



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

ANÁLISIS DE DETERMINANTES GENÉTICOS DE VIRULENCIA EN CEPAS DEL VIRUS DENGUE TIPO 2

Katherine Dayanna Laiton Donato

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Posgrado Interfacultades en Microbiología
Bogotá, D. C.
Noviembre de 2015



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

ANÁLISIS DE DETERMINANTES GENÉTICOS DE VIRULENCIA EN CEPAS DEL VIRUS DENGUE TIPO 2

Katherine Dayanna Laiton Donato

Trabajo de grado para optar al título de:

Magíster en Ciencias - Microbiología

Director:

José Aldemar Usme Ciro. *BSc., MSc., PhD.*

Investigador Asociado. Laboratorio de Virología. Instituto Nacional de Salud - INS

Codirector:

Clara Isabel Bermúdez Santana. *BSc., MSc., PhD.*

Profesora Asociada, Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia sede
Bogotá

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Posgrado Interfacultades en Microbiología
Bogotá, D. C.
Noviembre de 2015

Al Señor amor perfecto, por soñarme y permitirme ser quien soy.

A mi Mamá y Yuya quienes son amor, ejemplo y motivación.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor José Usme, quien como docente y director me brindó su confianza absoluta y me permitió tener autonomía en el proceso de formación académica. Porque es verdaderamente satisfactorio ser integrante en su equipo de investigación y es el reflejo del profesional idóneo que debo ser.

A la Docente Clara Bermúdez, quien me acogió en su grupo de investigación y me orientó de la mejor manera durante el desarrollo de mi proyecto de grado.

A Daniela y Diego, los mejores compañeros y amigos del laboratorio, por ser mi soporte en los éxitos y fracasos durante las arduas pero agradables labores diarias y porque me apoyaron completamente en momentos importantes de mi proyecto de grado.

Al Grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud, por permitirme desempeñarme a nivel profesional en algo que me apasiona en la vida.

A la Docente Martha Fontanilla, quien me permitió aprender a valorar lo gratificante que puede ser la labor docente.

A Soco, por brindarme su amistad y consejos únicos en los contratiempos y decisiones difíciles durante mi permanencia en la maestría.

A Saray y Francly, por su amistad incondicional, consejos y risas.

A todos los integrantes de mi Familia, en quienes siempre encuentro el sentido y el aliento para afrontar el camino.

A las demás personas que no alcance a nombrar, pero que son igualmente valiosas, por su amistad y consejos.

A COLCIENCIAS, por la financiación del proyecto “Búsqueda de determinantes de virulencia en el genoma del virus dengue y su potencial contribución a la patogénesis del dengue grave durante las dos últimas epidemias en Colombia” del cual se enmarca el presente proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS	10
1. RESUMEN.....	11
1. ABSTRACT	12
2. INTRODUCCIÓN	13
2.1 Epidemiología del dengue.....	13
2.2 Estructura genética.....	14
2.3 Ciclo replicativo.....	15
2.4 Clasificación genética de DENV	17
2.5 Factores del hospedero involucrados en la patogénesis.....	18
2.6 Determinantes genéticos de virulencia	19
3. ANTECEDENTES	24
4. PROBLEMA.....	28
5. OBJETIVOS.....	30
5.1 Objetivo general	30
5.2 Objetivos específicos	30
6. METODOLOGÍA	31
6.1 Cultivo de células.....	31
6.2 Selección de las muestras	31
6.3 Aislamiento viral.....	31
6.4 Extracción de ARN	32
6.5 Síntesis de cDNA.....	32
6.7 Amplificación del gen de la envoltura viral	33
6.8 Amplificación de la región 5' UTR.....	33
6.9 Purificación de productos de PCR	35

6.10 Secuenciación automática usando nucleótidos terminadores	35
6.11 Análisis filogenético	36
6.12 Análisis de determinantes genéticos de virulencia.....	37
6.13 Predicción <i>in silico</i> de estructuras secundarias de ARN	37
6.14 Titulación mediante ensayo de placa.....	38
6.15 Curvas de crecimiento de un paso.....	39
6.16 Análisis estadístico.....	39
7. RESULTADOS.....	40
7.1 Selección de muestras clínicas	40
7.2. Caracterización molecular del gen de la envoltura de cepas de DENV-2 presentes en Colombia	42
7.3 Presencia en Colombia de diferentes linajes del genotipo Asiático/Americano de DENV-2.	43
7.4. Evidencia de selección purificadora a nivel de codones en el gen de la envoltura de DENV-2.	50
7.5. Amplificación y secuenciación de la región 5'UTR de DENV-2.....	52
7.6 Las estructuras secundarias de la región 5'UTR y del gen <i>E</i> de DENV-2 no se relacionan con la severidad de la enfermedad.	53
7.7 Las características fenotípicas <i>in vitro</i> de las cepas de DENV-2 no indican cambios asociados con la severidad de la enfermedad.....	59
8. DISCUSIÓN.....	64
8. 1 Contribución del genotipo viral a la patogénesis	66
8.2 Evidencia de selección purificadora y de sustituciones compensatorias putativas en regiones genómicas codificantes y no codificantes.	67
8.3 Caracterización fenotípica <i>in vitro</i> y su relación con los determinantes genéticos de virulencia.....	70
8. CONCLUSIONES	72
9. PERSPECTIVAS.....	73
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Determinantes genéticos de virulencia en DENV-2	Pág. 22
Tabla 2. Incidencia de dengue, dengue grave y mortalidad por dengue en Colombia durante el periodo 2007-2015.	29
Tabla 3. Listado de cepas de DENV-2 incluidas en el estudio y características clínicas asociadas.	41
Tabla 4. Listado de codones seleccionados negativamente.	49
Tabla 5. Estabilidad termodinámica de los elementos estructurales presentes en el 5'UTR de DENV-2	54
Tabla 6. Estabilidad termodinámica de los elementos estructurales presentes en el gen de la envoltura de DENV-2.	56
Tabla 7. Validación de SLA en Rfam	57
Tabla 8. Correlación entre sustituciones compensatorias putativas o apareamientos no canónicos y codones seleccionados negativamente.	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo intrínseco de replicación de DENV.	Pág. 16
Figura 2. Inmunopotenciación dependiente de anticuerpos (ADE).	19
Figura 3. Determinantes genéticos de virulencia en el genoma viral.	19
Figura 4. Proteína de la envoltura.	21
Figura 5. Diseño del ensayo de placa para titulación de DENV-2	38
Figura 6. Imágenes representativas del efecto citopático generado por la infección con DENV-2 en células C6/36.	40
Figura 7. Amplificación del gen <i>E</i> mediante RT-PCR.	42
Figura 8. Ensamblaje parcial del gen <i>E</i> . Imagen representativa de la calidad de los electroferogramas y la profundidad de la secuenciación.	43
Figura 9. Variabilidad genética en el gen <i>E</i> de cepas colombianas de DENV-2.	44
Figura 10. Variabilidad en los aminoácidos de la proteína de envoltura de cepas colombianas de DENV-2.	45
Figura 11. Reconstrucción filogenética del gen <i>E</i> de DENV-2, mediante Inferencia Bayesiana.	47
Figura 12. Reconstrucción filogenética del gen <i>E</i> de DENV-2, mediante el método de distancia NJ.	48
Figura 13. Amplificación de la región 5' UTR.	51
Figura 14. Electroferogramas representativos de la región 5' UTR.	52
Figura 15. Alineamiento y estructuras secundarias de la región 5' UTR.	53
Figura 16. Alineamiento en el gen <i>E</i> .	54
Figura 17. Estructuras secundarias en el gen <i>E</i> .	55
Figura 18. Ubicación de las cuatro estructuras secundarias en el gen de la envoltura.	56
Figura 19. Titulación mediante ensayo de placa a las 6 hpi	58
Figura 20. Titulación mediante ensayo de placa a las 12 hpi	59
Figura 21. Titulación mediante ensayo de placas a las 24 hpi	59

Figura 22. Titulación mediante ensayo de placa a las 36 hpi	60
Figura 23. Titulación mediante ensayo de placa a las 48 hpi	60
Figura 24. Curvas de crecimiento en cepas asociadas a dengue grave.	61
Figura 25. Curvas de crecimiento en cepas asociadas a dengue sin signos de alarma.	62
Figura 26. Comparación curvas de crecimiento según clasificación clínica	63
Figura 27. Determinantes genéticos de virulencia y características fenotípicas <i>in vitro</i> .	64

ABREVIATURAS

ADE	Inmunopotenciación dependiente de anticuerpos.
ARN	Ácido ribonucleico.
DENV	Virus dengue.
DENV-2	Virus dengue tipo 2.
hpi	Horas post infección
ml	Mililitros.
μl	Microlitros.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
pb	Pares de bases.
RdRP	ARN polimerasa dependiente ARN
UTR	Región no traducida.

1. RESUMEN

El virus dengue (DENV) es el agente etiológico del dengue, una de las enfermedades más importantes transmitidas por vector y es según la Organización Mundial de la Salud (OMS). Anualmente DENV afecta 50 - 200 millones de personas en el mundo y en Colombia se estima que casi 24 millones son susceptibles a la infección con el virus. Durante el periodo 2013 – 2015 se notificaron 669,631 casos de dengue en el país.

Clínicamente, la enfermedad se clasifica como dengue (con y sin signos de alarma) y dengue grave el cual puede ser fatal. Aunque el principal factor asociado a la severidad es la ocurrencia de infecciones secundarias por serotipos heterólogos llevando a una potenciación mediada por anticuerpos, un número creciente de estudios sugiere la existencia de determinantes genéticos de virulencia en diferentes regiones del genoma viral y asociados a la severidad de la enfermedad.

El objetivo fue identificar potenciales determinantes genéticos de virulencia asociados en cambios fenotípicos *in vitro* en cepas de DENV-2 y en el desarrollo de los diferentes cuadros clínicos de la enfermedad.

