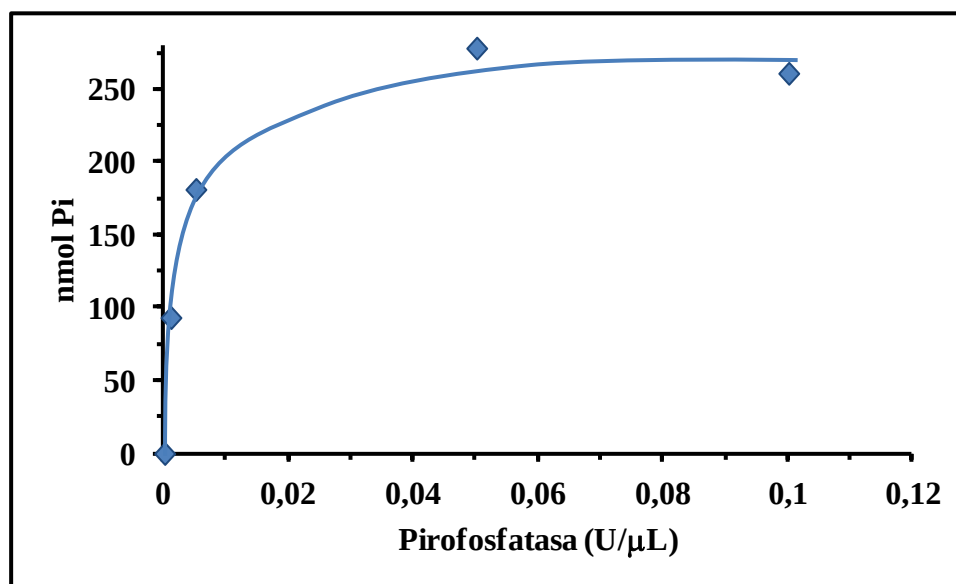


Figura 49. Estandarización de la concentración de la enzima pirofosfatasa en los ensayos de transcripción. 0,025 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ADNp pGEM®-T Easy-5'UTR-C DENV-2 (29681) fueron incubados con diferentes concentraciones de pirofosfatasa (0,001 a 0,1 $\text{U}/\mu\text{L}$), 0,6 $\text{U}/\mu\text{L}$ de T7 ARN polimerasa, 3,75 mM de cada nucleótido y 16 mM magnesio, el resto de las condiciones se mantuvieron como describe Pérez *et al.* (2015). A las siete horas de reacción se midió el fosfato liberado (Materiales y Métodos).

-Tiempo de reacción: con todas las condiciones estandarizadas anteriormente se evaluó el tiempo de reacción. En la Figura 50 se muestran los resultados obtenidos con el plásmido pGEM®-T Easy-5'UTR-C DENV-2 (28105). El máximo de actividad con 0,035 µg/µl del plásmido (alrededor de 200 nmoles de Pi liberados) se obtuvieron entre 6 y 7 horas de reacción.

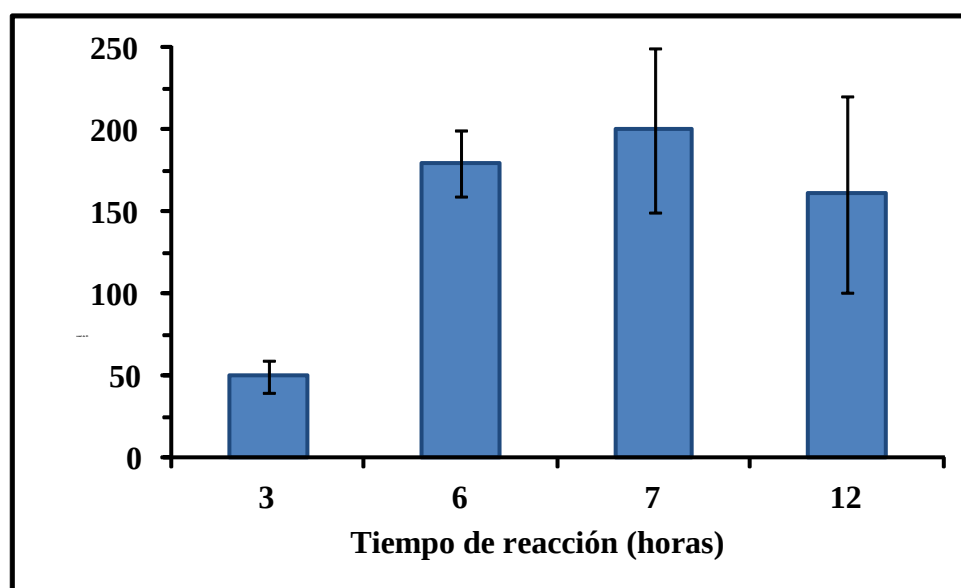


Figura 50. Estandarización del tiempo de reacción de transcripción. 0,035 µg/µL de ADNp pGEM®-T Easy-5'UTR-C DENV-2 (28105) fueron incubados bajo las condiciones estandarizadas de T7 ARN polimerasa (0,6 U/µL), nucleótidos (3,75 mM c/u), pirofosfatasa (0,05 U/µL) y magnesio (16 mM), el resto de las condiciones se mantuvieron como describe Pérez *et al.* (2015). Se tomaron alícuotas de las mezclas de reacción a las horas indicadas para medir el fosfato liberado como se especifica en la Metodología (3.9.2.). Se representa el promedio de tres ensayos con la desviación estándar.

-Temperatura: se verificó si la temperatura de la reacción de transcripción, a la cual se realizaron todas las estandarizaciones (37 °C) era la óptima. Se utilizaron 0,035 µg/µL de ADNp pGEM®-T Easy-5'UTR-C DENV-2 (28105) y la reacción se llevó a cabo bajo todas las condiciones estandarizadas a diferentes temperatura (30, 37 y 42 °C). En la

Figura 51 se muestran los resultados obtenidos. La máxima liberación de fosfato se alcanzó con 37 °C y no se observó una diferencia significativa cuando la reacción se incubó a la temperatura de 42 °C.

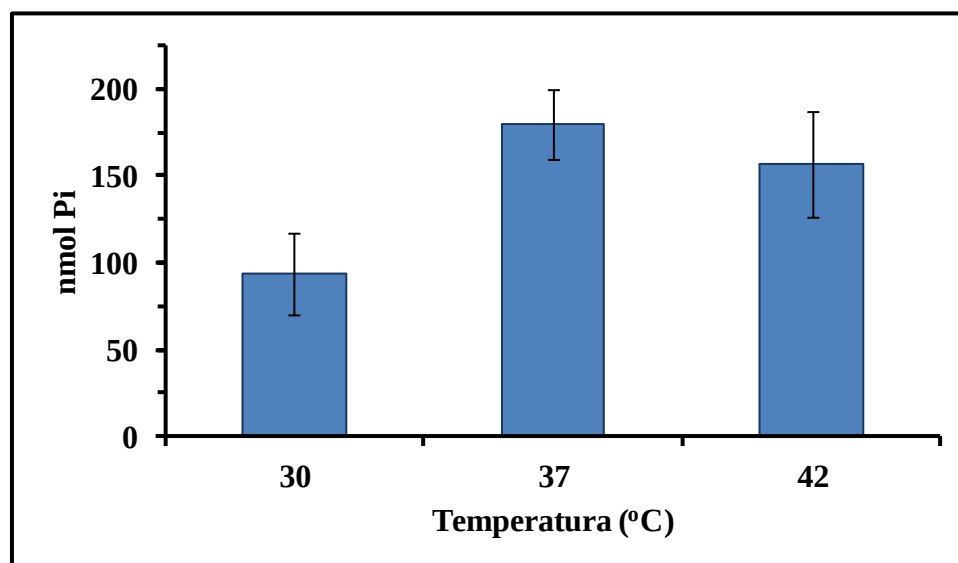


Figura 51. Estandarización de la temperatura en la reacción de transcripción. 0,035 µg/µL de ADNp pGEM®-T Easy-5'UTR-C DENV-2 (28105) fueron incubados a tres temperaturas diferentes (30, 37 y 42 °C) bajo las condiciones estandarizadas de T7 ARN polimerasa (0,6 U/µL), nucleótidos (3,75 mM c/u), pirofosfatasa (0,05 U/µL) y magnesio (16 mM), el resto de las condiciones se mantuvieron como describe Pérez *et al.* (2015). A las 6 horas de reacción se tomaron alícuotas de los ensayos para medir el fosfato liberado como se especifica en la Metodología (3.9.2.). Se representa el promedio de tres ensayos con la desviación estándar.

Utilizando las condiciones estandarizadas se comprobó la actividad de los diferentes plásmidos recombinantes en la reacción de transcripción. En la Figura 52 se muestran los resultados obtenidos con varias concentraciones de los plásmidos (0,015, 0,025 y 0,035 µg/µL). Se obtuvo una actividad similar con los distintos ADNp y la máxima liberación de fosfato se alcanzó a una concentración de los plásmidos alrededor de 0,025 µg/µL. En la Tabla 7 se muestran las condiciones finales de la reacción de transcripción con los diferentes ADNp pGEM®-T Easy-5'UTR-C de las distintas cepas de DENV-2.

Tabla 7. Condiciones óptimas para la ejecución de los ensayos de transcripción in vitro, luego de la estandarización de cada uno de los reactantes

Reactantes	Concentración final
Tris HCl pH: 8	40 mM
MgCl ₂	16 mM
Espermidina	1 mM
DTT	10 mM
NTP (ATP, GTP, UTP, CTP)	3,75 mM c/u
BSA acetilada	100 mg/mL
Inhib ARNsa	1000 U/mL
Pirofosfatasa inorgánica (PPasa)	0,05 U/μL
Plásmidos linealizados	0,025 μg/μL
T7 ARN polimerasa	0,6 U/μL
Tiempo de incubación	6 horas
Temperatura de incubación	37 °C

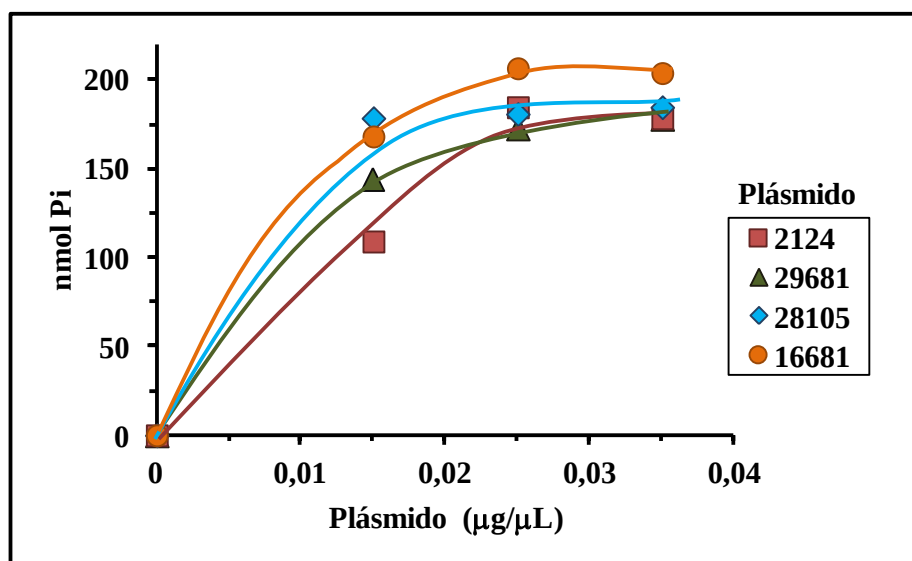


Figura 52. Actividad máxima de los ADNp. Diferentes concentraciones de los ADNp pGEM®-T Easy-5'UTR-C de las cepas de DENV-2 fueron incubados bajo las condiciones estandarizadas e indicadas en la tabla 7. A las 6 horas de reacción se tomaron alícuotas de los ensayos para medir el fosfato liberado como se especifica en la Metodología (3.12.1.).

Para observar los productos de las reacciones de transcripción *in vitro* se realizaron análisis electroforéticos en geles de poliacrilamida y agarosa de ensayos ejecutados bajo las condiciones estandarizadas. Específicamente, se muestran los resultados de la transcripción del plásmido recombinantes linealizado (29681) a diferentes concentraciones del mismo (0,015-0,025-0,035 μg/μL) a 3 y 6 horas de reacción. En la Figura 53 se observan los nanomoles de fosfato liberado y en la Figura 54.A. el análisis de los productos de transcripción en gel de poliacrilamida. En las diferentes concentraciones de plásmido analizadas, así como en los tiempos 3h y 6h se observa un patrón de doble banda difuso que corresponde a los transcritos. Al analizar la distancia de migración de la banda difusa inferior, se observó que su migración correspondió al tamaño del transcrito esperado (320 nt), sin embargo, la presencia de una banda superior a este tamaño indica la posibilidad de una mezcla de transcritos de otros tamaños. Para confirmar la presencia de transcritos de 320 nt en las mezclas de reacción de transcripción, se analizaron mediante ensayos de Transcripción Reversa (RT, del inglés *Reverse Transcription*), así como de Transcripción Reversa acoplada a Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR, *Reverse*

Transcription Polymerase Chain Reaction). Al respecto, se observa en la Figura 54.B. la presencia de bandas nítidas e íntegras de ADNc de la región 5'UTR-C transcrita en franca correspondencia productos de transcripción (320 nt), lo que indicaba evidentemente la eficiencia del proceso transcripcional *in vitro*. De igual forma, la RT-PCR mostró productos tanto en las mezclas de transcripción, como en los controles utilizados en la mencionada reacción.

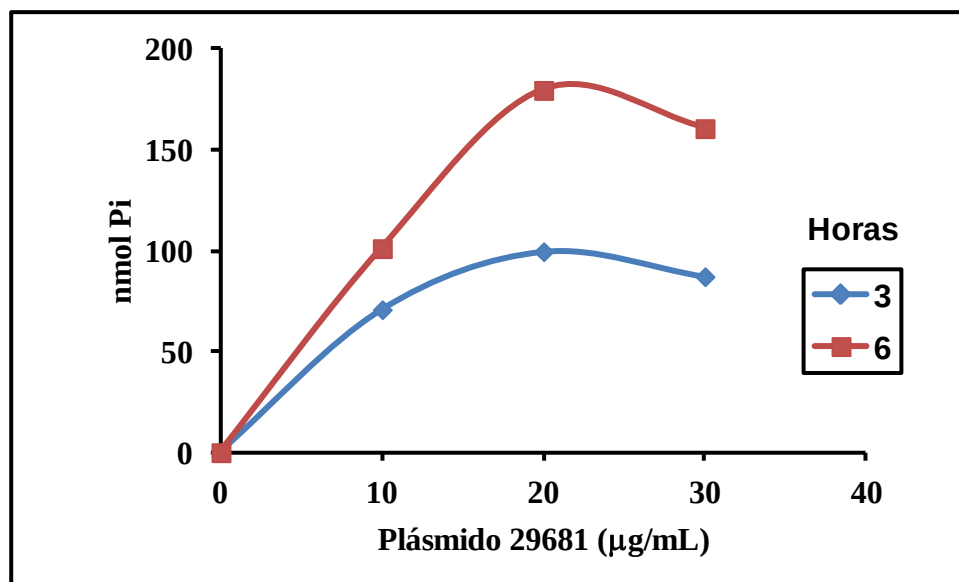


Figura 53. Actividad transcripcional del plásmido 29681. Diferentes concentraciones de los ADNp pGEM®-T Easy-5'UTR-C de la cepa de DENV-2 29681 fueron incubados bajo las condiciones estandarizadas e indicadas en la tabla 7. A las 3 y 6 horas de reacción se tomaron alícuotas de los ensayos para medir el fosfato liberado como se especifica en la Metodología (3.12.1.).

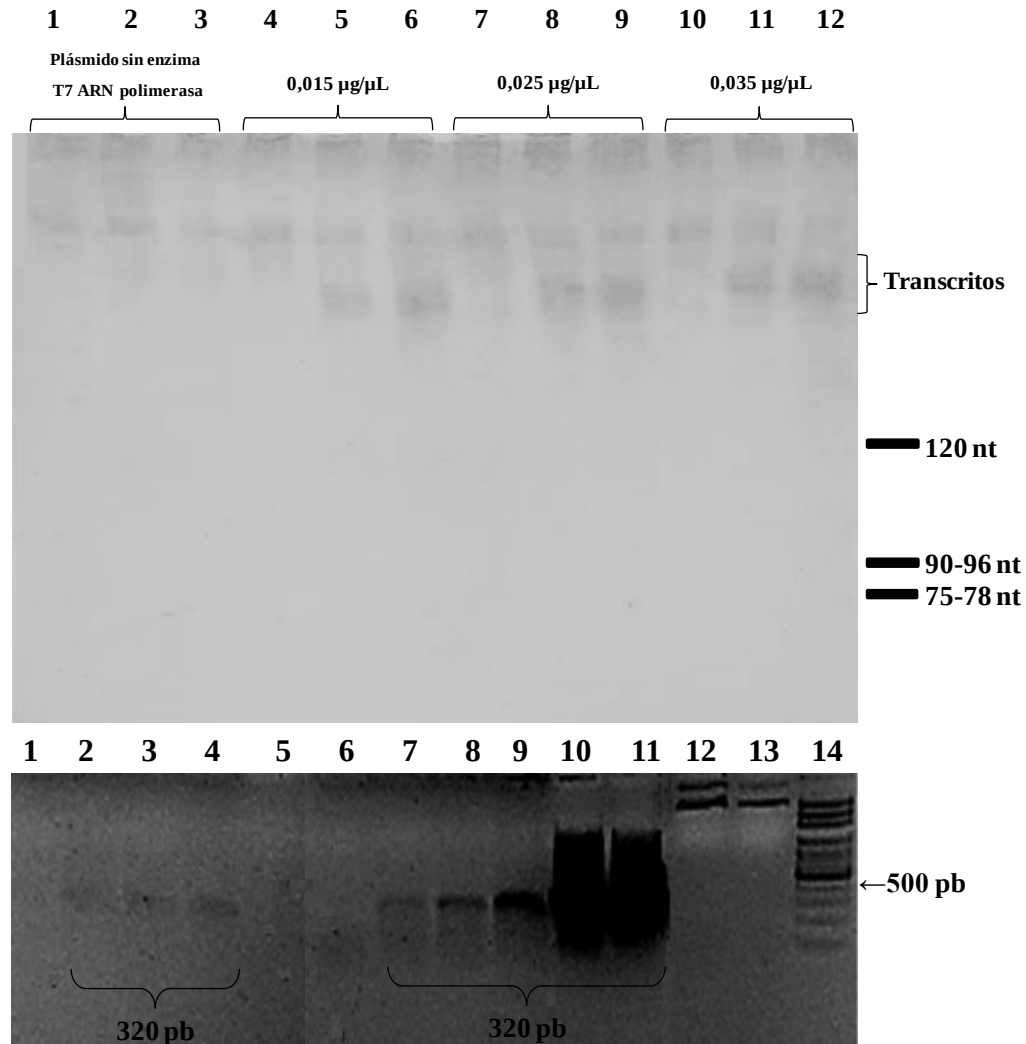


Figura 54. A. Electroforesis en gel de poliacrilamida-urea al 10% de los productos de transcripción *in vitro* con diferentes concentraciones del plásmido pGEM®-T Easy-5'UTR-C/DENV-2 (29681) con las condiciones estandarizadas para la reacción de transcripción a 37 °C durante los tiempos 0, 3 y 6 horas de incubación. **1-3:** 29681 sin enzima T7 ARN Polimerasa, **4-6:** 0,015 µg/µL 29681, **7-9:** 0,025 µg/µL 29681, **10-12:** 0,035 µg/µL 29681. **B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los productos de Transcripción Reversa (Canales 1-5) y Transcripción Reversa acoplada a Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR, *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) (Canales 7-12) de la reacción de transcripción *in vitro* del plásmido pGEM®-T Easy-5'UTR-C/DENV-2 (29681) a 37 °C durante 6 horas de incubación. **1:** 29681 sin enzima T7 ARN Polimerasa, **2:** 0,015 µg/µL 29681, **3:** 0,025 µg/µL 29681, **4:** 0,035 µg/µL 29681, **5:** ADN plasmídico 29681, **6:** 29681 sin enzima T7 ARN Polimerasa, **7:** 0,015 µg/ µL 29681, **8:** 0,025 µg/µL 29681, **9:** 0,035 µg/ 29681, **10:** ADN plasmídico 29681, **11:** ARN DENV-2 (cepa 16681), **12:** 29681 sin linealizar, **13:** pGEM®-T Easy-5'UTR-C/DENV-2 lineal, **14:** Marcador tamaño molecular (1 Kb DNA *step ladder*, Axygen).

En un análisis subsiguiente mediante gel de agarosa al 1% (Figura 55) de la mezcla de transcripción de los plásmidos 2124IQT y 29681 incubada durante 6 horas para ambos plásmidos, se observó la presencia de bandas correspondientes a una mezcla de ARN's con tamaños diversos, pero cercanos a los tamaños descritos para el control de ARNr (1542 y 2904 nt). El patrón de bandas observado, sugiere que una población de los plásmidos (Canales 1: 2124IQT y 2: 29681, Figura 54) tendía a la recircularización, lo que originaría la transcripción de productos de mayor tamaño a los 320 nt de la secuencia viral y que incluían secuencias del ADN plasmídico. Este patrón de plásmido recircularizado se observó también en el control de plásmido (29681) sin enzima T7 ARN Polimerasa (Canal:3), compatible además con el control ubicado en el canal 5 del gel. Este resultado, unido al análisis anterior en gel de poliacrilamida permitió evidenciar que la reacción de transcripción *in vitro*, bajo las condiciones estandarizadas, permitía la obtención del transcrito esperado (320 nt), además de transcritos de mayor tamaño que incluían la secuencia 5'UTR de DENV-2.

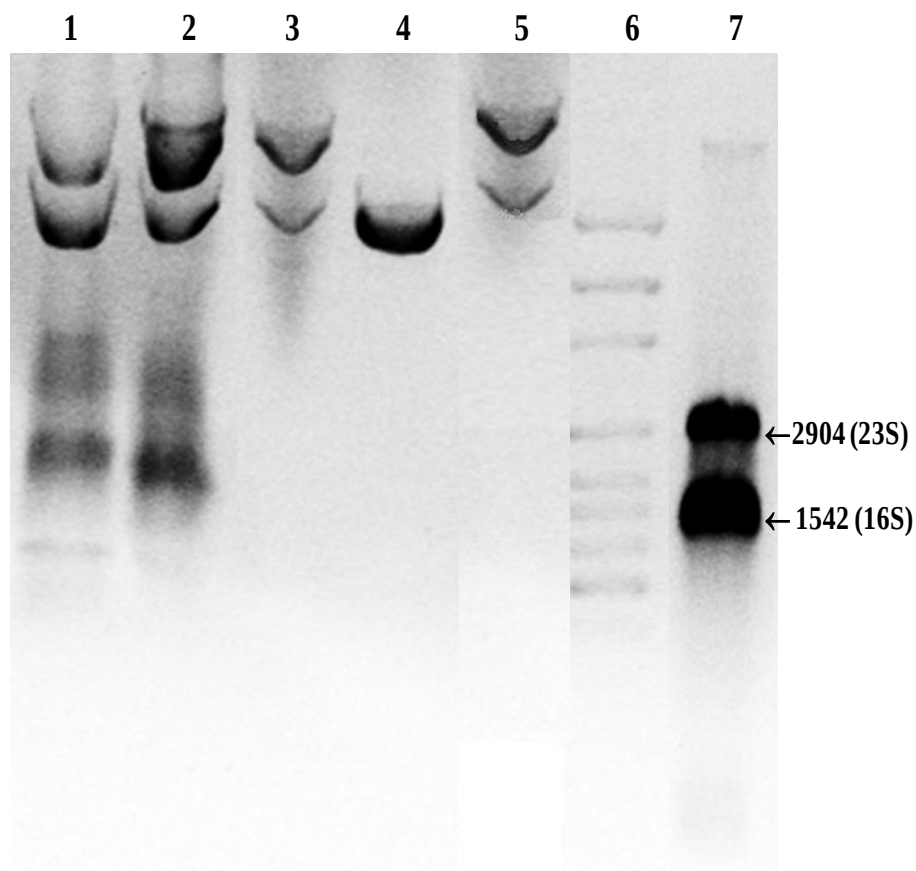


Figura 55. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los productos de transcripción *in vitro* de los plásmidos pGEM®-T Easy-5'UTR-C/DENV-2 (22124IQT y 29681) con las condiciones estandarizadas para la reacción de transcripción a 37 °C durante 6 horas de incubación. **1:** pGEM®-T Easy-5'UTR-C/DENV-2 (2124IQT), **2:** pGEM®-T Easy-5'UTR-C/DENV-2 (29681), **3:** pGEM®-T Easy-5'UTR-C/DENV-2 (29681) sin enzima T7 ARN Polimerasa, **4:** pGEM®-T Easy-5'UTR-C/DENV-2 (29681) LINEAL, **5:** pGEM®-T Easy-5'UTR-C/DENV-2 (29681) CIRCULAR, **6:** Marcador tamaño molecular (1 Kb DNA step ladder, Axygen), **7:** 0,20 OD de ARN ribosomal de *E. coli*.

4.7.2.- Transcripción *in vitro* a partir de los productos de amplificación de la región promotora T7 y 5'UTR-C mediante PCR

Esta reacción de transcripción *in vitro*, se obtuvieron productos correspondientes a secuencias nucleotídicas que incluían tanto la región promotora ubicada en pGEM®-T Easy para la enzima T7 ARN polimerasa, como la región 5'UTR-C de DENV-2 mediante la técnica de PCR. Como se observa en la Figura 56, los productos obtenidos para cada uno de los plásmidos fueron evidenciados mediante la presencia en geles de Agarosa al 2 % de bandas de 348 pb. Una vez obtenidos los productos y purificados de acuerdo a la metodología descrita para tal fin (3.5.4.), se procedió a someter el producto T7-5'UTR-C (29681) a una reacción de transcripción de acuerdo a las condiciones estandarizadas previamente y especificadas en la tabla 7, pero valorando concentraciones crecientes del producto.

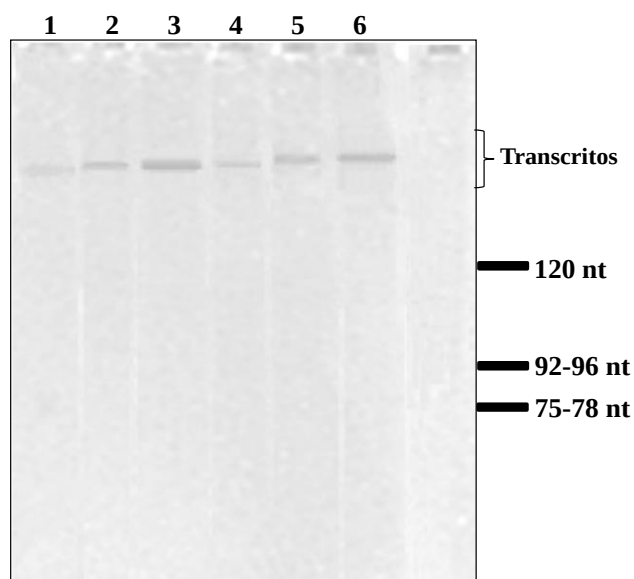


Figura 56. Electroforesis en gel de poliacrilamida-urea al 10% de los productos de transcripción *in vitro* con diferentes concentraciones de los amplificadores T7-5'UTR-C **1-3:** 2124IQT, **4-6:** 29681.

Los resultados mostrados en esta investigación confirman la síntesis de proteínas de genomas de DENV mediante una entrada dependiente de CAP, así como la inhibición del mencionado proceso abriendo la posibilidad de ampliar estos estudios hacia la ejecución de ensayos *in vitro*, por ejemplo en líneas celulares de mamíferos. De igual forma, la comprobación posterior de la capacidad traduccional de los ARNm sintéticos obtenidos mediante ensayos de transcripción *in vitro*, permitirían valorar el inicio del proceso traduccional de los DENV mediante vías no canónicas.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

Los resultados descritos en esta investigación demostraron, la capacidad de los genomas naturales de cepas de los cuatro serotipos de DENV, para dirigir la síntesis proteica viral a partir de la programación de ribosomas de la fracción post-mitocondrial (S-30), obtenida de tejido placentario humano.

La eficiencia del proceso traduccional de los ARNv de DENV fue comprobada en condiciones similares a las presentes en células humanas. Este sistema se ha utilizado para la traducción de ARNm exógenos (Ferrerias *et al.*, 2004), sin embargo nunca había sido valorado para traducir moléculas de ARN pertenecientes a agentes virales, tales como DENV.

Se demostró que moléculas de ADN dirigidas contra regiones asociadas a mecanismos de supervivencia viral, fueron capaces de inhibir el proceso traduccional de los ARNv de DENV, lo que permitió la identificación de regiones del genoma viral asociadas al mecanismo de síntesis de proteínas, así como su potencial uso como terapia antiviral. Estos procesos fueron evaluados y analizados con el fin de alcanzar los objetivos propuestos.