La estrategia metodológica desarrollada en esta investigación incluyó selección de muestras de suero serotipificadas como DENV-2 y de pacientes con dengue y dengue grave. Posteriormente, se realizó aislamiento viral, amplificación y secuenciación del gen de la envoltura y de la región 5' UTR. Por medio de alineamiento de secuencias y análisis filogenético se determinó el genotipo viral y las relaciones evolutivas entre cepas. Se identificaron estructuras secundarias conservadas de ARN mediante el análisis *in silico*. Finalmente fueron observadas infecciones *in vitro* por medio de curvas de crecimiento a diferentes tiempos post-infección y tituladas mediante ensayos de placa.

Todas las cepas analizadas pertenecen al genotipo Asiático/Americano y se ubicaron en dos linajes genéticos. Las mismas estructuras secundarias conservadas estuvieron presentes en todas las cepas. En las regiones genómicas analizadas no se identificaron potenciales determinantes genéticos de virulencia y la caracterización *in vitro* no revela que existan diferencias significativas entre las cepas asociadas a los diferentes cuadros clínicos.

Se concluye que no es posible establecer ninguna asociación entre determinantes genéticos de virulencia con las características *in vitro* de las cepas, ni con los distintos cuadros clínicos de la enfermedad, aunque se identifican posibles estructuras secundarias con algún tipo de funcionalidad potencial no conocido hasta el momento.

Palabras clave: virus dengue, virulencia, patogénesis, dengue grave, técnicas *in vitro*.

1. ABSTRACT

The Dengue Virus (DENV) is the Etiologic Agent of dengue, one of the most important vector-borne diseases, according to the World Health Organization (OMS). Annually the virus affects around 50-200 million people in the world and in Colombia it is estimated that nearly 24 million are susceptible to infection with the virus. During the period 2013 - 2015 669,631 cases of dengue fever were reported in the country.

Clinically, the disease can be classified as dengue (with and without warning signs) and severe dengue which can be fatal. Although the main factor associated with the severity is the occurrence of secondary infections by heterologous serotypes leading to antibody-mediated enhancement (ADE), a growing number of studies suggest the existence of genetic determinants of virulence in different regions of the viral genome of DENV, possibly associated with the development of different clinical presentation.

The objective of the research was to identify potential determinants of genetic virulence associated with phenotypic changes *in vitro* in strains of DENV-2 and the development of different clinical presentation of the disease.

The methodological strategy developed in this research includes selection of serum samples serotyped as DENV-2 and patients with dengue and severe dengue. Subsequently, viral isolation, amplification and sequencing of the 5'UTR and envelope gene was performed. Through sequence alignment and phylogenetic analysis on viral genotype and the evolutionary relationships among strains it was determined. Conserved RNA secondary structures using *in silico* analysis identified. We were finally observed *in vitro* infections through growth curves at different times post-infection and titrated by plaque assays.

All the strains tested belong to the Asian/American genotype and were placed into two genetic lineages. The same conserved secondary structures were present in all strains. In the genomic regions analyzed potential genetic determinants of virulence were not identified and *in vitro* characterization does not reveal any significant differences between strains associated with different clinical presentations.

In conclusion, is not possible to establish any association between genetic determinants of virulence with the phenotypic characteristics of the strains, with different clinical presentations of the disease, even though possible secondary structures are identified with some kind of potential functionality not known until now.

Keywords: dengue virus, virulence, pathogenesis, severe dengue, *In Vitro* Techniques.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Epidemiología del dengue

El virus del dengue (DENV) es el agente etiológico de la enfermedad conocida como dengue; en el año 2012, la Organización Mundial de la Salud (OMS) determinó que el dengue, es una de las enfermedades más importantes transmitidas por vectores (1, 2). En las regiones de clima tropical y subtropical donde habita el vector, residen alrededor de 3600 millones de personas susceptibles de infectarse con el DENV. Anualmente, entre 50 y 200 millones de personas sufren la infección a nivel mundial, de las cuales 500,000 progresan a dengue grave y más de 20,000 casos llegan a ser fatales (2, 3). A nivel epidemiológico, la enfermedad en Las Américas se caracteriza por un patrón cíclico, con picos epidémicos cada tres a cinco años (4). Durante la última década, Colombia ha estado entre los 10 países que reportan el mayor número de casos de dengue a nivel mundial y en la región de Las Américas y el Caribe ha ocupado el tercer lugar (1). Debido a la circulación endémica del vector *Aedes aegypti* en el 75% del territorio nacional, se estima que alrededor de 24 millones de personas se encuentran en riesgo de infección por DENV (5). Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS/PAHO), durante el periodo comprendido entre 2007 y 2015, en Colombia se notificaron 669.631 casos de dengue, 35.804 casos de dengue grave y 814 muertes (6-8).

En el año 2009, la OMS, estableció un sistema de clasificación del dengue basado en el grado de severidad de la enfermedad; cuyas categorías son el dengue (con y sin signos de alarma) y el dengue grave. El dengue sin signos de alarma se caracteriza por una enfermedad febril aguda en la que se presentan dos o más de los siguientes signos y síntomas: náuseas, emesis, erupción cutánea, mialgia, artralgia, leucopenia y prueba torniquete positiva; el dengue con signos de alarma se caracteriza por la presencia de dolor abdominal intenso, emesis persistente, sangrado de mucosas, letargo, hepatomegalia, trombocitopenia y aumento del hematocrito; finalmente, el

dengue grave se presenta a partir del cuarto o quinto día de la enfermedad y se caracteriza por la extravasación de plasma, lo cual puede ocasionar choque hipovolémico por fuga de líquidos al espacio intersticial, insuficiencia respiratoria, sangrado grave y/o deterioro de órganos (9).

2.2 Estructura genética

El (DENV) pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*; con un diámetro de 40-50 nm, la membrana lipídica envuelve la cápside icosaédrica y su genoma es una hebra de ARN de polaridad positiva con una longitud aproximada de 11 kb; el cual posee regiones no traducidas en los extremos 5' y 3' (5'UTR y 3'UTR, respectivamente) y un marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína de aproximadamente 3400 aminoácidos (10), la cual es posteriormente procesada por proteasas celulares para dar origen a las proteínas estructurales [Cápside (C), pre-Membrana/Membrana (prM/M) y Envoltura (E)] y no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (11, 12).

El genoma ARN del DENV, principalmente en las regiones 5' y 3'UTR, posee estructuras secundarias conservadas, las cuales han sido bien caracterizadas en relación con su presencia y función (13). La región 5'UTR tiene una longitud entre 94 y 101 nucleótidos, y presenta dos elementos estructurales conservados en la familia *Flaviviridae*, denominados *Stem-Loop A* (SLA) y *Stem-Loop B* (SLB), separados por una secuencia homopolimérica de uracilo (14, 15). Se ha demostrado un papel crítico del elemento SLA en la traducción y en la síntesis del ARN viral mediante su interacción con factores celulares (proteína La) y virales (ARN Polimerasa dependiente de ARN (RdRP)) (16, 17). Por otro lado, más allá de su estructura primaria, se ha demostrado la importancia del elemento SLB en la síntesis del ARN y producción viral en células del insecto vector (18) .

La región 3' UTR tiene una longitud aproximada de 450 nucleótidos y presenta tres dominios principales: el dominio I o región variable (VR), con un tamaño

de 50 – 120 nucleótidos y conformado por las estructuras SLB1, SLB2, SLB3, SLB4 y SLB5; el dominio II contiene las estructuras conservadas DB1 y DB2, importantes potenciadores de la traducción al contienen varios nucleótidos de adenina que reclutan proteínas de unión a poli-A. El dominio III, es el más conservado y contiene los elementos denominados 3'CS, 3'UAR y 3'SL (14). Los elementos 3'CS y 3'UAR son críticos para la circularización del genoma por su complementariedad con los elementos 5'CS y 5'UAR, ubicados en la región 5' del genoma viral (19, 20). El elemento estructural 3'SL compuesto por una estructura de 79 nucleótidos, es altamente conservado entre los flavivirus y está involucrado tanto en la traducción, como en la síntesis del ARN viral (21, 22).

En la región codificante del genoma viral, estructuras secundarias han sido identificadas exclusivamente para el gen de la Cápside; allí se encuentran algunos elementos estructurales como cHP y CCR1, importantes en el reconocimiento del codón de inicio y el ensamblaje viral (23, 24), así como las secuencias 5'UAR, 5'CS y 5'DAR, importantes para la circularización y estabilización del genoma durante la replicación viral (14) .

2.3 Ciclo replicativo

El ciclo de vida extrínseco del DENV, comienza cuando el mosquito hembra del género *Aedes* (en América, *Aedes aegypti*), ingiere la sangre de un individuo infectado; el virus se replica en las células epiteliales de su intestino medio y luego las partículas virales son liberadas al hemocele y a las glándulas salivares; finalmente, el mosquito infectado, pica a otro individuo inoculándole el virus (25). En el ciclo de vida intrínseco (Figura 1) se plantea que el virus tiene tropismo por células del linaje monocito - macrófago, células dendríticas, hepatocitos, linfocitos y células endoteliales (26). La etapa de adsorción y entrada se instaura por la interacción del dominio III la proteína E con los receptores celulares parcialmente caracterizados, tales como heparán sulfato, el receptor CD14, manosa, el receptor de la laminina de alta afinidad y DC-SIGN (27). Estos receptores promueven la endocitosis en vesículas recubiertas

con clatrina, que se transforman en endosoma temprano, seguido del endosoma tardío que al estar fusionado con un lisosoma favorece la disminución del pH que lleva a la formación de homotrimeros de proteína E. estos cambios conformacionales permiten la fusión de la envoltura viral con el endosoma, para liberar la nucleocápside al citoplasma donde es degradada por proteasas celulares exponiendo el genoma viral (28).