5.1. Análisis de las secuencias nucleotídicas de los genomas completos de las cepas de DENV.

Para cada uno de los serotipos de DENV, se han identificado distintos genotipos (término genérico asignado a grupos por diferencias en su secuencia nucleotídica) (Holmes y Twiddy, 2003; Rico-Hesse, 1990). La combinación entre análisis filogenético y epidemiológico ha indicado la existencia de tres a seis genotipos, dentro de cada uno de los serotipos de DENV, adicionalmente han sido asociados con las distintas manifestaciones

clínicas de la enfermedad (Camacho *et al.*, 2003; Holmes y Twiddy, 2003; Messer *et al.*, 2003; Rico-Hesse, 1990; Rico-Hesse *et al.*, 1997). Esta clasificación ha sido realizada analizando secuencias del genoma completo, o haciendo uso de secuencias parciales del mismo (*e.g.* E, E/NS1, entre otros) (Camacho *et al.*, 2009; Goncálvez *et al.*, 2002; Méndez *et al.*, 2010; Messer *et al.*, 2003; Rico-Hesse, 1990; Usuku *et al.*, 2001; Uzcátegui *et al.*, 2003). Regiones genómicas como 5'UTR, no han sido utilizadas para estudios de clasificación filogenética, sin embargo se ha sugerido el rol de su estructura en mecanismos de expresión genética y el inicio de la replicación del ARN flaviviral (Filomatori *et al.*, 2011).

Esta región está conformada por una secuencia nucleotídica, cuya longitud oscila entre 95 y 101 nucleótidos. Contiene dos dominios (SLA y SLB), SLA es de aproximadamente 70 nucleótidos y presenta tres regiones helicoidales (S1, S2 y S3) interrumpidas por regiones en forma de “bulbos” que actúan como motivos altamente reactivos (Filomatori *et al.*, 2006). En este reporte, el análisis de las secuencias genómicas de la región 5'UTR-C de las diversas cepas objeto de estudio, permitió observar variabilidad en el dominio SLA, entre los nucleótidos 33 y 70 de los serotipos DENV-1, DENV-2 y DENV-3; mientras que en el caso de DENV-4 la variabilidad destacó entre los nucleótidos 27 y 54, específicamente en la región helicoidal S3 de SLA. Este hecho, es de especial interés debido a que 5'UTR-C ha sido relacionada con eventos de supervivencia viral (síntesis de proteínas y replicación del genoma viral) (Deas *et al.* 2005). Para la 5'UTR-C de DENV-4, se han observado deleciones específicas que han podido asociarse con el rol de 5'UTR durante la replicación viral (Cahour *et al.*, 1995).

El proceso de replicación viral, comienza una vez que la polimerasa NS5 (RdRps), se une a la región promotora (SLA) e inicia la síntesis *de novo* de ARN a partir de la región terminal 3' del genoma (Filomatori *et al.*, 2011). La RdRps reconoce específicamente elementos tipo ARN ubicados en el extremo 5' (Filomatori *et al.*, 2006). Este hecho sugiere que la secuencia nucleotídica, podría influir de manera determinante en la eficiencia del proceso replicativo. En el caso de la síntesis de proteínas, el complejo iniciador deberá recorrer la cadena nucleotídica hasta toparse con el codón de inicio AUG. No se ha

esclarecido aún, la influencia que tiene la secuencia nucleotídica de la región inicial del genoma viral en la eficiencia del proceso traduccional. A propósito del codón de inicio, se observaron diferencias en el inicio de acuerdo al serotipo viral, específicamente en los nucleótidos 95 (DENV-1 y DENV-3), 97 (DENV-2) y 101 (DENV-4), lo que podría influir en la eficiencia del proceso traduccional de acuerdo a los serotipos virales, y probablemente de acuerdo a los genotipos que los conforman.

5.2. Optimización de una RT-PCR para la amplificación de la región de iniciación de síntesis de proteínas (5'UTR-C) del genoma viral de cepas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4.

La obtención de fragmentos 5'UTR-C de DENV se alcanzó mediante una RT-PCR optimizada, cuya eficiencia se evidenció por la presencia de bandas nítidas y reproducibles, acordes con los tamaños esperados para cada serotipo viral (Figura 19). Estos productos, fueron obtenidos luego del uso de reacciones, donde se emplearon cantidades variables de cebadores para cada serotipo viral, así como cantidades mínimas de las enzimas Transcriptasa Reversa y *Taq* polimerasa, esto último representó una ventaja considerando que otras RT-PCR utilizan cantidades mayores (Deubel *et al.*, 1990; Henchal *et al.*, 1991; Lanciotti *et al.*, 1992).

En el caso de los flavivirus, y de forma particular de los DENV, la técnica de PCR ha sido de gran utilidad para la detección e identificación viral en diferentes tipos de muestras (suero, mosquitos infectados, cultivos celulares y larvas de mosquitos). Las diferencias entre las técnicas se han basado en los genes elegidos para su amplificación, y a su vez la elección de la región a amplificar se asocia al interés diagnóstico y/o investigativo (Camacho *et al.*, 2009; Domingo *et al.*, 2006; Goncálvez *et al.*, 2002; Leitmeyer *et al.*, 1999; Méndez *et al.*, 2003; Rico-Hesse *et al.*, 1990; Uzcátegui *et al.*, 2003).

En este caso, la región amplificada, representa la secuencia inicial del genoma de los DENV (5'UTR), e incluye la mayor parte de la región que codifica la proteína C, para la cual se han descrito diversas funciones (Deas *et al.*, 2005). De allí, la importancia de su

evaluación y la necesidad de amplificación mediante RT-PCR. Adicionalmente, se amplificaron los fragmentos 5'UTR-C de cepas de DENV-2, pero agregando secuencias nucleotídicas en sus extremos, las cuales corresponderían a secuencias diana para las enzimas *Apa* I y *Eco*RI, tal como se describió en la metodología (3.5.2.) y con el fin de utilizar este fragmento para su posterior clonación en el vector indicado. Utilizando las condiciones de reacción, tiempo y temperatura para amplificar 5'UTR-C de todos los serotipos virales previamente descrita, se logró la amplificación de estos fragmentos demostrando la eficiencia de la técnica de RT-PCR diseñada y optimizada.

5.3. Variabilidad genómica de los fragmentos 5'UTR-C obtenidos mediante RT-PCR a partir de genomas de cepas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4

Luego de obtener los fragmentos de 5'UTR-C de DENV, se realizaron ensayos que permitieran la confirmación de los serotipos virales, mediante técnicas de análisis genómico, como fue la técnica de determinación del Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*), la cual ha sido empleada previamente (Vorndam *et al.*, 1994) con resultados que permitieron el reconocimiento de subgrupos para DENV-2 y DENV-3, en correspondencia con análisis previos realizados mediante técnicas de *Fingerprinting* o secuenciación genómica (Rico-Hesse, 1990).

En este estudio, los resultados del análisis mediante RFLP de los fragmentos 5'UTR-C de las cepas de los serotipos DENV-1, DENV-3 y DENV-4 mostraron el patrón esperado de acuerdo al serotipo viral. Sin embargo, los fragmentos correspondientes a las cepas de DENV-2 presentaron diferencias en el patrón de digestión enzimática, logrando observarse una clara segregación entre los genotipos As y Am (cepas foráneas) y As/Am (cepas autóctonas), sugiriendo diferencias de acuerdo al origen geográfico de las mismas.

DENV-2 ha sido clasificado filogenéticamente por otros autores, pero haciendo uso de regiones nucleotídicas como el fragmento de E/NS1 (Rico-Hesse *et al.*, 1990), lo que permitió la definición de cinco grupos filogenéticamente distintos para DENV-2. En Venezuela, el estudio pionero de clasificación genotípica fue realizado por Rico-Hesse *et*

al. (1997), quienes analizaron cepas de diferentes orígenes geográficos, incluyendo 16 aislados obtenidos de pacientes con FD y/o FHD. El análisis de la región nucleotídica correspondiente a unión E/NS1 mostró idéntica secuencia para algunos virus del mismo país y de igual periodo. En el caso de los virus venezolanos se agruparon en genotipos Am y As. El hallazgo más relevante de este análisis fue la determinación de la ruta de transmisión de DENV-2 desde el sudeste de Asia hasta las Américas. Estos hallazgos mostraron la gran variabilidad genética presente en las cepas de DENV-2 venezolanas, lo que recordaba las características de transmisión descritas para Tailandia en años anteriores (Trent *et al.*, 1989).

En 2001, Uzcátegui *et al.* secuenciaron el gen completo de E de virus venezolanos aislados entre 1997 y 2000 con diferencias en la severidad clínica. Los autores demostraron una vez más el origen asiático de las cepas y el modo de introducción en América Latina durante los años 70's y 80's. De especial interés, fue la evolución *in situ* de las cepas de DENV-2, representado por la evidencia de recombinación de la cepa venezolana Mara4, emparentada con virus As y Am. En 2013, Huhtamo *et al.* demostraron que el análisis de fragmentos correspondientes al gen E demostraron, entre otros hallazgos, que el genotipo Am/As permanecía circulando simultáneamente con otros serotipos virales en el país.

Como se observa, diversos autores (Rico-Hesse *et al.*, 1990; Rico-Hesse *et al.*, 1997; Uzcátegui *et al.*, 2001; Huhtamo *et al.*, 2013), han realizado estudios de clasificación genotípica analizando regiones del genoma, tales como el sitio de unión E/NS1 y E, entre otros. Estas regiones han sido seleccionadas, con base a sus características de conservación nucleotídica, entre los diferentes serotipos virales. Sin embargo, los resultados mostrados indicaron que el análisis de los fragmentos 5'UTR-C de DENV-2 mediante RFLP, fue capaz de diferenciar entre genotipos previamente establecidos, haciendo uso de otras regiones nucleotídicas de los genomas de DENV-2, lo que además podría implicar diferencias en la región 5'UTR-C de los serotipos de DENV, con consecuencias de variación en la funcionalidad de mecanismos de supervivencia viral.

5.4. Transcripción *in vitro* a partir de los plásmidos recombinantes pGEM®-T Easy-5'UTR-C DENV-2 y a partir de los productos de amplificación de la región promotora T7 y 5'UTR-C mediante PCR

Con los fragmentos 5'UTR-C amplificados, se realizó el proceso de clonación en pGEM®-T Easy (3.8.). Tal como se describió en la sección de resultados, los fragmentos de 5'UTR-C fueron clonados en el mencionado plásmido, indicando que el proceso de transcripción *in vitro* sería eficiente, tal como había sido descrito por otros autores (Pérez *et al.*, 2015). Estos investigadores clonaron un fragmento de 297 nucleótidos de la región iniciadora del genoma de DENV-2 en el plásmido pTZ18R. Siguiendo la metodología descrita por Triana *et al.* (1995), y en este caso haciendo uso de los clones de DENV-2, se realizaron los ensayos de transcripción *in vitro*. En los ensayos, se variaron las concentraciones de diversos reactantes [Pirofosfatasa (PPasa), T7 ARN polimerasa, MgCl₂ y plásmidos recombinantes] con el fin de obtener un transcrito único de 320 nucleótidos, tal como describieron Pérez *et al* (2015).

La eficiencia en la formación de los transcritos fue determinada mediante la cuantificación de fosfato libre liberado durante el proceso transcripcional *in vitro*, mediante el método colorimétrico descrito por González *et al.* (1992), utilizado previamente por estos autores en la detección de fosfato libre en sistemas biológicos, tales como hidrólisis de ATP en fracciones microsomales de raíces, así como en la detección de actividad ATPasa en ribosomas de placenta humana (Bandeira *et al.*, 2007). La sensibilidad de este método indicó en cada uno de los ensayos realizados, producción de fosfato inorgánico, lo que indicaba generación de transcritos en las reacciones.

De especial interés, resultó la influencia del ión Magnesio (Mg⁺²) en las reacciones. El Mg⁺² ha sido estudiado en el proceso de elongación que realiza la enzima T7 ARN polimerasa, y que se ha descrito que actúa como un cofactor que cataliza la polimerización dirigida por las enzimas ADN y ARN polimerasas, y el modelo propuesto para las ADN polimerasas (Brautigam y Steitz, 1998), también puede aplicarse a las ARN polimerasas. Thomen *et al.* (2008) estudiaron el efecto del Mg⁺² en la velocidad de transcripción y

como las variaciones de este ion influían en las cinéticas transcripcionales. Al respecto, las mediciones realizadas con diferentes concentraciones de este ion y concentraciones de saturación de NTPs, indicaron que el Mg^{+2} libre puede convertirse en un factor limitante de la transcripción, siendo la enzima inactiva con bajas concentraciones de Mg^{+2} , tal como se observó en los ensayos realizados, donde el Mg^{+2} podía ser capaz de limitar el proceso transcripcional en concentraciones muy bajas o por encima de 15-16 mM, lo que reforzaría su acción como cofactor a determinada concentración.

Con las condiciones establecidas y comprobadas cuantitativamente, se procedió al análisis cualitativo mediante ensayos de electroforesis en geles de poliacrilamida y agarosa. De acuerdo a estos resultados colorimétricos, el proceso de transcripción *in vitro* resultó eficiente, asimismo mediante geles de poliacrilamida se comprobó la formación del transcrito esperado de 320 nt, pero adicionalmente también se detectaron productos de transcripción de mayor tamaño y de peso molecular variable, a juzgar por la característica difusa de las bandas electroforéticas. La electroforesis en gel de agarosa comprobó claramente la formación de transcriptos mayores a 320 nt al observarse bandas en el rango de 1542 y 2904 nt. El análisis electroforético también reveló la presencia de una mezcla de plásmido lineal y plásmido circular en la reacción de transcripción que explicaría la obtención del producto de 320 nt y transcriptos de mayor tamaño. La T7 ARN polimerasa catalizó la formación del fragmento de 320 nt dirigida por el plásmido lineal, mientras que en el plásmido circular, el proceso *run-off* para la enzima T7 ARN polimerasa dependiente de ADN fue ineficiente, lo que favoreció la generación de transcritos de mayor tamaño al esperado.

Estos resultados, indicaban que el proceso de recircularización, pudo haber sido más eficiente por el uso de una estrategia de clonación, donde los extremos de las moléculas 5'UTR-C y pGEM®-T Easy se tornaban cohesivos, luego de la digestión enzimática con *EcoRI*. Adicionalmente, se comprobó mediante reacciones de RT y RT-PCR la síntesis del fragmento de 320 nt correspondiente a la región iniciadora 5'UTR-C, lo que implica, que a pesar de la mezcla de productos de transcripción, estos podrían ser utilizados para estudios del proceso de iniciación traduccional de los DENV en el sistema de placenta.