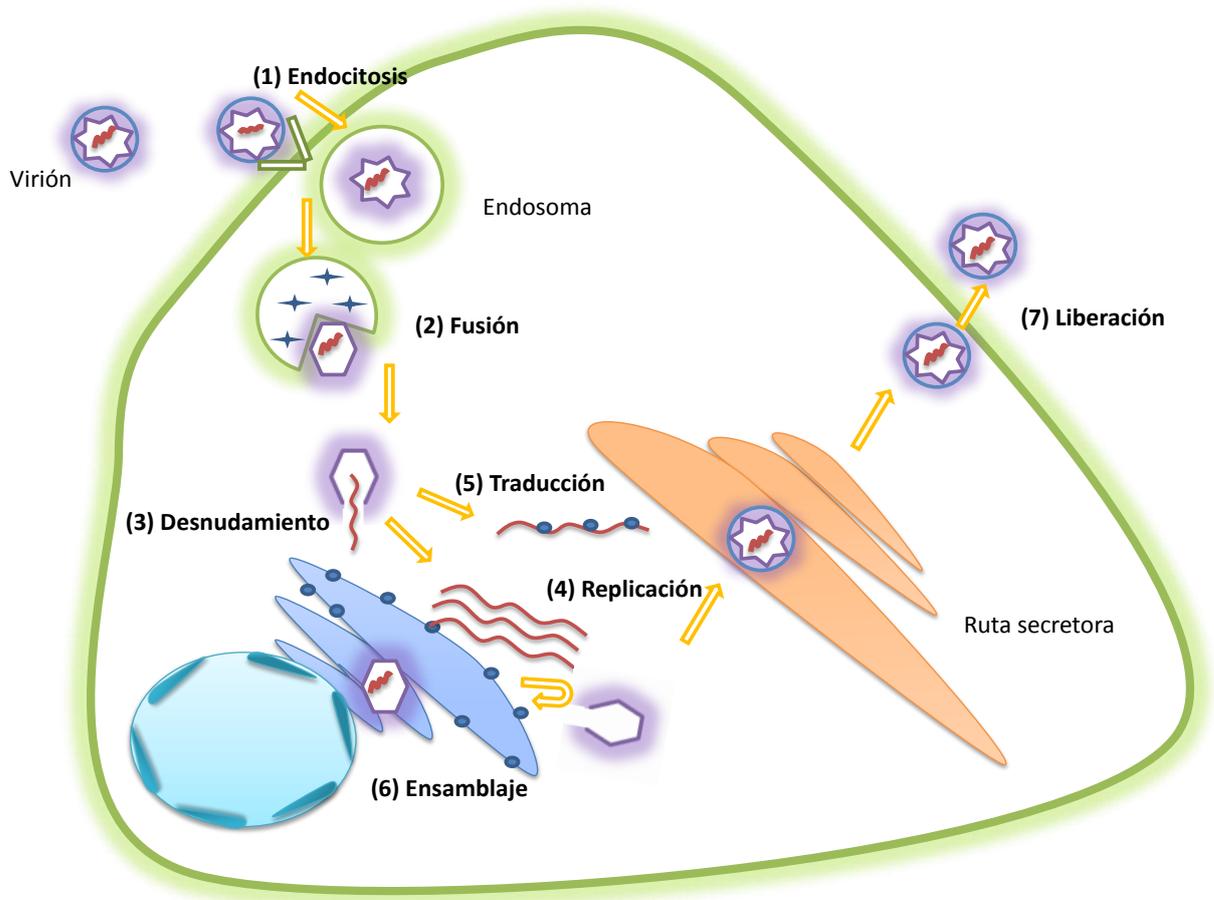


Figura 1. Ciclo intrínseco de replicación de DENV. El proceso general de replicación incluye: 1) adsorción y endocitosis del virión en la célula, 2) fusión de la envoltura viral - endosoma, 3) desnudamiento o eliminación de la cubierta proteica, 4) replicación del genoma viral, 5) traducción y síntesis de proteínas, 6) ensamblaje y maduración de viriones en la ruta secretora y 7) liberación de viriones al espacio extracelular.

Durante el proceso de replicación debe asegurarse la estabilidad del ARN, las hebras de polaridad positiva del genoma se circularizan e interactúan en las regiones 5' y 3' UTR mediante la unión de secuencias complementarias denominadas 5' UAR, CS y 3' UAR; lo anterior permite que la estructura tallo-bucle A (SLA) presente en los primeros 70 nucleótidos del extremo 5' UTR sea reconocida por la ARN polimerasa dependiente de ARN y se realice la síntesis de cadenas de ARN de polaridad negativa (29); a su vez estas cadenas sirven como moldes para la síntesis de nuevas cadenas de ARN de polaridad positiva, para ser traducidas en los ribosomas asociados al retículo endoplasmático rugoso son traducidas dando lugar a la formación de la poliproteína, la cual es procesada por proteasas celulares y virales para originar las proteínas virales (29). Durante el ensamblaje viral, el ARN genómico junto con la proteína C, forman la nucleocápside, luego la partícula viral sigue la ruta secretora; en el retículo endoplasmático rugoso la proteína prM/M, se une con el dominio II de la proteína de envoltura formando heterodímeros, luego en el aparato de Golgi, la proteína de envoltura cambia conformacionalmente formando homodímeros y se fusiona con la membrana celular, liberando el virión mediante exocitosis al espacio extracelular, la proteasa celular furina escinde el péptido pr de la proteína M (29).

2. 4 Clasificación genética de DENV

El DENV ha sido clasificado en 4 serotipos (DENV-1 a DENV-4) según sus propiedades antigénicas (30); además existe una amplia diversidad genética intra-serotipo, que mediante análisis filogenéticos ha permitido evidenciar grupos monofiléticos denominados genotipos (31, 32). A su vez, la variabilidad al interior de cada genotipo ha permitido la identificación de linajes genéticos o clados (33). Hasta la fecha, se han definido 5, 6, 5 y 4 genotipos para DENV-1 a DENV-4 respectivamente (34-38). Específicamente para DENV-2, los genotipos establecidos son: I (Asiático II), II, IIIa (Asiático I), IIIb (Americano/Asiático), IV (Cosmopolita), V (Americano) y genotipo selvático (31, 35). Aunque es común que en una región geográfica determinada solo circule un genotipo de DENV, se ha evidenciado que la introducción de un nuevo

genotipo puede llevar a la extinción del genotipo local y a cambios drásticos en la epidemiología de la enfermedad (39).

2.5 Factores del hospedero involucrados en la patogénesis

En la actualidad no se ha esclarecido completamente el mecanismo que causa el desarrollo de dengue grave. El principal factor asociado a la severidad de la enfermedad es la respuesta inmune en infecciones secundarias que resulta en inmunopotenciación dependiente de anticuerpos (ADE) (Figura 2). Durante una primera infección se generan anticuerpos homotípicos tipo IgG contra el serotipo infectante y anticuerpos heterotípicos no neutralizantes; en una segunda infección con otro serotipo, los anticuerpos heterotípicos forman complejos inmunológicos con los antígenos virales (reacción cruzada) y facilitan la internalización del virus, a través de receptores Fc- γ presentes en la membrana de las células mononucleares – fagocíticas, lo que facilita la replicación viral (40). Otros factores relacionados con el hospedero humano, que podrían determinar la severidad de la enfermedad incluyen la edad (siendo los niños más propensos a desarrollar dengue grave, por una mayor permeabilidad vascular) (41); la raza negra es menos propensa a desarrollar dengue grave (42), la presencia de determinados alelos del antígeno leucocitario humano (HLA) HLA B*52, A*0207 y A*31 (43) y la presencia de enfermedades crónicas de base como hipertensión y diabetes (44).

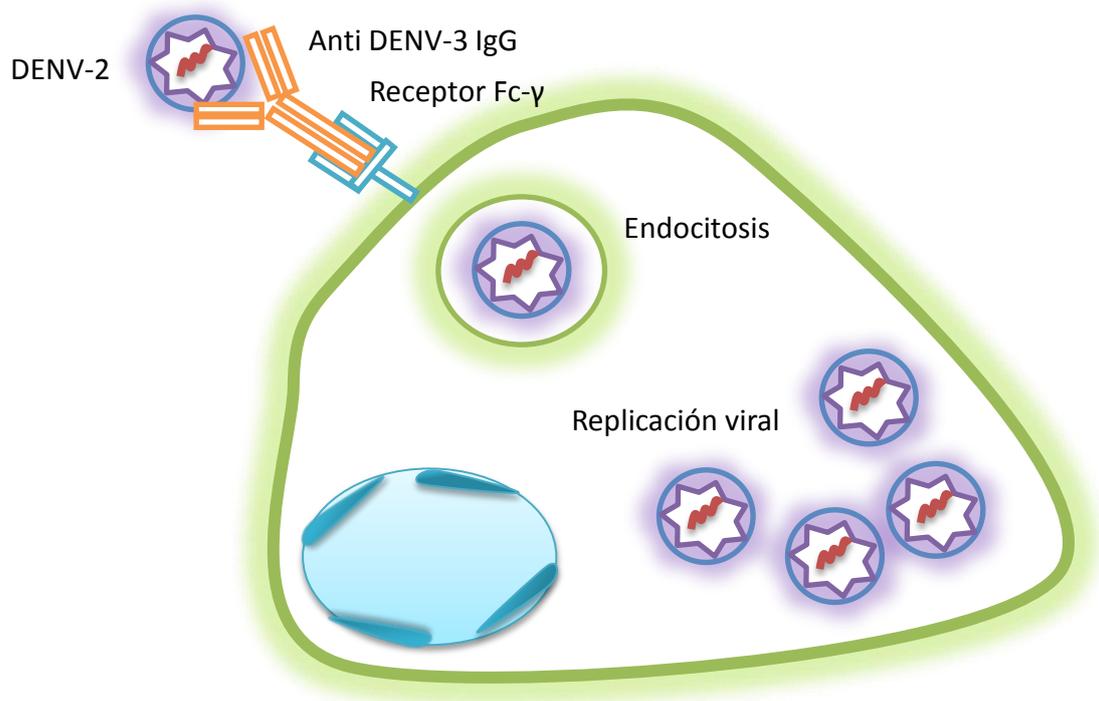


Figura 2. Inmunopotenciación dependiente de anticuerpos (ADE) Los anticuerpos heterotípicos permiten la endocitosis del virión el cual se replica en la célula.