La otra metodología utilizada para lograr transcritos de 5'UTR-C implicaba la obtención de productos de PCR mediante la amplificación de secuencias, que incluyeran la región promotora de la enzima T7 ARN polimerasa dependiente de ADN y el fragmento 5'UTR-C, a partir de los clones obtenidos. Bajo esta estrategia se logró la obtención de transcritos de 345 nt que pueden ser utilizados también como ARNm sintéticos para dirigir el proceso de síntesis de proteínas a partir de la programación de ribosomas de la fracción post-mitocondrial (S-30), obtenida de tejido placentario humano.

5.5. Traducción dirigida por los ARNv naturales de cepas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 en un sistema libre de células de placenta humana

Como se ha indicado previamente, el genoma de los DENV está delimitado por las regiones 5'UTR y 3'UTR, las cuales contienen elementos que actúan en el proceso de traducción viral. Los ARNv tienen una estructura “cap” tipo I a nivel del extremo 5' (Henchal y Putnak, 1990; Rice, 1996), lo que sugiere que el proceso de iniciación de la traducción de los DENV, es dependiente de “cap” o canónico, es decir se lleva a cabo como lo hacen los ARNm de células eucariotas (Hershey y Merrick, 2000; Kapp y Lorsch, 2004a). Entre estas células eucariotas descritas como susceptibles a infección por partículas de DENV, se incluyen las células dendríticas (DC-SIGN, *Dendritic Cell*), monocitos/macrófagos, células B, células T, células endoteliales, hepatocitos y células neuronales (Clyde *et al.*, 2006).

De acuerdo a esta premisa, y con el fin de demostrar la eficiencia traduccional de los ARNv -correspondientes al genoma completo de cepas de los diferentes serotipos de DENV-, se procedió a la obtención de moléculas de ARNv mediante una metodología que favoreciera la recuperación de ARNv con la mayor integridad posible y en una cantidad óptima, que permitiera la estimulación de los componentes traduccionales, presentes en un sistema de traducción *in vitro* conformado por la fracción post-mitocondrial (S-30) y ARNt de tejido placentario humano, descrito previamente para traducir otros ARNm exógenos (Ferrerías *et al.*, 2004).

Para obtener partículas virales en cantidades suficientes, clásicamente se realizan pasajes sucesivos de las cepas de DENV en determinados sistemas de multiplicación viral (*e.g.* células de mosquitos y/o mamíferos, ratones lactantes). Sin embargo, se requiere de un período de adaptación largo hasta lograr títulos virales aceptables (Vorndam *et al.*, 1997), lo que consume tiempo y recursos, sin la garantía de lograr obtener cantidades virales suficientes.

Ichim y Wells (2011) describieron una metodología que resultó eficiente para aumentar la concentración de retrovirus, la misma fue adaptada en este trabajo para lograr concentrar cepas de DENV, con el objetivo de obtener ARNv en cantidad suficiente para su uso en el sistema de traducción *in vitro* previamente mencionado. Tal como describieron estos autores, se realizaron varias rondas de ultracentrifugación a los sobrenadantes de los cultivos celulares de DENV, logrando obtener un concentrado de partículas virales de los diferentes serotipos de DENV, a partir de los cuales se extrajeron los ARNv. De este modo, se logró la obtención de una cantidad suficiente de ARNv, a través de una metodología (Ichim y Wells, 2011), que resultó relativamente sencilla y muy eficiente para la concentración de partículas virales y en consecuencia de ARNv (Tabla 6).

Además del interés de obtener ARNv en cantidades suficientes, para la ejecución de ensayos, fue necesario demostrar la integridad de las moléculas genómicas obtenidas. Es por ello, que se amplificaron distintas regiones ubicadas a lo largo del genoma viral, lo que incluyó específicamente, los fragmentos 5'UTR-C, C/prMM y NS5 de cada uno de los serotipos de DENV (Figura 25) (Lanciotti *et al.*, 1992; Sánchez-Seco *et al.*, 2005). De especial interés, resultó asegurar que 5'UTR-C mantuviera su integridad, ya que de este modo se estaba garantizando la presencia de una región de los ARNv que permitiera la interacción con elementos de la maquinaria traduccional.

Los ARNv, obtenidos de los diferentes serotipos de DENV, fueron capaces de utilizar de manera eficiente los ribosomas de la fracción post-mitocondrial (S-30) obtenida a partir de tejido placentario humano, para la síntesis de proteínas. Estos resultados representan un hallazgo inédito en los estudios del proceso de traducción de DENV, el cual había sido hasta ahora estudiado a través de la tecnología de ADN recombinante y haciendo uso de ARNm reporteros que contenían en su secuencia el gen de la Luciferasa (Chiu *et al.*, 2005), pero no utilizando los genomas naturales de cepas de DENV. La eficiencia traduccional de los ARNv de DENV fue comprobada en condiciones semejantes a las descritas para células humanas. El sistema traduccional al que se hace referencia está constituido por la fracción S-30 y el ARNt total de placenta humana, y actúa en condiciones

iónicas que han permitido traducir ARNm exógenos (Ferrerias *et al.*, 2004), sin embargo no se había valorado su uso con moléculas de ARNv como fuente externa de ARNm.

Es importante destacar, que este sistema contiene moléculas de ARNm endógeno, lo que supone la presencia de moléculas que compiten con los ARNv como fuente exógena de ARNm, pero a pesar de esta condición los ARNv demostraron capacidad de utilizar ribosomas de la fracción S-30 para llevar a cabo el proceso traduccional. Este hecho fue demostrado en los resultados que indicaban claramente, como el sistema traduccional era estimulado por los genomas virales de las cepas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. El valor de estimulación se calculó entre 30 y 60% para los diferentes ARNv al compararse con la estimulación ejercida por los ARNms del sistema placentario.

Pérez *et al.* (2015) demostraron la traducción eficiente de un ARNm sintético de 297 nucleótidos, lo que supone la generación de un polipéptido de 7 kDa. Sin embargo, los investigadores que diseñaron el sistema de placenta (Ferrerias *et al.*, 2004), reportaron la capacidad del mismo para sintetizar de manera eficiente polipéptidos de altos pesos moleculares a partir de ARNm polisomales, podría esperarse entonces que el sistema traduccional pudiera sintetizar moléculas grandes, como es el caso de los ARNv (10700 nucleótidos ~). Con el fin de aumentar la eficiencia traduccional, se valoró la acción de la temperatura en la estimulación de los ARNv en el sistema placentario. Se observó un incremento de 54 a 74% una vez que los ARNv fueron sometidos a calentamiento, lo cual supone la desnaturalización de las estructuras secundarias correspondientes a SLA, así como a la porción inicial de SLB, específicamente la 5'UAR, ubicada justo antes del codón de inicio AUG. Esta estrategia ha sido utilizada por otros autores (Sztuba-Solinska *et al.*, 2013) inclusive con temperaturas más elevadas (90°C), en todos los casos la idea de la desnaturalización previa es favorecer el reconocimiento eficiente del codón AUG por parte del ARNt (Gu *et al.*, 2010), así como la interacción de los ribosomas con el ARN. Los resultados mostrados indican la utilidad de esta estrategia.

Como ya se ha mencionado, el genoma de los DENV posee la estructura “cap” en el extremo 5', así como las regiones UTR en 5' y 3' involucradas en la expresión de genes.

Debido a la naturaleza de los genomas de DENV y otros miembros del género flavivirus, se ha considerado que el inicio de la traducción es dependiente de “cap”, por encima de la teoría que indica una posible síntesis de proteínas mediante un mecanismo de entrada interna de los ribosomas (Lindenbach y Rice, 2001), similar a la utilizada por otros virus, incluyendo miembros del género flavivirus (*e.g.* Hepatitis C) (Pestova *et al.*, 1996b). De ser así, los genomas de DENV actuarían de la misma forma como lo harían los ARNm celulares, es decir utilizando la estrategia de interacción de los ribosomas con la estructura “cap”, dadas las características de sus fragmentos 5' y 3' UTR (Gallie, 1991; Mangus *et al.*, 2003; Schneider y Mohr, 2003).

En el caso de los ARNm de células eucariotas, se ha descrito que la estructura “cap” es reconocida por la proteína eIF4E, que se une con una afinidad muy alta a esta estructura, provocando la unión del resto de los polipéptidos del complejo eIF4 al ARNm. En células eucariotas, una vez que se forma el complejo de preiniciación 43S, este se une al extremo 5' terminal del ARNm y luego se desplaza a lo largo de 5'UTR de los ARNm. Durante este proceso ocurre el desdoblamiento de las estructuras secundarias del ARNm en la región 5'UTR (Kozak, 2005). En el caso de los ARNv, dicha desnaturalización se vio favorecida por el calentamiento previo a su incorporación al sistema traduccional. Los ARNm que poseen cola de poli (A) tienen mayor eficiencia traduccional debido a su interacción con eIF4G (Tarun *et al.*, 1995; Tarun *et al.*, 1997). La razón es que este factor de iniciación está asociado también a la región 5'terminal del ARNm y mantiene a esta región cerca de la porción 3'terminal, es decir, el ARNm se mantiene en forma cíclica, permitiendo que los ribosomas que culminan la síntesis de proteínas puedan incorporarse rápidamente a la región 5'terminal para iniciar una nueva ronda traduccional (Gallie, 1998). Los ARNv carecen de cola de poli (A) pero se ha reportado el proceso de ciclización para los ARNv de DENV, mediante la unión de las estructuras CS de los extremos 5'y 3' (Filomatori *et al.*, 2006) y es posible que este mecanismo ocurra en el sistema traduccional de placenta.

En el caso específico de DENV, a pesar de que se ha descrito dependencia de los factores de traducción celular, para su síntesis de proteínas, se presume que pudiera haber

algún otro mecanismo de traducción dependiendo de las condiciones celulares. Este hecho se sustenta en observaciones realizadas en células indiferenciadas, infectadas por DENV y en las que se conoce, hay cantidades limitantes de factores de traducción. Edgil *et al.* (2006) demostraron que al restringir la maquinaria dependiente de “cap”, por supresión de la expresión de eIF4E o por adición de inhibidores (LY294002, Wortmanina ó ARN inhibidor específico para eIF4E) no se afectaban significativamente ni la producción de la progenie viral, ni los niveles de síntesis de proteínas. Estas observaciones sugerían, que la traducción podía realizarse por un mecanismo independiente de “cap”, pero no se asociaba con IRES, debido a la ausencia de esta estructura en la región 5'UTR del genoma de DENV. En relación a estos resultados, los autores sustentaron la idea de un modelo, en el cual la interacción de los extremos 5'UTR y 3'UTR permitía al DENV, traducirse mediante la estabilización de los factores de iniciación a nivel del extremo 5' del ARNv, lo que permitiría que factores de iniciación traduccional, como eIF4G y eIF4A, fueran incorporados, haciendo innecesario el requerimiento de eIF4E. Otros autores han descrito la acción de proteínas (eEF1A, La, PTB, YB-1 y hnRNP A1 y Q) que se asocian al extremo 3'UTR de DENV (García-Montalvo *et al.*, 2004). Estas proteínas tendrían el rol de unir los extremos 5'UTR y 3'UTR para favorecer la traducción viral.

Conclusiones adicionales, destacan la relevancia biológica de la independencia de DENV de eIF4E para su traducción, y podría asociarse con la habilidad de éstos virus para traducirse bajo condiciones particulares, como ocurre con las células mieloides y dendríticas (Grolleau *et al.*, 1999), inclusive en células bajo condiciones de *stress* (*e.g.* privación de nutrientes, choque por calor, entre otros). De este modo, la existencia de dos mecanismos para que el genoma de DENV pueda ser traducido sería de significativo impacto, debido al complejo ciclo de vida que deben mantener entre hospedadores mosquitos y humanos, así como a los diversos tipos celulares presentes en el hospedador. Un estudio realizado con células HepG2 infectadas con DENV propone, la traducción dependiente de “cap” durante las primeras horas de infección, y luego un cambio hacia un proceso independiente de “cap” por inhibición de factores de la iniciación traduccional y de transcripción, como la desfosforilación de 4E-BP1 (proteínas de unión a 4E para su regulación) y p70S6K (proteína de fosforilación de S6 ribosomal) (Villas-Bôas *et al.*,

2009). En los resultados mostrados en este trabajo, la síntesis de proteínas observada para los genomas de DENV, sugiere un proceso canónico o dependiente de “cap”, tomando en cuenta la estimulación con ARNv naturales bajo la premisa de que la estructura de los mismos está íntegra e incluye la “cap”.

De especial interés, resultaría la valoración de la estimulación del sistema con moléculas de ARNv completas y con moléculas conformadas exclusivamente por la región iniciadora de los DENV, debido a que Villas-Bôas *et al.* (2009) refieren que la traducción independiente de “cap”, puede ocurrir horas después del inicio del proceso infeccioso en las células hospedadoras. En este trabajo se diseñaron y estandarizaron dos métodos, por los que se pueden obtener transcritos sin “cap” de la región 5'UTR de DENV que podrían ser utilizados para realizar estudios traduccionales comparativos con los mensajeros naturales de DENV.

La máxima actividad traduccional para los ARNv de DENV-2 ocurre a los 40 min posteriores a la incubación, dejando ver una gradual disminución de los polipéptidos sintetizados con el tiempo de reacción, que debe ser una consecuencia de la acción de proteasas presentes en el sistema traduccional de placenta. Sin embargo, los resultados indicaron claramente la estimulación del sistema por parte de los ARNv de DENV-2, y más allá de este hecho se comprobó que los ARNv de los demás serotipos virales, incluyendo otra cepa autóctona de DENV-2 (19094) fueron capaces de lograr la estimulación del sistema traduccional *in vitro*, con valores de estimulación que oscilaron entre 30 y 60%, a diferencia del observado para DENV-2 que se ubicó en aproximadamente 50%, esto sugirió además diferencias inherentes a los serotipos virales, a pesar de que en todos los casos las condiciones de ensayo fueron las mismas.

Al utilizar los ARNv naturales que poseen la estructura “cap” es de suponer que la iniciación de la traducción en el sistema de placenta se llevó a cabo por un mecanismo canónico. Recientemente, Pérez *et al.*, (2015) reportaron la traducción de un ARN sintético de 297 nucleótidos de la cepa 16681 de DENV-2, sin la estructura 5' “cap” en un sistema libre de células de origen humano. El hallazgo descrito por Pérez *et al.* (2015) supone un

mecanismo de síntesis de proteínas independiente de “cap” para DENV-2, que tal como describe Villas-Bôas *et al.*, (2009) podría ocurrir horas después del inicio del proceso infeccioso en las células hospedadoras.

Se ha planteado que el genoma de DENV, así como otros ARNm celulares, tienen en su extremo 3' la región UTR, para la cual se han descrito diversas funciones. El fragmento 3'UTR, cuya longitud oscila entre 400-700 nucleótidos (Álvarez *et al.*, 2005a), posee secuencias conservadas (CS2) y repetidas conservadas (RCS2) ubicadas en el dominio II (Proutski *et al.*, 1997), mientras que en el dominio III –la región más conservada de 3'UTR-, ha sido descrita como una secuencia conservada seguida de una estructura en lazo (CS1-3'SL) que corresponde a la región donde culmina la secuencia del genoma viral. Para SL se han descrito diferentes roles durante la traducción de algunos flavivirus [(e.g. virus West Nile virus (WNV), fiebre amarilla (YFV) y el virus de la Encefalitis Japonesa)] (Álvarez *et al.*, 2006; Holden y Harris, 2004; Li y Brinton, 2001; Zhang *et al.*, 2008).

En el caso de DENV, en un estudio realizado por Wei *et al.* (2009) con cepas de DENV-2, se analizó el rol de las secuencias de ARN y la estructura secundaria de 3'UTR, durante el proceso de traducción en un sistema de células de mamíferos (BHK-21). La principal conclusión de este estudio indicó, que los diferentes elementos ubicados en 3'UTR, regulan la traducción por diferentes rutas. Las regiones RCS2 y CS2 aumentan la síntesis de proteínas, mientras que CS1-3'SL ó SL la suprimen. El estudio mostró que la identidad de la secuencia nucleotídica, -por encima de la estructura secundaria- era responsable de la supresión de la traducción por parte de SL. Sin embargo, Holden *et al.* (2006) sugirieron en su estudio que SL facilita la traducción. Ambos estudios, a pesar de que parecen contradictorios en relación a la función de SL, concluyen que 3'UTR está involucrada en mecanismos de supervivencia viral, aunque no haya conclusiones definitivas al respecto. Otra región, cuyo rol permanece en controversia, es la secuencia nucleotídica correspondiente a VR y su rol en la traducción. Wei *et al.* (2009) observaron la misma eficiencia de traducción de los ARNm con VR que para aquellos con cola de poli (A), sugiriendo funciones similares para ambos elementos.

En el caso de la traducción realizada por los ARNv de los diferentes serotipos de DENV, partiendo del principio de integridad de las moléculas de ARNv y presumiendo la ocurrencia de la ciclización de las mismas, tal como ha sido descrito por diversos autores (Proutski *et al.*, 1997), a nivel de UAR, DAR y CS1 (11–14), se podría suponer la participación de VR y 3'UTR en la síntesis de proteínas llevada a cabo por los ARNv de los diferentes serotipos de DENV. Al respecto, se ha sugerido el rol de 3'UTR de los DENV durante la traducción y replicación del ARNv, a pesar de que los detalles moleculares no han sido aún bien definidos. Wei *et al.* (2009) analizaron el efecto de las secuencias de ARN y los elementos estructurales utilizando el sistema reportero de genes (VIRG, *virus-induced reporter gene*) y de clivaje de ARN por acción de deoxyribozimas (DRz, *RNA cleaving deoxyribozyme systems*), logrando concluir que la traducción es regulada por diferentes vías y por los diversos elementos que se encuentran en 3'UTR. RCS2-CS2 incrementan el proceso, mientras que CS1-SL ó SL son capaces de suprimirla. Asimismo, concluyeron que la secuencia nucleotídica podía ser responsable de la supresión de la traducción. De forma específica, el rol de cada uno de los elementos ha sido evaluado haciendo uso de oligómeros morfolinicos, así como el sistema VIRG (Álvarez *et al.*, 2005; Chiu *et al.*, 2005; Holden y Harris, 2004)

En este trabajo, a pesar de que se evaluó el efecto de oligonucleótidos antisentido dirigidos contra secuencias de 5'UTR-C, se podrá observar en un análisis posterior, como fue posible hacer conclusiones acerca del posible rol de la región CS1, perteneciente a 3'UTR, la cual está involucrada en la interacción ARN-ARN de los DENV (Khromykh *et al.*, 2001).

Los estudios traduccionales de ARNv son escasos; ya que las investigaciones han estado dirigidas a estudiar de forma más detallada el mecanismo de replicación viral y los elementos del fragmento 5'UTR-C involucrados en su ejecución y regulación (Álvarez *et al.*, 2005a; Álvarez *et al.*, 2005b; Álvarez *et al.*, 2008; Villordo y Gamarnik, 2009; You y Padmanabhan, 2001) haciendo posible plantear teorías que sustenten el mencionado mecanismo. Ahora bien, los resultados mostrados, además de comprobar la capacidad de reclutamiento ribosomal por parte de los ARNv para la síntesis de proteínas, mostraron

diferencias en cuanto al porcentaje de estimulación del sistema S-30, tal como se había mencionado previamente, que sugirieron la posible existencia de distintas interacciones del ARNv con los factores traduccionales y ribosomas en el sistema de placenta humana.

Al analizar los alineamientos realizados para comparar la secuencia nucleotídica del fragmento 5'UTR-C de los genomas de DENV evaluados en este estudio, fue posible evidenciar diferencias en la identidad de las secuencias, tal como se había mencionado previamente. En el caso de DENV-2 para las cepas 16681 y 19094, es importante mencionar que el porcentaje de identidad se ubicó en 97%, diferencia que quedó establecida, gracias a cambios en el dominio S3 de SLA, pero que no afectaron la estimulación del sistema S-30 considerando la similitud en los valores obtenidos.

Cuando se comparan los porcentajes de estimulación de los cuatro serotipos de DENV, se observa cómo se establecen diferencias entre los mismos, a su vez cuando se observa la comparación de secuencias, queda establecido que la región que se muestra variable entre los serotipos es SLA, específicamente en el dominio S3. Siendo que a SLA se ha adjudicado un rol preponderante en la replicación del genoma de flavivirus (Álvarez *et al.*, 2005a; Álvarez *et al.*, 2005b; Álvarez *et al.*, 2008; Villordo y Gamarnik, 2009; You y Padmanabhan, 2001), las diferencias en la secuencia nucleotídica, así como los distintos valores de estimulación obtenidos en la síntesis de proteínas, hacen posible presumir que esta región y de forma particular el dominio S3, contiene elementos asociados a la eficiencia del sistema traduccional.

En este mismo contexto, resultó interesante observar una estimulación superior del sistema por parte del genoma de DENV-4, sumado a diferencias no solo a nivel de S3, sino del elemento S1 ubicado en los primeros nucleótidos de 5'UTR, lo que haría suponer que esta secuencia nucleotídica, pudiera ser una zona potenciadora o favorable para la interacción del complejo 43S, o para el mejor desplazamiento del mismo a través de la secuencia del ARNv. Adicionalmente, es posible suponer que esta secuencia (TCTGT) induzca desdoblamiento de las estructuras secundarias del ARNm en la región 5'UTR, debido a la energía liberada por la hidrólisis de ATP, más favorable para el desplazamiento

del mencionado complejo de pre-iniciación 43S hasta que ocurra el encuentro con el primer codón de inicio, el cual se encuentra unos nucleótidos después de lo establecido para los demás serotipos de DENV.

5.6. Traducción dirigida por los ARNv naturales de cepas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 en presencia de oligonucleótidos antisentido

Los oligonucleótidos antisentido han sido diseñados para unirse a los ARN genómicos de flavivirus, y su acción ha estado dirigida a la supresión de la expresión genética, y a la inhibición de mecanismos de supervivencia viral, tales como la replicación (Stein y Shi, 2008). Así mismo, su utilización ha sugerido el uso de posibles mecanismos alternos de traducción de DENV (Pérez *et al.*, 2015). La naturaleza de estas moléculas antisentido, se basa principalmente en cadenas únicas de ADN, ADN fosforotioato, oligómeros morfolinos fosforodiamidatos, entre otros (Stein y Shi, 2008). En el presente estudio, se utilizaron siete (07) oligonucleótidos antisentido (OAs), dirigidos contra regiones del genoma de DENV-2 ubicadas desde el nucleótido 22 hasta el 159, es decir el fragmento 5'UTR y parte de la secuencia que codifica la proteína de la cápside viral. Específicamente, correspondería a las regiones SLA, SLB y cHP y 5'CS, estas dos últimas ubicadas luego del primer codón de iniciación AUG. El uso de estos OAs, permitió identificar regiones del genoma viral asociadas al mecanismo de síntesis de proteínas del ARNv de DENV-2, así como sugerir el uso de OAs como terapia antiviral. En este estudio, de los siete OAs diseñados, se demostró que los OAs1, OAs2, OAs3 y OAs7 afectaron el proceso de síntesis de proteínas por parte del ARNv de DENV-2, en el caso de OAs4 y OAs6 se observó inhibición por encima de 85% sin diferencias significativas en relación a las demás inhibiciones con los otros oligos (OAs1, OAs2, OAs3 y OAs7). De especial interés resultó la ausencia de inhibición de la síntesis de proteínas por parte del OAs5.

OAs1 estuvo diseñado para hibridizar con los primeros nucleótidos de SLA, OAs2 contra la secuencia nucleotídica correspondiente a 5'UAR, OAs3 abarcó secuencias previas y posteriores al primer codón de inicio AUG, mientras que OAs7 se diseñó para unirse a

parte de la secuencia que codifica la proteína C. Es importante mencionar que se realizó una hibridación previa entre el ARNv y cada uno de los OAs diseñados. Esta interacción previa, hace suponer el favorecimiento de la hibridación entre ambas moléculas, formando el híbrido ARNv-ADN antes de entrar en contacto con el sistema traduccional *in vitro*, y en espera de inhibir los eventos asociados a la síntesis proteica, como por ejemplo la formación del complejo de iniciación.

Al tener como premisa que la síntesis de proteínas de DENV ocurre mediante un mecanismo canónico, como se ha descrito para los ARNm celulares (Gallie, 1991; Mangus *et al.*, 2003; Schneider y Mohr, 2003), es de sumo interés observar la inhibición por parte de OAs1, OAs2 y OAs3; ya que en todos los casos estaría sugiriendo el impedimento de la formación del complejo de iniciación, posiblemente por inhibir la interacción del ribosoma con la región 5' terminal del ARNv o por obstaculizar su desplazamiento hasta el codón de iniciación AUG. Estos resultados estarían indicando un mecanismo traduccional dirigido de forma similar al utilizado por ARNm celulares, correspondiente a los ARN endógenos del sistema traduccional *in vitro*.

Las secuencias nucleotídicas del ARNv de DENV-2 contra el cual fueron diseñados los OAs 4 y 6, corresponden también a regiones codificantes de la proteína de la cápside, y a pesar de que se observó inhibición sin diferencias significativas con la inhibición originada por los otros oligos, fue posible que algunas de las moléculas de ARNv, fueran capaces de llevar a cabo el proceso de síntesis de proteínas, lo que estaría de acuerdo con una inhibición de tendencia menor y entre 85% y 97 %. La horquilla cHP, ubicada en la región codificante de la proteína de la cápside muestra la función relacionada con la replicación del ARN y con la selección del codón de inicio (Clyde *et al.*, 2008), específicamente debido a que en el proceso de traducción se favorece el reconocimiento del codón AUG mediante el detenimiento del complejo de iniciación por la mencionada horquilla. La inhibición traduccional con el oligo OAs4, que hibridiza con parte de la secuencia de cHP y la secuencia que contiene el codón de inicio AUG, sugiere el impedimento de la interacción del ribosoma con dicho codón y/o la intervención de cHP en la iniciación de la síntesis de proteínas virales, mediante el reconocimiento del codón AUG

por el complejo ribosomal. La tendencia a una menor inhibición causada por parte de OAs6 sugiere que se puede formar el complejo de iniciación 80S, comienza el proceso de elongación traduccional, y luego ocurre el posterior detenimiento del mismo, producto de la interacción generada entre ARNv y OAs6, pero se podrían sintetizar cierta cantidad de polipéptidos que darían una señal de radiactividad. Este evento también resultaba indicativo de que este proceso es equivalente entre ARNv y los ARNm celulares.

OAs5 por su parte, es una molécula que se diseñó con el objetivo de que hibridizara también con la región en forma de horquilla (cHP) y que codifica parte de la cápside, así mismo con la secuencia nucleotídica contigua denominada 5'CS. Esta última (5'CS) se refiere a la secuencia nucleotídica asociada a la circularización del ARN genómico de DENV, donde ocurre clásicamente una hibridización tipo ARN-ARN. En un trabajo realizado por Chiu *et al.* (2005) utilizaron un sistema reportero de luciferasa y lo compararon con ARNs reporteros con capacidad de traducción demostrada. Observaron que los extremos 5'y 3'UTR terminal del genoma de DENV y WNV eran capaces de favorecer la traducción en un sistema de multiplicación viral, como las células Vero. Sin embargo, aunque describieron a la región 3'UTR como potenciadora de la traducción y estabilizadora del ARNv, indicaron que la complementariedad con secuencias ubicada en 5'UTR-C, no era absolutamente necesaria para el desarrollo de los eventos de supervivencia viral (Chiu *et al.*, 2005). Estos investigadores incluyeron en las secuencias virales, parte de la región codificante de la cápside. Esta región fue incluida por contener la secuencia conservada cCS que permite la ciclización potencial de los ARN por alineamiento con su complemento, CS1 (presente en 3'UTR).

Si esto fuera cierto, la hibridización realizada por el OAs5 con la región CS del ARNv, podría aclarar la razón por la cual no hubo inhibición de la traducción, a pesar de que lo esperado era un efecto bloqueante del OAs5 sobre esa zona, mientras que contrariamente no inhibió la síntesis de proteínas. Pero por otra parte, el hecho de que OAS5, que hibridiza con la región donde hay interacción ARN-ARN e intervención de la región 3'terminal, no inhibiera la traducción sugiere que podría haber un desplazamiento o impedimento para la formación del híbrido OAs5-ARN por la existencia del híbrido ARN-

ARN (Khromykh *et al.*, 2001), por tanto, también indicaría que dicha interacción podría mantenerse en el proceso traduccional y ser importante en la eficiencia del mismo.

El efecto inhibitorio por parte de OAs7, dirigido contra parte de la región genómica que codifica la cápside, ubicada luego de CS, sugiere nuevamente un proceso de traducción dependiente de “cap”, donde luego de formado el complejo de iniciación, ubicado el primero codón de inicio e iniciado el proceso de elongación, solamente un efecto bloqueante por parte de OAs en regiones codificantes era suficiente para inhibir la expresión de genes.