2.6 Determinantes genéticos de virulencia

El desarrollo de dengue grave también ha sido asociado a la virulencia del agente infeccioso, mediada por sus características genéticas, biológicas, químicas y estructurales (45). En la secuencia genómica de DENV algunas sustituciones nucleotídicas en regiones codificantes y no codificantes, se consideran determinantes genéticos de virulencia, pues se han asociado a cambios fenotípicos tales como el aumento en la capacidad replicativa y producción viral (46) (Figura 3).



Figura 3. Determinantes genéticos de virulencia en el genoma viral. En la totalidad del genoma puede haber la presencia de determinantes genéticos de virulencia representados por asteriscos naranjas.

Asimismo, se ha encontrado que algunos genotipos de DENV presentan mayor virulencia y consecuentemente exhiben diferentes características fenotípicas; unos presentan mayor tasa de transmisión por lo que su circulación es elevada en ciertas regiones geográficas y otros se han asociado con el desarrollo de dengue grave (47).

La identificación de determinantes genéticos de virulencia, se puede realizar desde la perspectiva computacional mediante el análisis de secuencias completas o parciales del genoma viral y localización de secuencias con presencia de sustituciones de nucleótidos para posteriores ensayos de mutación sitio-dirigida. Las mutaciones son frecuentes en virus con genomas de ARN porque la ARN polimerasa no posee actividad correctora, lo que conlleva a defectos genómicos que afectan la viabilidad o aumentan la virulencia de las cepas virales (48). En la evaluación de evolución molecular realizados en DENV-2, se estima una tasa de sustitución promedio de 6×10^{-4} la cual se correlaciona con las tasas de sustitución de los demás genotipos de DENV; sin embargo el genotipo Asiático/Americano presenta mayores tasas de sustitución, argumentadas por una alta transmisión viral, luego de la introducción de cepas del Sureste Asiático a la región de las Américas (49).

Por otro lado, uno de los genes más estudiados es el gen de la envoltura, pues muestra mayor diversidad en la secuencia, esta variabilidad en la secuencia se asocia con selección positiva para cepas pertenecientes al genotipo Cosmopolita y Asiático II, sin embargo las bajas tasas de sustituciones no sinónimas indican que el virus presenta una mayor presión purificadora (35). Además las sustituciones no sinónimas en el gen de la envoltura asociadas con virulencia no siempre están presentes en las cepas (50) y se ha encontrado poca variabilidad en la secuencia completa del genoma viral (51).

Este gen codifica para la proteína de envoltura de aproximadamente 53 kDa (Figura 4), su organización estructural forma homodímeros compuestos por 3 dímeros que se anclan a la proteína de membrana para formar la envoltura

viral. La proteína presenta un ectodominio soluble conformado por los aminoácidos 1 - 394 y un dominio insoluble anclado a la membrana conformado por los aminoácidos 395 – 495; a su vez esta subdividido en 5 dominios principales: el dominio I es estructural, el dominio II es fundamental durante la dimerización de la proteína en la ruta secretora el dominio III, que se divide en un subdominio juxtamembrana y otro transmembrana (52, 53), se encuentra involucrado en la unión a diferentes receptores celulares (54) y es un importante blanco de anticuerpos neutralizantes del sistema inmune del hospedero (55, 56).

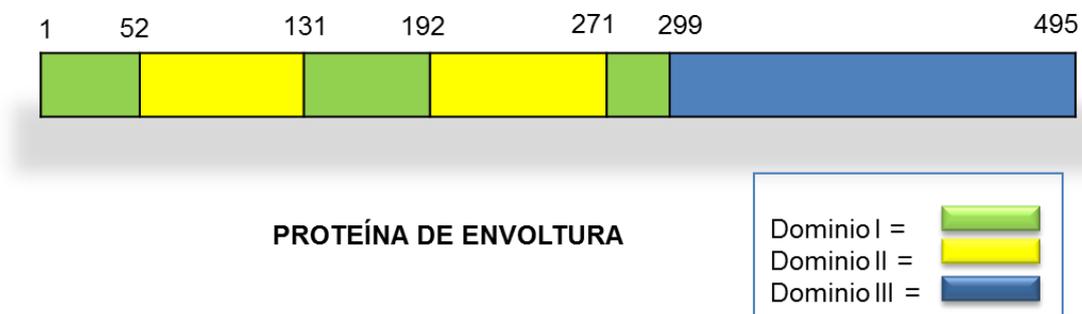


Figura 4. Proteína de la envoltura. Posiciones aminoacídicas de los dominios estructurales.

En los genes de DENV-2 se han encontrado sustituciones no sinónimas que se consideran determinantes genéticos de virulencia (Tabla 1) (57-61).

Tabla 1 .Determinantes genéticos de virulencia en DENV-2

Gen	Sustitución no sinónima
pr/M	Ile16Arg Glu28Lys Thr81Ala
E	Glu71Asp Asp390Asn Asp390His Glu126Lys Lys128Glu
NS1	Asp278Gly
NS2A	Ile136Met Asn139Asp
NS3	Met13Ile Ala118Thr
NS4B	Ser17His
NS5	Thr337Met Asn645As Ser676Arg Lys800Ser

Adicionalmente, se considera que las cepas más virulentas son aquellas con mayor capacidad replicativa (62, 63) ; es por ello que la evaluación de la capacidad replicativa del DENV se realiza mediante la infección en modelos *in vitro* e *in vivo*. Con estos análisis, es posible inferir acerca de las estrategia de

“fitness viral” (capacidad replicativa del virus en condiciones ambientales específicas) que desarrolla DENV durante la infección (48) .

Las líneas celulares permiten valorar *in vitro* el efecto citopático y los niveles de replicación viral (32, 46, 62) . Usualmente se realizan ensayos de plaqueo en los cuales se infectan monocapas celulares de mamífero con cepas de DENV y se observa la formación de placas (zonas de lisis celular); la líneas celulares Vero (derivadas de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*), BHK-21 y LLC-MK2 son las más utilizadas. En este tipo de ensayo las cepas del DENV no presentan la misma eficiencia replicativa debido a que deben adaptarse a las características de cada línea celular (47). También se emplean líneas celulares de origen humano pertenecientes al sistema fagocítico mononuclear porque simulan la infección natural, el inconveniente al usar estas líneas celulares surge por la necesidad de garantizar que provengan de individuos sin infecciones previas por DENV (62). Para evitar las dificultades mencionadas, se recomienda la implementación de las técnicas de citometría de flujo para determinar las poblaciones celulares infectadas y de PCR con transcripción reversa en tiempo real (RT-qPCR) que determina el número de genomas virales presentes en la muestra (46, 47).

También es posible realizar infecciones *in vivo* de mosquitos hembras *Aedes aegypti* con DENV, esta se realiza mediante inoculación intratorácica y a través de su alimentación con sangre infectada, luego se determina la carga viral en los diferentes tejidos y el tiempo de diseminación del virus hacia las glándulas salivares y las cepas de DENV que se disemina en menos de 7 días se consideran más virulentas (64). En modelos animales es complicado evaluar la virulencia, ya que en mamíferos no se presentan manifestaciones clínicas, ni tampoco producen anticuerpos específicos contra los diversos serotipos de DENV. El modelo animal usado comúnmente es el murino en el cual se puede evaluar neurovirulencia con cepas neuroadaptadas y mediante murinos NOD-*scid IL2 γ* modificados genéticamente con células hematopoyéticas humanas, se evidencia el desarrollo de la sintomatología característica en humanos, lo cual permite evaluar la virulencia de las cepas de DENV (62, 65).

3. ANTECEDENTES

Se ha descrito que el DENV-2 en una primoinfección puede ocasionar la muerte y que la infección por los serotipos DENV-2 y DENV-3 puede desencadenar en dengue grave con mayor probabilidad (66). Para contextualizar la razón por la cual se ha catalogado el DENV-2 como un serotipo virulento, se debe hacer un recuento histórico; comenzando con la epidemia de dengue que se produjo en la región del Pacífico Sur en 1972, la cual se caracterizó por dengue grave y se determinó que fue causada exclusivamente por DENV-2 (67, 68). En 1974, en la isla del Reino de Tonga, se evidenció que mediante la primoinfección con DENV-2 no se presentó dengue grave en los afectados; pero un año después ocurrió un brote por DENV-1, el cual se asoció con dengue grave, por lo tanto se propuso que la cepa de DENV-1 fue más virulenta que la cepa de DENV-2. En Tailandia se comprobó que DENV-1 y DENV-3 pueden ocasionar dengue grave tanto en infección primaria como en secundaria, mientras que DENV-2 y DENV-4 ocasionan en su mayoría dengue grave durante infecciones secundarias (69). En América, la primera epidemia en que se observaron manifestaciones clínicas de dengue grave ocurrió en 1981 en Cuba, ocasionada por un genotipo de DENV-2 procedente del sudeste Asiático que al ser más virulento desplazó al genotipo Americano, el cual se caracterizaba por producir manifestaciones clínicas leves (39).