De acuerdo a los hallazgos descritos en relación a la traducción *in vitro* del ARNv de DENV-2 (cepa 16681) en presencia de oligonucleótidos antisentido, y con el fin de aumentar el alcance de los objetivos planteados en esta investigación, se realizó un ensayo de estimulación del sistema traduccional -previamente mencionado- en presencia de la molécula OAs2, dirigida contra la secuencia nucleotídica previa al codón AUG de ARNv de los demás serotipos de DENV. Los resultados de la inhibición indicaron diferencias en los valores relativos obtenidos para cada serotipo viral. Sin embargo, resultó de especial interés el hallazgo, debido a que sugirió la dependencia de “cap” en el proceso traduccional y posibles diferencias en el mismo, de acuerdo al serotipo de DENV implicado en el proceso. Se ha descrito que el DENV -independientemente del serotipo viral-, requiere de las interacciones ARN-ARN en determinadas regiones del genoma viral para ejecutar su proceso replicativo (Alvarez *et al.*, 2005a), mientras que el mecanismo traduccional aún permanece poco dilucidado. Por tanto, la inhibición mostrada reforzaría la implicación de la región 5'UAR en la síntesis de proteínas de DENV. De igual forma, este hallazgo preliminar sugiere el uso de una molécula única como estrategia para la limitación de mecanismos de supervivencia viral de DENV y quizás de otros miembros del género *flavivirus*.

Los hallazgos mostrados sugieren la importancia de haber obtenido transcritos de ARNm sintéticos, correspondientes a la región de iniciación de síntesis de proteínas de los genomas de DENV sin la estructura “cap” tipo I. Este resultado abre las posibilidades a

valoraciones futuras en el sistema de traducción *in vitro* de placenta humana, con las subsecuentes comparaciones con los resultados obtenidos con los ARNv naturales de DENV. De este modo, podrían establecerse conclusiones más contundentes en cuanto a los posibles mecanismos que utilizan virus de tipo ARN (*e.g.* flavivirus, alfavirus, entre otros) para realizar su proceso traduccional en las células hospedadoras. Adicionalmente, los hallazgos observados con los ARNv naturales de DENV, sustentan la dependencia de “cap” para la síntesis de proteínas por parte de los diferentes serotipos virales, una vez que los mismos son capaces de ingresar al ambiente de las células hospedadoras que han logrado infectar. Hecho que ha sido comprobado por la estimulación de un sistema traduccional *in vitro* por parte de ARNv naturales. Estas conclusiones han sido además sustentadas por el uso de OAs, dirigidos contra diversas regiones del fragmento 5'UTR-C, cuyo rol ha sido evaluado como determinante para que los DENV culminen exitosamente su proceso infeccioso. Aunado a esto, el uso de OAs genera un futuro promisorio para la tecnología antisentido, como una alternativa terapéutica viable y potencialmente utilizable, y en consecuencia útil para el tratamiento y control de enfermedades, como la causada por cualquiera de los serotipos del DENV, lo que podría incluir otros virus de tipo ARN. Los resultados mostrados generan grandes retos, que implicarían el desarrollo de moléculas antisentido de reducida toxicidad y alta eficiencia.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

- Se establecieron las diferencias en las secuencias nucleotídicas de la región correspondiente al extremo terminal no traducible (5'UTR) de cepas de los diferentes serotipos de DENV.
- Se estableció la relación filogenética entre las cepas de DENV, objeto de estudio, logrando diferenciarlas en serotipos. En el caso de DENV-2 las cepas se clasificaron en genotipos Asiático, Americano y Asiático/Americano.
- A través del diseño de una RT-PCR se logró la amplificación de productos de diferentes tamaños [275 pb (DENV-1), 300(DENV-2), 320 pb (DENV-2), 274 pb (DENV-3) y 339 pb (DENV-4)], correspondientes al fragmento 5'UTR-C de cepas de los cuatro serotipos virales.
- El sistema de traducción libre de células logró ser estimulado por ARNv naturales de todos los serotipos de DENV sugiriendo la síntesis de proteínas a partir del genoma viral en dependencia de la estructura “cap”.
- La estimulación del sistema traduccional *in vitro* pudo ser bloqueada por la acción de oligonucleótidos antisentido diseñados para hibridizar con diversas regiones del fragmento 5'UTR.
- Se estandarizaron las condiciones para la obtención de transcritos de DENV-2, correspondientes a la región de inicio del genoma viral.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos de síntesis de proteínas en un sistema traduccional libre de células de placenta humana utilizando como fuente de ARNm exógeno, las moléculas de transcritos obtenidas de las reacciones de transcripción *in vitro*.
- Estandarizar ensayos de transcripción *in vitro* para obtener transcritos de otros serotipos de DENV con el fin de que sean utilizados para valorar la estimulación del sistema traduccional previamente mencionado.
- Obtener ARNV a partir de un mayor número de cepas virales, a fin de fortalecer las conclusiones asociadas a la capacidad traduccional de los genomas naturales.
- Diseñar moléculas de naturaleza oligonucleotídica antisentido dirigidas a hibridizar regiones específicas de los fragmentos 5'UTR-C de los serotipos DENV-1, DENV-3 y DENV-4.
- Diseñar moléculas antisentido, tales como los oligómeros morfolidos a fin de realizar ensayos *in vitro* de multiplicación viral, en sistemas de células de mamíferos, con el fin de valorar la actividad bloqueante de los oligonucleótidos antisentido con moléculas resistentes a la acción de nucleasas celulares.
- Ampliar el diseño de este trabajo a otros virus de naturaleza ARN; tales como alfavirus (*e.g.* virus Chikungunya) y otros flavivirus (*e.g.* virus Zika).

CAPÍTULO VIII

REFERENCIAS

- Ackermann M. y Padmanabhan R. (2001). *De Novo* Synthesis of ARN by the Dengue Virus ARN-dependent ARN Polymerase Exhibits Temperature Dependence at the Initiation but Not Elongation Phase. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (43):39926.
- Alcon S., Talarmin A., Debruyne M., Falconar A., Deubel V. y Flamand M. (2002). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during the Acute Phase of Disease in Patients Experiencing Primary or Secondary Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2):376.
- Allison S., Schlich J., Sriasny K., Mandl C., Kunz C. y Heinz F. (1995a). Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *Journal of Virology*, 69:695-700.
- Álvarez D., Filomatori C. y Gamarnik A. (2008). Functional analysis of dengue virus cyclization sequences located at the 5' and 3'UTRs. *Virology*, 375(1):223-35.
- Álvarez D., De Lella A., Fucito S. y Garmanik A. (2005b). Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology*, 339:200-212.
- Alvarez D., Lodeiro M., Ludueña S., Pietrasanta I. y Gamarnik A. (2005a). Long-Range RNA-RNA Interactions Circularize the Dengue Virus Genome. *Journal of Virology*, 79(11): 6631–6643.
- Bandeira E., Ferreras A., Bacilio D., Galvis G., Parada H., Cayama E., Triana J. y Triana-Alonso F. (2007). Actividad ATP hidrolasa asociada a ribosomas humanos como nuevo indicador para evaluar fármacos *in vitro*. *Salus*, 11(2). 46-50.
- Baum A., Sachidanandam R. y García-Sastre, A. (2010). Preference of RIG-I for short viral RNA molecules in infected cells revealed by next-generation sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(37):16303–16308.

- Benenson A. (1995). Fiebre Amarilla. En: Benenson A., Chin J., editores. Control of communicable Diseases Manual. Washington: PAHO. 519 - 520.
- Brautigam C. y Steitz T. (1998). Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes. *Current Opinion in Structural Biology*, 8:54–63.
- Bray M. y Lai C. (1991). Dengue virus pre-membrane and membrane proteins elicit a protective immune response. *Virology*, 185:505–508.
- Brinton M., Fernández A. y Dispoto J. (1986). The 3'-nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure. *Virology*.153 (1):113–121.
- Brinton M. y Dispoto J. (1988). Sequence and secondary structure analysis of the 5'-terminal region of flavivirus genome RNA. *Virology*, 162, 290–299.
- Brooks A., Johansson M., Criswell E., Jans D. y Subhash V. (2002-1). The interdomain Region of Dengue NS5 Protein Interacts with NS3 and Host Proteins. *Dengue Bulletin*, 26:155-161.
- Budkevich T., Giesebrecht J., Altman R., Munro J., Mielke T., Nierhaus K., Blanchard S. y Spahn C. (2011). Structure and dynamics of the mammalian ribosomal pretranslocation complex. *Molecular Cell*. 44(2):214–224.
- Burke D. y Monath T. (2001). Flaviviruses. In: Knippe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. London-New York-Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins.1043-1125.
- Cahour A., Pletnev A., Vazille-Falcoz M., Rosen L. y Lai J. (1995). Growth-restricted dengue virus mutants containing deletions in the 5'non-coding region of the RNA genome. *Virology*, 207:68-76.
- Camacho D., Álvarez M., Soler M., de Quintana M., Chiarello A., Sierra G., Rodríguez F. y Comach G. (2003). Diagnóstico de laboratorio de infecciones por el virus dengue en el Estado Aragua; Venezuela: Octubre 1997-Diciembre 1998. *Investestigación Clínica*, 44(2):91.
- Camacho D., Ferrer E., Rodríguez-Henríquez F., Sierra G., Bosch I., Schmidt D., Franco L., Malo M., Kochel T., Tenorio A. y Comach G. (2009). Genotipificación de virus dengue tipo 1 circulantes en el estado Aragua durante el período 1997 – 2007. *Salus*,1:73-87.

- Camacho D., Ferrer E., Triana-Alonso J., Ferreras A., Graterol H., Comach G. y Triana-Alonso F. (†). (2012). Amplificación de la región 5'UTR-C del genoma de los cuatro serotipos de Virus Dengue Salus online [Internet] [Consulta, 05 de julio de 2013];60-68. Disponible en: http://salusonline.fcs.uc.edu.ve/amplificacion_genoma_virus_dengue.pdf
- Chakraborty K. y Triana-Alonso F. (1998). Yeast elongation factor 3: structure and function. *The Journal of Biological Chemistry*, 379(7):831–840.
- Chambers H., Galler R. y Rice C. (1990). Flavivirus genome organization, expression, & replication. *Annual Review of Microbiology*, 44: 649- 88.
- Chang G. (1997). Molecular biology of dengue viruses. En: *Dengue and Dengue hemorrhagic fever* (Gubler D. and Kuno G.), CAB international, New York (USA).175-198.
- Chen Y., Maguire T., Hileman R., Fromm J., Esko J., Lindhart R. y Marks R. (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparin sulfate. *Nature Medicine*, 3(8):866-871.
- Chiu W., Kinney R. y Dreher T. (2005). Control of Translation by the 5'- and 3'- Terminal Regions of the Dengue Virus Genome. *Journal of Virology*, 79(13): 8303–8315.
- Clarke D. y Casals J. (1958). Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod borne Flaviviruses. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 7:561 -573.
- Clyde K., Barrera J. y Harris E. (2008). The capsid-coding region hairpin element (cHP) is a critical determinant of dengue virus and West Nile virus RNA synthesis. *Virology*, 379: 314–323.
- Clyde K., Kyle J. y Harris E. (2006). Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *Journal of Virology*, 80(23):11418–11431.
- Cologna R. y Rico-Hesse R. (2003). American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *Journal of Virology*, 77: 3929–3938.

- Costin J., Jenwitheesuk E., Lok S-M., Hunsperger E., Conrads K., Fontaine K., Rees C., Rossmann M., Isern S., Samudrala R. y Michael S. (2010). Structural Optimization and De Novo Design of Dengue Virus Entry Inhibitory Peptides. *PLoS Negl Trop Dis* 4(6): e721. Disponible en: <http://www.plosntds.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pntd.0000721&representation=PDF>. (Consulta: 25 Octubre de 2010).
- Davis W., Blackwell J., Shi P-Y. y Brinton M. (2007). Interaction between the Cellular Protein eEF1A and the 3'-Terminal Stem-Loop of West Nile Virus Genomic RNA Facilitates Viral Minus-Strand RNA Synthesis. *Journal of Virology*, 81(18):10172.
- de Almeida H., Bastos I., Ribeiro B., Maigret B. y Santana J. (2013) New Binding Site Conformations of the Dengue Virus NS3 Protease Accessed by Molecular Dynamics Simulation. *PLoS ONE* 8(8): e72402.
- Deas T., Binduga-Gajewska I., Tilgner M., Ren P., Stein D., Moulton H., Iversen P., Kauffman E., Kramer L., Shi P-Y. (2005). Inhibition of Flavivirus Infections by Antisense Oligomers Specifically Suppressing Viral Translation and RNA Replication. *Journal of Virology*, 79(8): 4599–4609.
- Deubel V., Laille M., Hugnot J., Chungue E., Guesdon J., Drouet M., Bassot S. y Chevrier D. (1990). Identification of dengue sequences by genomic amplification: rapid diagnosis of dengue virus serotypes in peripheral blood. *Journal of Virological Methods*, 30: 41–54.
- Domingo C., Palacios G, Jabado O, Reyes N, Niedrig M, Gascón J, Cabrerizo M., Lipkin W., Tenorio A. (2006). Use of a short fragment of the C-terminal E gene for detection and characterization of two new lineages of dengue virus 1 in India. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(4):1519-1529.
- Edgil D., Polacek C. y Harris E. (2006). Dengue Virus Utilizes a Novel Strategy for Translation Initiation When Cap-Dependent Translation Is Inhibited. *Journal of Virology*, 80(6):2976–2986.
- Ferreras A., Bandeira E., Cayama E., Zambrano R., Avila H., Yépez A., Triana-Alonso J. y Triana-Alonso FJ. (2004). Efficient and faithful *in vitro* translation of natural and sunthetic mRNA with human ribosomes. *International Journal of Molecular Medicine*, 13(4):527-536.