Rico-Hesse, *et al.*, generaron cepas recombinantes al insertar diferentes sustituciones en la posición 390 en una cepa de DENV-2 proveniente del Sudeste Asiático, que fueron cultivadas en monocitos humanos. Los resultados demostraron que la sustitución Asp390Asn en la proteína de envoltura se relaciona con la disminución en la capacidad de replicación del virus, situación directamente implicada en manifestaciones leves de la enfermedad, que es una característica atribuida al genotipo Americano (70). Adicionalmente, Leitmeyer, *et al.*, sugirieron la existencia de otros posibles determinantes de virulencia en

la región 5'UTR (nucleótidos 68-80) y en la región 3'UTR (primeros 300 nucleótidos) (58).

En 2003, Bray, *et al.*, generaron virus quiméricos de DENV-2 mediante la modificación de la cepa 16681 proveniente del Sureste Asiático por inserción de secuencias de la cepa K0008 del Sureste Asiático y secuencias de la cepa IQT2913 genotipo Americano; se incluyó la sustitución en la posición E390 y sustituciones en las región 5' UTR. Se determinó que los virus quiméricos con una mutación se replican a tasas similares, en monocitos y células dendríticas de origen humano, según lo estimado mediante ensayos de placa y de RT-qPCR; sin embargo, al presentar mutaciones en las tres regiones, se reduce la replicación, lo que constata menor virulencia del genotipo Americano (71). Así mismo la presencia de sustituciones en la proteína de envoltura en cepas de DENV-2 puede desencadenar mayor gravedad en la enfermedad, tal como ocurre con las sustituciones Glu71Asp y Glu126Lys implicadas en la neurovirulencia de murinos (59).

En el año 2010 Salazar, *et al.*, evaluaron la capacidad de los genotipos Americano y Asiático/Americano para causar infección en el mosquito *Aedes aegypti*; encontrándose que el genotipo Americano/Asiático fue mucho más eficiente en la infección del vector. Posteriormente se compararon las secuencias del gen de la envoltura y de la región de ambos genotipos. En la proteína de envoltura se encontraron 14 sustituciones de las cuales 4 fueron no sinónimas; las sustituciones observadas más relevantes fueron la sustitución Asn390Asp y la sustitución Glu71Asp (72) la cual previamente se ha asociado con mutantes de escape en la neutralización por anticuerpos (73).

En la valoración de características fenotípicas *in vitro*, Srikiatkachorn, *et al.*, realizaron la detección de ARN de DENV durante el periodo febril en muestras de sangre periférica, específicamente en plasma, monocitos, linfocitos T y linfocitos B. Se encontró mayores niveles de ARN viral en plasma y a nivel celular en linfocitos B; así mismo se halló niveles superiores de ARN viral durante la infección secundaria en los monocitos y también los niveles de ARN

viral fueron mayores en plasma y monocitos provenientes de pacientes que presentaron dengue grave, al compararlos con pacientes los niveles de ARN viral en pacientes con dengue (74).

Wang, *et al.*, en 2003 y 2006, realizaron dos estudios, cuyo objetivo fue determinar los niveles de ARN viral mediante RT- qPCR en sueros de pacientes con diferentes cuadros de gravedad de la enfermedad. En el primero se determinaron los niveles de ARN viral de DENV-3 en pacientes que presentaron dengue y dengue grave; los resultados mostraron que después del periodo febril los pacientes con dengue grave continúan teniendo niveles altos de ARN viral, mientras que los niveles de ARN viral eran casi indetectables en los pacientes con dengue sin signos de alarma (75). En el segundo estudio se determinaron los niveles de ARN viral de DENV-2, en sueros de pacientes; los resultados fueron concordantes con el estudio previo, ya que existían niveles superiores de ARN viral en pacientes que presentaron dengue grave durante el periodo de desaparición de la fiebre; los anteriores hallazgos indican una relación directa entre la carga viral y la gravedad de la enfermedad (76).

A través de ensayos de placa y citometría de flujo, Camacho García , *et al.*, evaluaron la cinética replicativa de cinco cepas de DENV-2 causantes de dengue y dengue grave, la cepa 16681 que ocasionó dengue grave, mostró mayores títulos virales y mayor porcentaje de células fluorescentes con respecto a las demás cepas. Por otro lado se evaluó el tamaño de la placa encontrándose en la mayoría de las cepas un fenotipo de placas pequeñas, sugiriendo atenuación de las cepas, la cual es condicionada por el número de pases previos en diferentes sistemas celulares de aislamiento. En general las características fenotípicas *in vitro* de las cepas no se correlacionaron con la gravedad de la enfermedad, consecuentemente se planteó la necesidad de analizar las cepas en líneas celulares humanas junto con análisis de variabilidad genética (77).

Por último, Gómez Rangel, *et al.*, plantean una correlación entre el nivel de proteínas virales en suero con el desarrollo de un cuadro clínico más severo; por ello se analizó la producción de la proteína NS1 como determinante de virulencia en cepas de DENV-2 y DENV-3 aisladas de pacientes con dengue y dengue grave. Para DENV-3, el nivel de la proteína NS1 fue mayor en pacientes con dengue. En DENV-2, el nivel de la proteína NS1 fue mayor en los casos de dengue grave, pero sin ser estos últimos valores estadísticamente significativos (78).

4. PROBLEMA

El dengue constituye es un problema de salud pública que afecta las regiones tropicales y subtropicales a nivel mundial. El espectro de la enfermedad incluye manifestaciones clínicas que se clasifican como dengue (con signos de alarma, sin signos de alarma) y dengue grave. En Colombia entre 2007 y 2015 se notificaron 669.631 casos de dengue (79); durante el año 2013 el dengue alcanzó en el nivel de hiperendemia al superar en un 147% los casos reportados durante el mismo periodo el año anterior (80).

Aunque todos los serotipos de DENV han sido asociados al desarrollo de dengue grave, el DENV-2 es descrito como el serotipo con la mayor capacidad de virulencia con respecto a los demás serotipos virales, por lo que se ha relacionado este serotipo con la mayoría de casos de dengue grave (67, 68, 81). En la mayoría de los casos durante una infección secundaria por DENV-2 se presentan cuadros clínicos de dengue grave (63, 76, 82, 83).

El genotipo Asiático/Americano circula en el Colombia desde 1988 lo que coincidió con la aparición de dengue grave (84) y se observa un marcado incremento en la letalidad de los casos (Tabla 2) (79).

A la fecha un número creciente de estudios sugieren la existencia de determinantes genéticos de virulencia en diferentes regiones del genoma viral, *Rico-Hesse et al.* identificaron en el gen de la envoltura la sustitución Asp390Asn en cepas procedentes del Sureste Asiático las cuales mostraron mayor virulencia al ocasionar dengue grave durante su introducción a las Américas (39). Ensayos *in vitro* e *in vivo* han permitido demostrar una mayor capacidad para replicarse del genotipo Asiático/Americano (70, 71, 85). A su vez, la mayor capacidad replicativa podría correlacionarse con niveles mayores de ARN genómico en pacientes con dengue grave después del periodo febril (75, 76).

Tabla 2. Incidencia de dengue, dengue grave y mortalidad por dengue en Colombia durante el periodo 2007-2015.

Año	Dengue	Dengue Grave	Muertes	Letalidad por Dengue Grave
2007	38562	4665	20	0,43
2008	32797	4348	23	0,53
2009	44412	7131	44	0,62
2010	147426	9776	221	2,26
2011	29391	1303	43	3,3
2012	52467	1412	88	6,23
2013	126425	3228	140	4,34
2014	105356	2619	166	6,33
2015	92795	1322	69	5,22

En la actualidad, pocos estudios han permitido la identificación de determinantes genéticos de virulencia mediante la caracterización fenotípica in vitro y molecular para su correlación con la severidad de la enfermedad. Por tanto el presente estudio se plantea como una oportunidad para esclarecer la variabilidad genética de DENV-2, su fitness viral, dinámica epidemiológica y virulencia.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Identificar potenciales determinantes genéticos de virulencia asociados en cambios fenotípicos *in vitro* en cepas de DENV-2 y en el desarrollo de los diferentes cuadros clínicos de la enfermedad.

5.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar la cinética de replicación de las cepas de DENV-2 aisladas de sueros de pacientes con diagnóstico de dengue y dengue grave.
2. Asociar la presencia de potenciales determinantes genéticos de virulencia con las diferencias fenotípicas obtenidas *in vitro* en las cepas de DENV-2 incluidas en el estudio.
3. Correlacionar la presencia de potenciales determinantes genéticos de virulencia en las cepas analizadas de DENV-2 con los distintos cuadros clínicos de la enfermedad.

6. METODOLOGÍA

6.1 Cultivo de células

Las células C6/36, son derivadas de larvas de mosquito *Aedes albopictus*, fueron utilizadas en los intentos de aislamiento y obtención del stock viral necesario para la caracterización *in vitro*, se cultivaron en medio esencial mínimo de Eagle (MEM) suplementado con triptosa fosfato al 5% y suero fetal bovino (FBS) al 10%, e incubadas a 28°C en atmósfera al 95% de humedad relativa y 5% de CO₂. La línea celular BHK-21, derivada de riñón de hámster neonato *Mesocricetus auratus*, utilizada en la obtención de curvas de crecimiento y en la titulación del DENV mediante ensayo de placa, fue mantenida y propagada en MEM suplementado con FBS al 2% y 8%, respectivamente. Estas células fueron incubadas a 37°C en atmósfera al 95% de humedad relativa y 5% de CO₂.

6.2 Selección de las muestras

Se seleccionaron 12 muestras de suero remitidas al Instituto Nacional de Salud como parte del Programa de Vigilancia Viroológica del Dengue a nivel nacional, provenientes de pacientes con dengue y dengue grave según la ficha de notificación obligatoria y clasificación final ajustada del SIVIGILA. Las muestras fueron previamente serotipificadas mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos monoclonales amablemente donados por la Dra. Elizabeth Hunsperger (Centers for Disease Control and Prevention - CDC, Puerto Rico).