- Filomatori C., Lodeiro M. y Álvarez D. (2006). A 5'RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes & Development*. 20:2238-2249. Disponible en: <http://genesdev.cshlp.org/subscriptions>. (Consulta: 16 Diciembre de 2010).
- Filomatori C., Iglesias N., Villordo S., Álvarez D. y Gamarnik A. (2011). RNA Sequences and Structures Required for the Recruitment and Activity of the Dengue Virus Polymerase. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(9):6929–39.
- Friebe P., Shi P. y Harris E. (2011). The 5' and 3' downstream AUG region elements are required for mosquito-borne flavivirus RNA replication. *Journal of Virology*, 85:1900–1905.
- Gallie D. (1991). The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes & Development*, 5:2108–2116.
- Gallie D. (1998). A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. *Gene*, 216:1–11.
- García-Montalvo B., Medina F. y Del Ángel R. (2004). La protein binds to NS5 and NS3 and to the 5' and 3' ends of Dengue 4 virus RNA. *Virus Research*, 102:14.
- Gebhard L., Filomatori C. y Gamarnik A. (2011). Functional RNA elements in the dengue virus genome. *Viruses* 3: 1739–1756.
- Goncálvez A., Escalante A., Pujol F., Ludert J., Tovar D., Salas R. y Liprandi F.(2002). Diversity and evolution of the envelope gene of Dengue virus type 1. *Virology*, 303(1):110-119.
- González-Romo P., Sánchez S. y Gavilanes-Ruiz M. (1992). A modified colorimetric method for the determination of Orthophosphate in the presence of high ATP concentrations. *Analytical Biochemistry*. 200:235-238.
- Grolleau A., Sonenberg N., Wietzerbin J. y Beretta L. (1999). Differential regulation of 4E-BP1 and 4E-BP2, two repressors of translation initiation, during human myeloid cell differentiation. *The Journal of Immunology*, 162:3491–3497.
- Gu W., Zhou T. y Wilke C. (2010). A Universal Trend of Reduced mRNA Stability near the Translation-Initiation Site in Prokaryotes and Eukaryotes. *PLoS Computational Biology*, 6(2): e1000664.

- Gubler D. (1998). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3), 480–496.
- Gubler D. y Clark G. (1995). Dengue/Dengue hemorrhagic fever: The emergence of a global health problem. *Emerging Infectious Diseases*, 1(2): 55-57.
- Gubler D., Kuno G., Sather G., Velez M. y Oliver A. (1984). Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 33: 158– 165.
- Guzmán M. y Kouri G. (2003). Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *Journal of Clinical Virology*, 27: 1–13.
- Guzmán MG, Kouri G. (1996). Advances in dengue diagnosis. *Clinical and Diagnosis Laboratory Immunology*, 3(6):621-7.
- Guzmán M., Kouri G., Soler M., Morier M. y Vázquez S. (1984). Aislamiento del Virus del dengue en suero de pacientes utilizando el ratón lactante y cultivo de células LLCMK2. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 36:4-10.
- Guzmán M., Kouri G. y Halstead SB. (2000). Do escape mutants explain rapid increases in dengue case-fatality rates within epidemics? *Lancet*, 355:1902–1903.
- Hall T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41:95-98.
- Halstead S, Marchette J. (2003). Biologic properties of dengue viruses following serial passage in primary dog kidney cells: studies at the University of Hawaii. *Am J of Trop Med and Hyg.* 69(Suppl 6):5–11.
- Henchal E., Polo S., Vorndam V., Yaemsiri C., Innis B. y Hoke CH. (1991). Sensitivity and specificity of a universal primer set for the rapid diagnosis of dengue virus infections by polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 45:418–428.
- Henchal E. y Putnak J.(1990). The dengue viruses. *Clinical Microbiology Review*, 3:376–96.
- Henchal E., Gentry M., McCown J. y Brandt W. (1982). Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 31:830–836.

Hershey J. y Merrick W. (2000). Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. in Translational control of gene expression, eds Sonenberg N., Hershey J.W.B., Mathews M.B. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY):33–88.

• •

Holden K., Stein D., Pierson T., Ahmed A., Clyde K., Iversen P. y Harris E. (2006). Inhibition of dengue virus translation and RNA synthesis by a morpholino oligomer targeted to the top of the terminal 3' stem-loop structure. *Virology*, 344(2):439-452.

Holden K. y Harris E. (2004). Enhancement of dengue virus translation: role of the 3' untranslated region and the terminal 3' stemloop domain. *Virology* 329: 119–133.

Holmes E. y Twiddy S. (2003). The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infection, Genetics and Evolution*, 3(1):19.

Ichim C. y Wells R. (2001). Generation of high-titer viral preparations by concentration using successive rounds of ultracentrifugation. *Journal of Translational Medicine*, 9, 137.

Kahvejian A., Svitkin Y., Sukarieh R., M'Boutchou M. y Sonenberg N. (2005). Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes & Development*, 19:104–113.

Kapp L. y Lorsch J. (2004a). GTP-dependent recognition of the methionine moiety on initiator tRNA by translation factor eIF2. *Journal of Molecular Biology*, 335: 923–936.

Khromykh A., Meka H., Guyatt K. y Westaway E. (2001). Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. *Journal of Virology*, 75:6719–6728.

Komar A., Gross S., Barth-Baus D., Strachen R., Hensold J., Kinzy T. y Merrick W. (2005). Novel characteristics of the biological properties of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* eukaryotic initiation factor 2A. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 15601–15611.

Kourí G., Mas P., Guzmán M., Soler M., Goyenechea A. y Morier L. (1983) Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: rapid diagnosis of the etiologic agent. *Bulletin Panamerican Health Organization*, 17(2):126–132.

- Kourí G., Guzmán M. y Bravo J. (1987). Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(5):821.
- Kozak M.(2005). A second look at cellular mRNA sequences said to function as internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Research*, 33(20):6593-6602.
- Kuhn R., Zhang W., Rossmann M., Pletnev S., Corver J., Lenches E., Jones C., Mukhopadhyay S., Chipman P., Strauss E. y Baker T. (2002). Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. *Cell*, 108:717-725.
- Lanciotti R., Calisher C., Gubler D., Chang G. y Vorndam A. (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.
- Lei H., Huang K., Lin Y., Yeh T., Liu H. y Liu Ch. (2008). Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever. *American Journal of Infectious Diseases*, 4 (1): 1-9.
- Leitmeyer K., Vaughn D., Watts D., Salas R., Villalobos I., Ramos C. y Rico-Hesse R. (1999). Dengue Virus Structural Differences that Correlate with Pathogenesis. *Journal of Virology*, 4738–4747.
- Lewin B. (2004). Genes VIII. España. Marbán Libros S.L.
- Li J., Lim S., Beer D., Patel V., Wen D., Tumanut C., Tully D., Williams J., Jiriceck J., Priestle J., Harris J. y Vasudevan S. (2005). Functional Profiling of Recombinant NS3 Proteases from All Four Serotypes of Dengue Virus Using Tetrapeptide and Octapeptide Substrate Libraries. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 28766-28774.
- Li W. y Brinton M. (2001). The 3' stem loop of the West Nile virus genomic RNA can suppress translation of chimeric mRNAs. *Virology*, 287: 49–61.
- Libraty D., Young P., Pickering D., Endy T., Kalayanarooj S., y Green S. (2002). High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *The Journal of Infectious Diseases*.186:1165–1168.

- Lindenbach B., Thiel H. y Rice C. (2007). Flavivirus: The virus and their replication. In: Knipe D, Howley Peter. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1101-52.
- Lindenbach B. y Rice C. (2001). Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: Fields, B. N., D. M. Knipe, P. M. Howley and D. E. Griffin. Fields Virology (4th Ed.). Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, Pa.
- Liu Z., Li X., Jiang T., Deng Y., Zhao H., Wang H., Ye Q., Zhu S., Qiu Y., Zhou X., Qin E. y Qin CF. (2013). Novel *cis*-acting element within the capsid-coding region enhances flavivirus viral-RNA replication by regulating genome cyclization. *Journal of Virology*, 87:6804–6818.
- Liu G., Grant W., Persky D., Latham V.Jr., Singer R. y Condeelis J. (2002). Interactions of Elongation Factor 1 with F Actin and Actin mRNA: Implications for Anchoring mRNA in Cell Protrusions. *Molecular Biology of the Cell*.13:579.
- Lodeiro M., Filomatori C. y Gamarnik AV. (2009). Structural and functional studies of the promoter element for dengue virus RNA replication. *Journal of Virology*, 83:993–1008.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C., Krieger M., Scott M., Zipursky L. y Darnell J. (2005). *Biología celular y molecular*. 5^{ta} edición. Editorial Médica Panamericana.
- Lourenço-de-Oliveira R., Vega-Rua A., Vezzani D., Willat G., Vazeille M., Mousson L. y Failloux A. (2013). *Aedes aegypti* from temperate regions of South America are highly competent to transmit dengue virus. *BMC Infectious Diseases*. 13: 610.
- Luque J. y Herráez A. (2006). *Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Ed. Harcourt.
- Mangus D., Evans M. y Jacobson A. (2003). Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biology*, 4:223.
- Martina B., Koraka P. y Osterhaus A. (2009). Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clinical Microbiology Review*, 22:564–81.

- Méndez J., Usme-Ciro J., Domingo C., Rey G., Sánchez J., Tenorio A. y Gallego-Gómez J. (2010). Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia. *Virology Journal*, 7:226.
- Méndez J., Bernal M. del P., de Calvache D. y Boshell J. (2003). Genotipificación y análisis filogenético de cepas colombianas del virus Dengue tipo 2. *NOVA*, 1:1794-2370.
- Merrick W. (2010). Introduction to the Thematic Minireview Series on Protein Synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 285,21197-21201.
- Messer W., Gubler D., Harris E., Sivananthan K. y de Silva A. (2003). Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerging Infectious Diseases*, 9:800-809.
- Mitchell C. (1995). The role of *Aedes albopictus* as an Arbovirus vector. *Parasitology*. 37: 109 - 113.
- Monath T. y Tsai T. (1997). Flavivirus. En: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG (eds). *Clinical Virology*. New York: Churchill Livinstone Inc; 1133-1185.
- Muller D. y Young P. (2013). The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Research*, 98:192–208.
- Muñoz-Jordán J., Collins C., Vergne E., Santiago G., Petersen L., Sun W. y Linnen J. (2009) Highly sensitive detection of dengue virus nucleic acid in samples from clinically ill patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 47: 927–931.
- Murray J., Aaskov J. y Wright P. (1993). Processing of the dengue virus type 2 proteins prM and C-prM. *Journal of General Virology*, 74 (2):175-82.
- Nkhoma E., Poole C., Vannappagari V., Hall S. y Beutler E. (2009). The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Blood Cells Molecular Diseases*, 42:267–278.
- Osorio L., Ramírez M., Bonelo A., Villar L. y Parra B. (2010). Comparison of the diagnostic accuracy of commercial NS1-based diagnostic tests for early dengue infection. *Virology Journal*, 7:361.
- Pan American Health Organization (PAHO).(1990). Dengue hemorrhagic fever in Venezuela. *Epidemiological Bulletin*, 11:7–9.

- Perera R., Khaliq M. y Kuhn R. (2008). Closing the door on flaviviruses: Entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral Research*, 80: 11-22.
- Pérez M., Rojas R., Requena D., Ferreras A.C., Triana J., Triana-Alonso, F. (2015). Traducción independiente de la estructura 5'cap del ARN genómico del virus dengue. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32(1):11-18.
- Pestova T., Shatsky I. y Hellen C. (1996b). Functional dissection of eukaryotic initiation factor 4F: the 4A subunit and the central domain of the 4G subunit are sufficient to mediate internal entry of 43S initiation complexes. *Molecular and Cellular Biology*, 16:6870–6878.
- Polacek C., Friebe P. y Harris E. (2009). Poly(A)-binding protein binds to the non-polyadenylated 3' untranslated region of dengue virus and modulates translation efficiency. *Journal of General Virology*, 90:687–692.
- Proutski V., Gould E., y Holmes E. (1997). Secondary structure of the 3' untranslated region of flaviviruses: similarities and differences. *Nucleic Acids Research*, 25(6):1194-1202.
- Randolph V. y Stolar V. (1990). Low pH induced fusion in flavivirus infected *Aedes albopictus* cell cultures. *Journal of General Virology*, 71:1845-1850.
- Raviprakash K., Liu K., Matteucci M., Wagner R., Riffenburgh R. y Carl M. (1995). Inhibition of Dengue Virus by Novel, Modified Antisense Oligonucleotides. *Journal of Virology*, 69(1): 69–74.
- Rice, CM. (1996). Flaviviridae: The Viruses and their Replication. En: Fields BN, Kriple DM, Howley PM. *Fields Virology*; 3rd Raven Press pp. 931-952.
- Rico-Hesse R., Harrison L., Salas R., Tovar D., Nisalak A., Ramos C., Boshell J., de Mesa M., Nogueira R. y da Rosa A. (1997). Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology*, 230:244.
- Rico-Hesse R. (1990). Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*, 174:479-493.
- Rico-Hesse R. (2007). Dengue Virus Evolution and Virulence Models. *Clinical Infectious Diseases*, 44(11):1462–1466.

- Rico-Hesse R. (1990). Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*, 174(2):479-93.
- Rico-Hesse R. (2003). Microevolution and virulence of dengue viruses. *Advances in Virus Research*, 59(3):15-41.
- Rigau-Pérez J., Clark G., Gubler D., Reiter P., Sanders E. y Vorndam V. (1998). Dengue and dengue haemorrhagic fever. *The Lancet*, 352:971-977.
- Rodhain F, Rosen L. (1997). Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships. En: *Dengue and dengue hemorrhagic fever* by Gubler D. and Kuno G. (1997). CAB international, New York (USA), pp: 45-60.
- Saitou N. y Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4 (4): 406-425.
- Sambrook J., Russell D. (2001). *Molecular cloning. A laboratory manual*. 3th ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sánchez-Seco M., Rosario D., Domingo C., Hernández L., Valdés K., Guzmán M. y Tenorio A. (2005). Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. *Journal of Virological Methods*, 26:101–109.
- Santiago G., Vergne E., Quiles Y., Cosme J., Vázquez J., Medina J., Medina F., Colón C., Margolis H. y Muñoz-Jordán J. (2013). Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7: e2311.
- Schneider R. y Mohr I. (2003). Translation initiation and viral tricks. *Trends in Biochemical Sciences*, 28:130–136.
- Silva R., de Silva A., Harris E., y MacDonald G. (2008). Genetic analysis of Dengue 3 virus subtype III 5' and 3' non-coding regions. *Virus Research*, 135:320-5.
- Sonenberg, N. y Hinnebusch, G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: Mechanisms and biological targets. *Cell*, 136(4): 731–745.
- Spruyt M. y Buquicchio F. (1994). *Gene Runner Version 3.05*. Hastings Software, Inc.
- Stadler K., Allison S., Schlich J., Heinz F. (1997). Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *Journal of Virology*, 71, 8475–8481.