6.3 Aislamiento viral

Los sueros fueron diluidos en MEM en proporción 1/20 y una alícuota de 200 µl utilizada para la inoculación de cultivos de células C6/36. La fase de adhesión se llevó a cabo a 28°C durante 1 hora, posteriormente se adicionaron 800 µl de

MEM suplementado con 2% de FBS. Los cultivos se incubaron a 28°C. Los sobrenadantes de los aislamientos fueron colectados después de 9 días de infección o al evidenciar efecto citopático, centrifugados a 5000 rpm por 5 min con el fin de eliminar *debris* celulares y almacenados a -70°C. Todos aquellos sobrenadantes de los intentos de aislamiento viral que no presentaron efecto citopático fueron sometidos a un segundo pasaje en células C6/36.

6.4 Extracción de ARN

Se realizó extracción del ARN viral a partir de los sobrenadantes de cultivo correspondientes al pasaje 1 o pasaje 2, para posteriormente llevar a cabo la amplificación y posterior secuenciación del gen de la envoltura y del extremo 5' UTR. Se utilizó el estuche comercial *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, EEUU), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se mezclaron 140 µl de cada muestra de suero o sobrenadante de cultivo (aislamiento viral) con 560 µl de buffer AVL y "RNA carrier". Luego se adicionaron 500 µl de etanol absoluto y el volumen total se transfirió a una columna basada en silica-gel mediante centrifugación a 8000 rpm. Posteriormente, se realizaron lavados con 500 µl de buffer AW1 y 500 µl de AW2 para eliminar contaminantes residuales mediante centrifugación a 8000 y 13000 rpm, respectivamente. Finalmente, se realizó la elución mediante la adición de 60 µL de buffer AVE a la columna, incubación durante 1 min a temperatura ambiente y centrifugación a 8000 rpm (86). El ARN purificado fue almacenado a -70°C hasta su utilización en ensayos posteriores.

6.5 Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA, se utilizó el estuche *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EEUU), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La mezcla de reacción incluyó entre 100 ng y 1 µg del extracto de ARN, 2 ng de hexámeros aleatorios, 0,4 mM de cada

dNTP, 2 µL de 10X RT buffer, 2 U de la transcriptasa reversa MultiScribe™ y agua libre de nucleasas para un volumen final de 20 µl. Las mezclas de reacción fueron incubadas a 25°C por 10 min; 37°C por 120 min y 85°C por 5 min y almacenadas a -20°C hasta su utilización en ensayos posteriores.

6.7 Amplificación del gen de la envoltura viral

Para la amplificación del gen *E* se utilizaron los oligonucleótidos descritos por Domingo y colaboradores (87) los cuales amplifican un fragmento de 1797 pb. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl. La mezcla de reacción incluyó 5 µl del cDNA previamente obtenido, 0,4 pmoles de cada oligonucleótido, 1,25 U de *Taq* DNA polimerasa (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, EEUU), 0,4 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂ 10 µl de buffer sin Mg⁺⁺ y agua libre de nucleasas para un volumen final de 25 µL. El perfil térmico consistió en un paso de desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, 40 ciclos de 94°C durante 15 segundos para desnaturalización, 54°C durante 30 segundos para la hibridación de oligonucleótidos y 72°C durante 2 minutos para la extensión), seguido de una extensión final a 72°C durante 5 min.

6.8 Amplificación de la región 5' UTR

Se realizó la amplificación de la región 5' UTR empleando el estuche 5'/3' *RACE* (*Rapid amplification of Cdna ends*) de segunda generación (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Mediante el módulo PrimerSelect de la suite Lasergene v8.1 (DNASTAR Inc, Madison, WI, USA), se diseñaron los oligonucleótidos para la síntesis de cDNA y amplificación por PCR, La variabilidad de los oligonucleótidos candidatos fue posteriormente analizada mediante el alineamiento de genomas de DENV-2 representativos del país, de la región de Las Américas y del mundo, a través del software ClustalW (88). Para la síntesis de cDNA se diseñó y utilizó un primer oligonucleótido reverso específico

denominado SP1_DENV2 (5'- CCTTTCTCCTGCCTACCAACGAT-3'), el cual se encuentra ubicado en la región codificante de la proteína de la cápside. Una cola de adeninas se adicionó al cDNA purificado, mediante el uso de la enzima Transferasa Terminal en presencia de dATP e incubación a 37°C durante 20 minutos. Luego, mediante el uso del oligonucleótido denominado Oligod(T)-Anchor Primer (5'-GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTV-3') y con un nuevo oligonucleótido reverso SP2_DENV2(5'-TGTTTCAGCATCCTTCCAATCTC-3'), ubicado corriente arriba de SP1, se llevó a cabo la amplificación de un fragmento de 380 pb que incluye la región y una región parcial del gen C. Se realizó una mezcla que incluyó 5 µL de la reacción de poliadenilación del cDNA, y una concentración final de 0,25 µM del oligonucleótido SP2 y 0,25 µM del oligonucleótido PCR Anchor primer (5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC-3'), 1,25 U de *Taq* DNA polimerasa (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, EEUU) 0,4 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, 5 µl de buffer sin Mg⁺⁺ y agua libre de nucleasas para un volumen final de 50 µl. El perfil térmico consistió en un paso de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C durante 15 segundos para desnaturalización, 50°C durante 30 segundos para la hibridación de oligonucleótidos, 72°C durante 30 segundos para la extensión y 5 minutos de extensión final. Finalmente, se realizó una PCR anidada mediante el uso del PCR Anchor primer y con un nuevo primer reverso SP3_DENV2 5'-TCGTTCCCATCTTTTYAGTATCC-3' ubicado corriente arriba de SP2 se llevó a cabo la amplificación de un fragmento de 300 pb. Se realizó una mezcla que incluyó 0.5 µl del producto amplificado con SP2 y una concentración final de 0,25 mM de SP3, 0,25 mM de 1,25 U de DNA polimerasa, 0,4 mM de cada dNTP y 2 mM de MgCl₂ y 5 µl de buffer sin Mg⁺⁺ para un volumen final de 50 µl. El perfil térmico consistió en un paso de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C durante 15 segundos para desnaturalización, 50°C durante 30 segundos para la hibridación de oligonucleótidos, 72°C durante 30 segundos para la extensión y 5 minutos de extensión final.

6.9 Purificación de productos de PCR

La purificación de amplicones a partir de reacciones de PCR carentes de productos inespecíficos, se realizó por medio del estuche comercial *QIAquick PCR purification kit* (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, EEUU) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se agregaron 5 volúmenes de buffer PB al producto de PCR y la mezcla se transfirió a una columna basada en silica-gel mediante centrifugación a 13000 rpm. Posteriormente, se agregaron 750 µl de buffer PE para eliminar contaminantes residuales mediante centrifugación a 13000 rpm. Finalmente, se realizó la elución mediante la adición de 50 µl de buffer EB a la columna, incubación durante 1 min a temperatura ambiente y centrifugación a 8000 rpm. Los productos purificados fueron almacenados a -20°C hasta su utilización en la secuenciación.

6.10 Secuenciación automática usando nucleótidos terminadores

Para la secuenciación de la región 5' UTR y el gen de la envoltura, se prepararon mezclas de reacción que incluyeron 10 ng de cada producto de PCR, 2 µl de *BigDye Terminator Cycle Sequencing v 3.1* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EEUU), 3.2 pmol de ocho oligonucleótidos descritos por Domingo y colaboradores (87) y 1.0 µl de *5X Sequencing buffer*, en un volumen final de 10 µl. El perfil térmico consistió en una desnaturalización inicial a 96°C durante 1 min, seguido por 25 ciclos de desnaturalización a 96°C durante 10 seg, hibridación a 50°C durante 5 seg y extensión a 60°C durante 4 min. Los productos de las reacciones de secuenciación se purificaron mediante el estuche de purificación *BigDye XTerminator* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EEUU) y posteriormente se procesaron mediante el Analizador Genético ABI3130 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EEUU). Las secuencias fueron editadas y ensambladas a través del módulo SeqMan de la suite LaserGene v8.1 (DNASTAR Inc. Madison, WI, USA).

6.11 Análisis filogenético

Con el fin de establecer la relación filogenética entre las cepas de DENV-2 colombianas y cepas que han circulado a nivel mundial, se generó una matriz con las secuencias del gen de la envoltura de longitud completa, que consisten en un fragmento de un tamaño de 1485 nucleótidos. Se incluyeron 8 secuencias de cepas aisladas de pacientes con dengue y 4 cepas aisladas de pacientes con dengue grave; además se incluyeron 61 secuencias disponibles en el GenBank, pertenecientes a los diferentes genotipos descritos para DENV-2, que incluyen principalmente cepas aisladas en países de Sudamérica. Las cepas correspondientes al genotipo selvático fueron utilizadas como grupo externo, teniendo en cuenta su mayor divergencia y estudios previos en los cuales se demuestra su ubicación basal en los árboles filogenéticos. Las secuencias fueron alineadas mediante el software ClustalW (88), no presentaron indels, por lo tanto, no se realizó tratamiento de gap. El modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajustara a las secuencias analizadas, fue estimado mediante jModelTest (89) y posteriormente utilizado en la inferencia filogenética por el método de distancia Neighbor Joining (NJ), usando el software Mega 6 (90). Con el fin de acceder al soporte de la topología del árbol filogenético, se realizó un remuestreo correspondiente a 1000 réplicas Bootstrap (91). Adicionalmente se realizó inferencia bayesiana mediante el software MrBayes (92), un total de cuatro MCMC (tres frías, una caliente) fueron evaluadas en 1000000 de generaciones con frecuencia de muestreo cada 100 generaciones para un total de 10000 árboles. La convergencia de los parámetros estadísticos fue determinada usando Tracer 1.6 (Rambaut A, Suchard MA, Xie D & Drummond AJ 2014). Se descartaron 2000 generaciones. Los árboles consenso se visualizaron mediante FigTree v1.4.2 (Drummond AJ, Rambaut A. 2013) y se editaron en el *software* MEGA 6.0 (90).