- Stein D. y Shi P. (2008). Nucleic acid-based inhibition of flavivirus infections. *Frontiers in Bioscience*, 1(13): 1385-1395.
- Stein D., Claite Y., Silengo S., Amantana A., Crumely S., Blouch R., Iversen P. y, Kinney R. (2008). Treatment of AG129 mice with antisense morpholino oligomers increases survival time following challenge with dengue 2 virus. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62:555–565.
- Streitfield R., Bielby G. y Sinclair D. (1993). A primary dengue 2 epidemic with spontaneous haemorrhagic manifestations. *The Lancet*, 342 (8870): 560-561.
- Sztuba-Solinska J., Teramoto T., Rausch J., Shapiro B., Padmanabhan R. y Le Grice S. (2013). Structural complexity of Dengue virus untranslated regions: *cis*-Acting RNA motifs and pseudoknot interactions modulating functionality of the viral genome. *Nucleic Acids Research*, 41:5075–5089.
- Tamura K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. y Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–2739.
- Tarun SZ Jr., Sachs AB. (1995). A common function for mRNA 5 and 3 ends in translation initiation in yeast. *Genes & Development*, 9:2997–3007.
- Tarun S. Jr., Wells S., Deardorff J. y Sachs A. (1997). Translation initiation factor eIF4G mediates *in vitro* poly(A) tail-dependent translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94:9046–9051.
- Thomen P., López P., Bockelmann U., Guillerez J., Dreyfus M. y Heslot F. (2008). T7 RNA Polymerase Studied by Force Measurements Varying Cofactor Concentration. *Biophysical Journal*, 95(5), 2423–2433.
- Thompson J., Higgins D. y Gibson T. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680.
- Trent D., Grant J., Monath T., Manske C., Corina M. y Fox G. (1989). Genetic variation and microevolution of dengue 2 virus en Southeast Asia. *Virology*. 172:523.

- Usuku S., Castillo L., Sugimoto C., Noguchi Y., Yogo Y. y Kobayashi N. (2001). Phylogenetic analysis of dengue-3 viruses prevalent in Guatemala during 1996-1998. *Archives of Virology*, 146:1381.
- Triana-Alonso F., Dabrowski M., Wadzack J. y Nierhaus K. (1995). Self-coded 3'-Extension of Run-off Transcripts Produces Aberrant Products during *in vitro* Transcription with T7 RNA Polymerase. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (11). 6298-6307.
- Uzcátegui N., Camacho D., Comach G., Cuello de Uzcátegui R., Holmes E. y Gould E. (2001). Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for *in situ* virus evolution and recombination. *Journal of General Virology*, 82:2945.
- Huhtamo E., Comach G., Sierra G., Camacho D., Sironen T., Vapalahti O. y Uzcátegui N.(2013). Diversity and composition of dengue virus type 2 in Venezuela. *Epidemiology & Infection*, 141(9):1816-22
- Uzcátegui NY, Comach G, Camacho D, Salcedo M, Cabello de Quintana M, Jiménez M, Sierra G, Cuello de Uzcátegui R, James WS, Turner S, Holmes EC, Gould EA.(2003). Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. *Journal of General Virology*, 84:1569-1575.
- Vázquez S., Bravo J., Pérez A. y Guzmán M. (1997). Inhibition ELISA. Its utility for classifying a case of dengue. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 49(2):108-12.
- Villas-Boas C., Conceicao T., Ramírez J., Santoro A., Da Poian A. y Montero-Lomeli, M. (2009). Dengue virus induced regulation of the host cell translational machinery. *Brazilian of Medical Journal of Medical and iological Research, J Med Biol Res.* 42: 1020–1026.
- Villordo S. y Gamarnik A. (2009). Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. *Virus Research*,139(2):230-9.
- Vorndam V., Kuno G. y Rosado N.(1994). A PCR-restriction enzyme technique for determining dengue virus subgroups within serotypes. *Journal of Virological Methods*, 48(2-3):237-44.

- Vorndam A., y Kuno G. (1997). Laboratory diagnosis of dengue virus infections. En: Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. Chapter 9, By Gubler D.J and Kuno G. CAB international, New York (USA). 313-333.
- Wallis T., Huang C., Nimkar S., Young P. y Gorman J. (2004). Determination of the disulfide bond arrangement of Dengue virus NS1 protein. The Journal of Biological Chemistry, 279(20):20729–20741.
- Wang S., He R. y Anderson R. (1999). PrM- and Cell-Binding Domains of the Dengue Virus E Protein. Journal of General Virology. 73(3):2547–2551.
- Warfield K., Panchal R., Aman M. y Bavari S. (2006). Antisense treatments for biothreat agents. Current Opinion in Molecular Therapeutics, 8:93–103.
- Watson J., Baker T., Bell S., Gann A., Levine M. y Losick R. (2006). Biología molecular del gen (5ta. Edición). España:Editorial Médica Panamericana.
- Wei Y., Qin C., Jiang T., Li X., Zhao H., Liu Z., Deng Y., Liu R., Chen S., Yu M., y Qin E. (2009). Translational Regulation by the 3' Untranslated Region of the Dengue Type 2 Virus Genome. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 81(5): 817-824.
- World Health Organization. 2009. Dengue Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New edition. France.
- World Health Organization. 1997. Dengue hemorrhagic fever: Diagnosis, treatment, prevention and control, second edition, Geneva. 10:222-230.
- Yábar C. (2003). Rol de las Proteínas No Estructurales en los Eventos de Replicación del ARN del Virus Dengue: Propuesta de un Modelo de Replicación del ARN. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 20 (1).
- Yap T, Xu T., Chen Y-L., Malet H., Egloff M., Canard B., Vasudevan S. y Lescar J. (2007). Crystal Structure of the Dengue Virus RNA-Dependent RNA Polymerase Catalytic Domain at 1.85-Angstrom Resolution. Journal of Virology, 81(9) :4753–4765.
- You S. y Padmanabhan R.(1999). A novel *in vitro* replication system for Dengue virus. Initiation of RNA synthesis at the 3'-end of exogenous viral RNA templates requires 5'- and 3'-terminal complementary sequence motifs of the viral RNA. The Journal of Biological Chemistry, 274(47):33714-22.

- Yu L., Nomaguchi M., Padmanabhan R. y Markoff L. (2008). Specific requirements for elements of the 5' and 3' terminal regions in flavivirus RNA synthesis and viral replication. *Virology*, 74:170–85.
- Zhang B., Dong H., Stein D., Iversen P. y Shi P. (2008). West Nile virus genome cyclization and RNA replication require two pairs of long-distance RNA interactions. *Virology*, 373: 1–13.

ANEXO 1

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE LA UNIVERSIDAD DE CARABOBO (BIOMED-UC)

INFORMACION A LOS PARTICIPANTES EN LA INVESTIGACION Y FORMATO DE CONSENTIMIENTO.

TITULO DEL PROYECTO: ANÁLISIS DEL PROCESO DE TRADUCCIÓN *IN VITRO* DE CEPAS DEL VIRUS DENGUE E INHIBICIÓN DE ESTE MECANISMO MEDIANTE EL USO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO

PROTOCOLO N°: _____

PATROCINADOR DEL ESTUDIO: UNIVERSIDAD DE CARABOBO, UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA, FONACIT.

DIRECCION: BIOMED-UC. Final Calle Cecilio Acosta, Urb. La Rinconada, Las Delicias, Maracay 2102, venezuela

TELEFONOS: 58-243-2425822 Ext. 109

Usted podrá participar en éste estudio a través de la donación voluntaria de la placenta luego de que usted sea sometida a la cirugía denominada Cesárea Segmentaria. Este formato de consentimiento puede incluir algunas palabras que usted no comprenda, pero que deberán ser aclaradas por cualquiera de los integrantes del proyecto. Por favor lea este formato y pídale al equipo del estudio que le aclare cualquier punto que usted no entienda. Si después de esto usted decide participar, deberá firmar este formato en presencia del personal del estudio. Usted puede rehusarse a participar en este estudio o retirarse del mismo en cualquier momento

INTRODUCCION Y OBJETIVOS

El estudio que se realizará tendrá como objetivo analizar el mecanismo de traducción *in vitro* de los serotipos de virus Dengue. Para lograrlo es necesario el uso del tejido placentario debido a que el mismo es rico en mitocondrias, las cuales son indispensables para la realización de los ensayos finales.

PROCEDIMIENTOS

Una vez que haya dado a luz a su hijo/hija, su tejido placentario será extraído por parte del médico/médica especialista encargado de realizar el procedimiento quirúrgico (Cesárea segmentaria). En ese momento, ese tejido será colocado en un recipiente y trasladado al BIOMED-UC donde será lavado cuidadosamente y donde se extraerán los organelos denominados mitocondrias, el tejido restante considerado de desecho será descartado de forma adecuada siguiendo normativas universales de bioseguridad.

INCOMODIDADES Y RIESGOS

La donación de la placenta no representa ningún tipo de incomodidad ni riesgos para usted, más allá de los procesos que fisiológicamente ocurren en el momento de la realización de la cesárea segmentaria, procedimiento en el cual ninguno de los integrantes del equipo del proyecto tendrán potestad de participar.

BENEFICIOS Y COMPENSACION

Los posibles beneficios que pueden derivarse de SU participación en el estudio incluyen: el análisis de los procesos de multiplicación y traducción de los Dengue 2 lo que daría la oportunidad en un futuro cerca de hacer más estudios relacionados con el uso de posibles antivirales que ayudarían a prevenir las infecciones por virus dengue.

No hay un beneficio directo para usted por estar en este estudio. Usted no recibirá ningún pago por su participación en este estudio.

COSTOS

Todos los procedimientos del estudio se realizarán sin costo alguno para usted.

PREGUNTAS

Si tiene preguntas respecto a participar en este estudio o si piensa que ha sufrido lesiones relacionadas con el estudio contacte a:

LEDIA TRIANA-ALONSO, 0243-2425822

DARIA ELENA CAMACHO, 0243-2425822

Si tiene preguntas sobre los procedimientos médicos, por favor pregunte a:

VICTOR PICOS, 0243-2425822

Si tiene preguntas sobre sus derechos como sujeto de investigación, preocupaciones o quejas, usted puede contactar a: **María Dora Feliciangeli, Coordinadora del Comité de Bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo (CBIIB-UC), al telef. 58-243-2425822 Ext 107.**

No firme este formato de consentimiento a menos que haya tenido la oportunidad de hacer preguntas, haya recibido respuestas aceptables a todas sus preguntas y esté dispuesto a participar en el estudio.

CONFIDENCIALIDAD

Toda la información relacionada con este proyecto será confidencial. Los documentos de esta investigación serán mantenidos en las oficinas del BIOMED-UC en Maracay, Venezuela. Los datos pueden ser revisados por el Comité de Bioética del BIOMED-UC en Maracay, Venezuela. Nosotros mantendremos los documentos en privado hasta donde sea legalmente posible. Solo las personas involucradas oficialmente en el estudio tendrán acceso a los registros del estudio.

PARTICIPACION VOLUNTARIA/RETIRO

Su participación en este estudio es voluntaria. Usted puede decidir no participar.

DECLARACION DE CONSENTIMIENTO

DECLARO QUE HE LEIDO, O ALGUIEN ME HA LEIDO, ESTE DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO. TAMBIEN HE TENIDO LA OPORTUNIDAD DE HACER PREGUNTAS ACERCA DEL ESTUDIO Y MIS DERECHOS BIOETICOS Y TODAS HAN SIDO RESPONDIDAS SATISFACTORIMENTE.

ENTIENDO QUE LA FIRMA DE ESTE DOCUMENTO INDICA LA DONACIÓN DEL TEJIDO PLACENTARIO AL QUE SE HA HECHO REFERENCIA.

Recibiré una copia firmada y fechada de este consentimiento.

Nombre del participante

Cédula de Identidad

Firma del participante

Fecha

Nombre de la persona que obtiene el consentimiento informado

Fecha

ANEXO 2

Datos de las cepas de DENV empleadas para la elaboración de los alineamientos múltiples y/o relaciones filogenéticas.

Serotipo	Código de identificación	N° de acceso (GenBank)/Año aislamiento
DENV-1	16007*	AF180817.1/1964/Tailandia
	-	FJ639735.1/1997/Venezuela
	-	GU056033.1/1998/Venezuela
	-	FJ639743.1/1999/Venezuela
	-	GU131833.1/2000/Venezuela
	-	GU131832.1/2000/Venezuela
	-	GU131834.1/2001/Venezuela
	-	FJ639794.1/2004/Venezuela
	-	FJ639808.1/2005/Venezuela
	-	FJ639824.1/2006/Venezuela
	-	GU131839.1/2006/Venezuela
	-	FJ850102.1/2007/Venezuela
	-	GU131842.1/2007/Venezuela
	-	FJ850104.1/2008/Venezuela
	-	FJ850103.1/2008/Venezuela
DENV-2	16681*	NC_001474.2/1964/Bangkok
	1693**	AF363077.1/Venezuela
	19094**	FJ639734.1/2003/Venezuela
	28105**	FJ639732/Venezuela
	29681**	FJ639822.1/Venezuela
	1950	EU056811.1
	-	EU726775.1/1996/Venezuela
	-	FJ898465.1/1998/Venezuela
	-	FJ898466.1/2000/Venezuela
	-	FJ639783.1/2003/Venezuela
	-	FJ639788.1/2004/Venezuela
	-	EU482605.1/2007/Venezuela
	-	GQ868641.1/2007/Venezuela
	-	EU482608.1/2007/Venezuela
	-	FJ850108.1/2008/Venezuela
DENV-3	H87*	M93130.1/1956/Filipinas

	-	FJ639749.1/2000/Venezuela
	-	FJ639763.1/2001/Venezuela
	-	J639757.1/2001/Venezuela
	-	FJ182015.1/2001/Venezuela
	-	FJ639755.1/2001/Venezuela
	-	FJ639753.1/2001/Venezuela
	-	FJ639751.1/2001/Venezuela
	-	FJ639775.1/2002/Venezuela
	-	FJ639780.1/2003/Venezuela
	-	FJ639791.1/2004/Venezuela
	-	FJ639789.1/2004/Venezuela
	-	FJ639803.1/2005/Venezuela
	-	FJ639804.1/2005/Venezuela
	-	FJ639825.1/2006/Venezuela
	-	FJ639817.1/2006/Venezuela
	-	FJ850109.1/2007/Venezuela
	-	FJ639826.1/2008/Venezuela
DENV-4	H241*	AY947539.1/1956/Filipinas
	-	FJ639738.1/1998/Venezuela
	-	FJ639739.1/1998/Venezuela
	-	FJ639745.1/1999/Venezuela
	-	FJ850095.1/2000/Venezuela
	-	FJ639773.1/2001/Venezuela
	-	JN819406.1/2006/Venezuela
	-	GQ868645.1/2007/Venezuela
	-	FJ882591.1/2007/Venezuela
	-	FJ182016.1/2007/Venezuela
	-	EU854300.1/2007/Venezuela
	-	FJ882581.1/2007/Venezuela
	-	FJ882586.1/2007/Venezuela
	-	FJ882582.1/2007/Venezuela
	-	FJ882580.1/2007/Venezuela
	-	FJ882592.1/2008/Venezuela

* Cepas de DENV objeto de estudio