6.12 Análisis de determinantes genéticos de virulencia

Para determinar los codones específicos de la secuencia que podrían estar sujetos a selección adaptativa e indicadores de determinantes genéticos de virulencia, se analizó la matriz por medio del servidor web Datamonkey (<http://www.datamonkey.org>) (93). Se determinó la razón del número de sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo sobre el número de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo (dN/dS). En todos los análisis fue usado el modelo de sustitución REV y un nivel de significancia de $p < 0,05$. Se seleccionaron los sitios que presentaron significancia estadística de forma simultánea por los métodos de máxima verosimilitud FEL (*Fixed Effects Likelihood*), IFEL (*Internal FEL*) y SLAC (*Single Likelihood Ancestor Counting*).

6.13 Predicción *in silico* de estructuras secundarias de ARN

Se analizó el gen de la envoltura y la región 5' UTR con el software RNAz (94) (<https://www.tbi.univie.ac.at/~wash/RNAz/>) para detectar estructuras secundarias termodinámicamente estables de ARN conservadas para las regiones 5'UTR y para el gen de la envoltura independientemente. Para esto, se construyeron alineamientos de las secuencias obtenidas anteriormente para las regiones mencionadas mediante la aplicación Clustal W (88). Las secuencias fueron clasificadas en subgrupos según la procedencia de los aislados conformando finalmente cuatro matrices nucleotídicas, así: para las secuencias del gen de la envoltura la primera matriz fue conformada por 9 secuencias de cepas aisladas de pacientes con dengue y la segunda matriz por 4 cepas aisladas de pacientes con dengue grave. Para las secuencias de la región 5' UTR que consiste en un fragmento de 95 nucleótidos se crearon dos matrices con las mismas características de las dos matrices anteriormente descritas.

Teniendo en cuenta el tamaño mínimo de extensión de las regiones a evaluar y el tamaño de las secuencias para cada región se escogieron los siguientes

parámetros en el software RNAz para la identificación de regiones estructuradas candidatas: el tamaño de ventana de análisis de 120 nucleótidos y un tamaño de paso de la ventana cuando se desliza de 20 nucleótidos, la identidad mínima tolerable para aceptar alineamientos pareados comparados fue superior al 80%. La dirección de la hebra fue definida en dirección 5' -3', y los demás parámetros fueron usados por defecto. Posteriormente, se realizó la validación funcional de las estructuras secundarias identificadas anteriormente mediante la comparación de las familias de ARNs de la base de datos de familias de ARN no codificante que comparten un ancestro común Rfam directamente en la interface web (95).

6.14 Titulación mediante ensayo de placa

Células BHK-21 fueron sembradas en platos de 24 pocillos a razón de 250,000 células/pocillo. Al día siguiente, el sobrenadante de dichos cultivos fue retirado y 200 µl de diluciones seriadas de los sobrenadantes en pase número 2 fueron inoculados por triplicado (Figura 5).

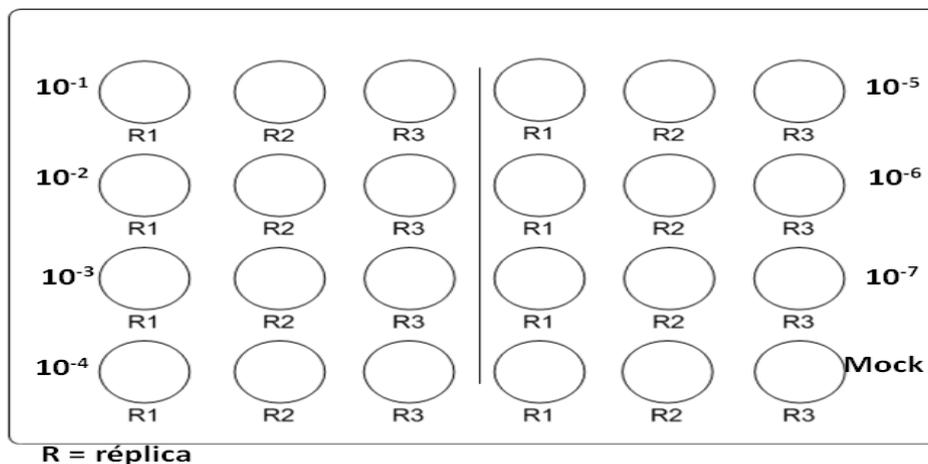


Figura 5. Diseño del ensayo de placa para titulación de DENV-2. Se realizaron diluciones seriadas 1/10 de los sobrenadantes de cultivo desde la dilución 10^{-1} hasta la dilución 10^{-7} , cada una de ellas representada con tres réplicas y células sin inocular (Mock) fueron utilizadas como control negativo.

Los platos fueron incubados a 37°C durante 1 hora con agitación cada 15 minutos para garantizar la adhesión de los virus a las células, luego, a cada

pocillo se adicionaron 800 µl del *overlay* consistiendo en una mezcla de MEM 1X, FBS al 1% y carboximetilcelulosa de viscosidad media al 1,5%. Los cultivos fueron incubados a 37°C durante 6 días, en una atmósfera con 5% de CO₂. Posteriormente, el medio de cultivo fue retirado por inversión y las monocapas de células fueron fijadas y teñidas mediante la adición de 500 µl a cada pocillo de una mezcla de paraformaldehído al 3,7% y cristal violeta al 0.2% diluido en etanol al 70%. El título viral, expresado como Unidades Formadoras de Placa (PFU, del inglés Plaque Forming Units)/ml, fue calculado mediante la siguiente fórmula: promedio del número de placas en la dilución **X** inverso de la dilución / volumen del inoculo inicial. El título viral obtenido mediante ensayo de placa (PFU/ml), fue utilizado como punto de partida para la estimación del volumen necesario para lograr la multiplicidad de infección deseada, previo a la obtención de las curvas de crecimiento, así como para la cuantificación de cada punto experimental obtenido de las curvas de crecimiento.

6.15 Curvas de crecimiento de un paso

A partir de los sobrenadantes del aislamiento viral se realizaron lotes de 5 ml (pase número 3), cada cepa fue inoculada en cultivos de células BHK-21 a una multiplicidad de infección de 4 PFU/célula, en placas de 24 pocillos durante 1 hora a 37°C. Posteriormente los cultivos fueron incubados en condiciones estándar descritas anteriormente. Se colectaron sobrenadantes de dichos cultivos a las 12, 24, 36 y 48 horas post-infección, los cuales fueron evaluados mediante ensayo de placa.

6.16 Análisis estadístico

Mediante el software estadístico Graphpad prism 6 (GraphPad Software. La Jolla, CA, USA) se realizó un test de ANOVA de dos parámetros con corrección Bonferroni para comparar las diferentes horas post – infección de las cepas que causaron dengue sin signos de alarma con respecto a las cepas que causaron dengue grave. Los resultados fueron estadísticamente significativos cuando $p < 0,005$.

7. RESULTADOS

7.1 Selección de muestras clínicas

A partir de la base de datos del laboratorio de Arbovirus, correspondiente a las muestras de suero remitidas al Instituto Nacional de Salud como parte del Programa de Vigilancia Viroológica del Dengue a nivel nacional, se seleccionaron aquellos registros de muestras de serotipo 2 (DENV-2). Los datos consignados en las fichas de notificación obligatoria fueron ajustados teniendo en cuenta la clasificación final en el Sivigila (dengue, dengue grave y mortalidad por dengue). En total, 175 sueros fueron seleccionados y procesados mediante intento de aislamiento viral en células C6/36. Los cultivos inoculados con 12 de los sueros presentaron efecto citopático (Figura 6).

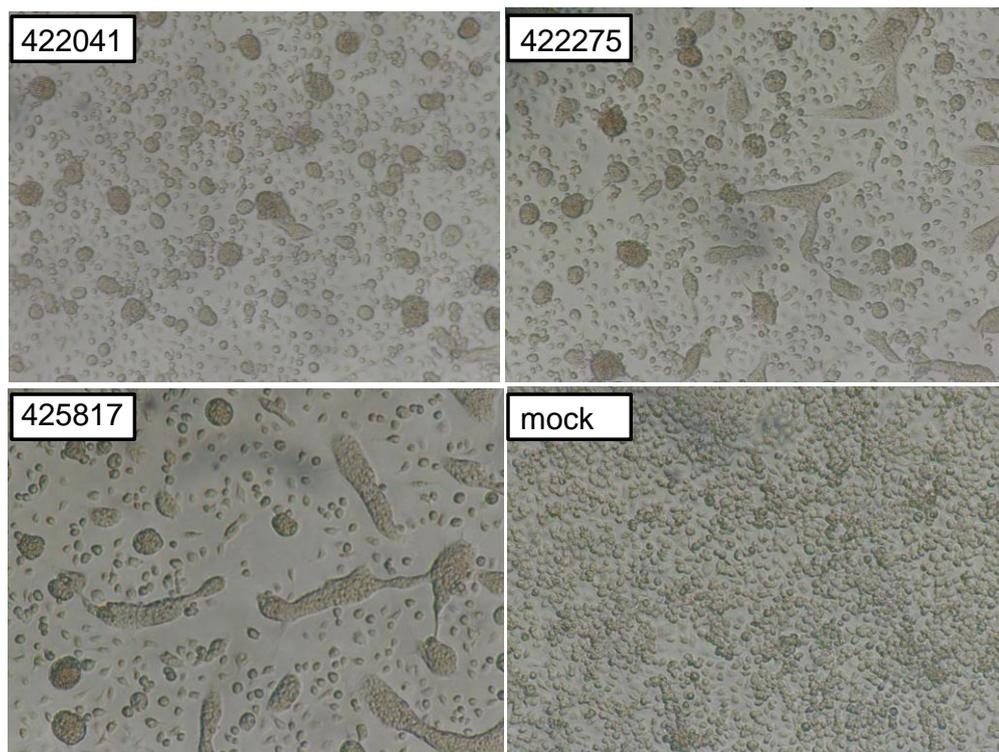


Figura 6. Imágenes representativas del efecto citopático generado por la infección con DENV-2 en células C6/36. Efectos citopáticos caracterizados por la formación de sincitios, 5-9 días post-infección con las cepas 422031, 422275 y 425817. Mock: Control de células C6/36 sin infección. Magnificación: 400X.

Las cepas virales derivadas de dichos sueros fueron clasificadas según el desenlace clínico de la enfermedad que ocasionaron y el departamento de residencia del paciente (Tabla 3). En total ocho cepas fueron aisladas de sueros de pacientes con dengue sin signos de alarma, cuatro de dengue grave, entre ellas la cepa 18 (código 422091) asociada a un caso de mortalidad por DENV-2. Los sobrenadantes de los cultivos que no presentaron efecto citopático en el segundo pase, fueron analizados al azar mediante RT-PCR y resultaron negativos para DENV-2 (datos no mostrados).

Tabla 3. Listado de cepas de DENV-2 incluidas en el estudio y características clínicas asociadas.

Código	Cepa	Año	Departamento	Presentación clínica	Edad	Estado
422041	3	2013	Boyacá	Dengue grave	54 años	Vivo
422275	8	2013	Meta	Dengue sin signos de alarma	60 años	Vivo
423887	12	2013	Putumayo	Dengue sin signos de alarma	14 años	Vivo
424029	13	2013	Arauca	Dengue sin signos de alarma	12 años	Vivo
422091	18	2013	Meta	Dengue Grave	5 años	Fallecido
422641	19	2013	Cauca	Dengue Grave	28 años	Vivo
427516	28	2013	Caldas	Dengue sin signos de alarma	11 años	Vivo
425334	41	2013	Putumayo	Dengue sin signos de alarma	22 años	Vivo
425817	44	2013	Tolima	Dengue sin signos de alarma	1 año	Vivo
425819	46	2013	Tolima	Dengue sin signos de alarma	7 años	Vivo
428702	56	2014	Tolima	Dengue sin signos de alarma	5 meses	Vivo
434321	156	2014	Meta	Dengue grave	21 años	Vivo

7.2. Caracterización molecular del gen de la envoltura de cepas de DENV-2 presentes en Colombia

Luego de la optimización de las condiciones de RT-PCR, la amplificación del gen de la envoltura (*E*) usando los oligonucleótidos descritos por Domingo y cols (87), permitió la obtención de fragmentos únicos de 1797pb (Figura 7). Dichos fragmentos, purificados a partir de la reacción de RT-PCR, permitieron la obtención de electroferogramas y el ensamblaje de secuencias del gen de la envoltura de longitud completa (Figura 8). La utilización de 4 oligonucleótidos sentido y 4 oligonucleótidos antisentido, para la secuenciación de ambas hebras del amplicón (87), permitió garantizar una profundidad mínima de 2x (equivalente a dos lecturas por cada nucleótido) a lo largo de toda la secuencia.

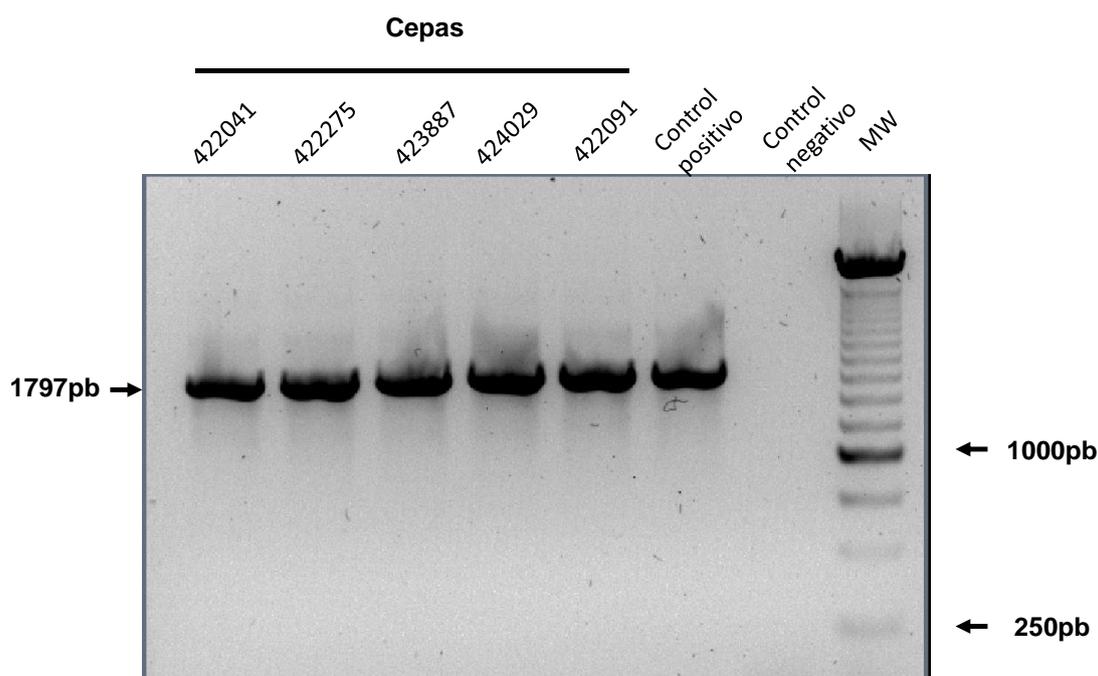


Figura 7. Amplificación del gen *E* mediante RT-PCR. La RT-PCR realizada a partir de los extractos de ARN de las diferentes cepas de DENV-2, permitió la obtención de una única banda de 1797 pb. MW: Marcador de peso molecular tipo escalera de 250 pb.

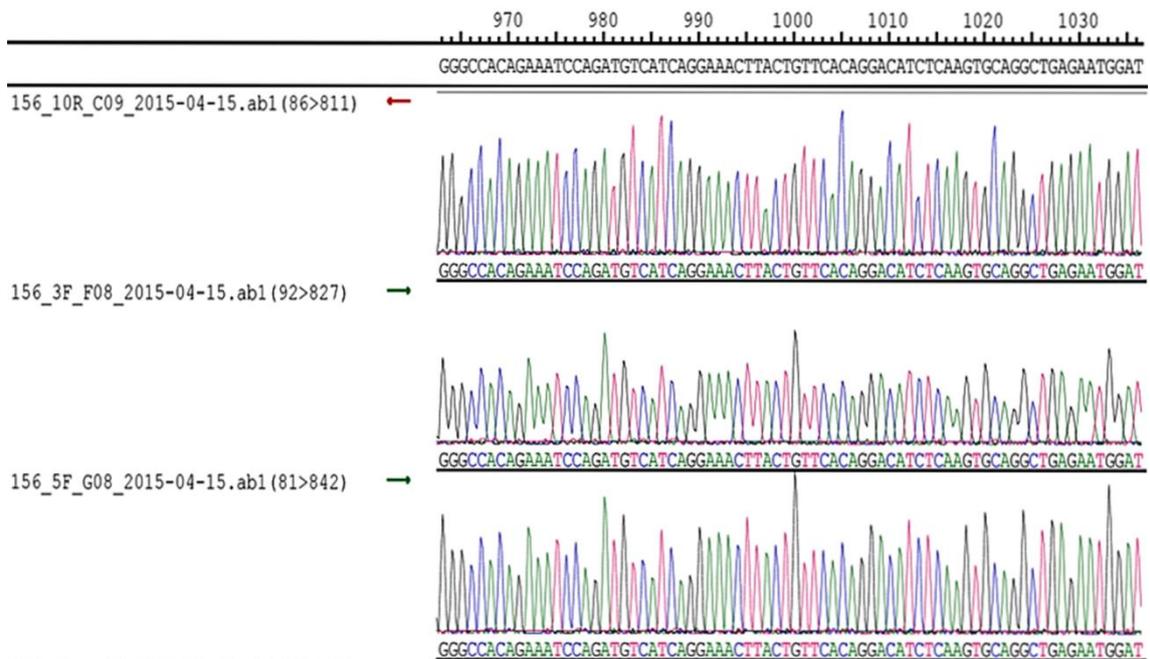


Figura 8. Ensamblaje parcial del gen *E*. Imagen representativa de la calidad de los electroferogramas y la profundidad de la secuenciación. Los electroferogramas corresponden a la secuenciación de la cepa 156 (434321), desde la posición 963 pb hasta la 1036 pb del ensamblaje. Se evidencia una profundidad de 3x, producto de la secuenciación con oligonucleótidos sentido (flechas verdes) y antisentido (flecha roja).

7.3 Presencia en Colombia de diferentes linajes del genotipo Asiático/Americano de DENV-2.

Se realizó un alineamiento de secuencias del gen *E*, representativas de la variabilidad genética al interior de los diferentes linajes del genotipo Asiático/Americano de DENV-2 presentes en Colombia, así como de secuencias representativas de los diferentes genotipos de DENV-2 que han circulado a nivel mundial. Se muestra el alineamiento que incluye exclusivamente sitios variables (Figura 9) y adicionalmente se muestra el alineamiento de sitios variables a nivel de la proteína de envoltura (Figura 10). Como referencia se utilizó la secuencia de la cepa N.1409, aislada en Jamaica en 1981 y considerada la cepa prototipo del genotipo Asiático/Americano. El mejor modelo de sustitución nucleotídica fue GTR (*General Time Reversible*) con proporción de sitios invariantes y distribución gamma con forma $\alpha = 3,75$.

Figura 10. Variabilidad en los aminoácidos de la proteína de envoltura de cepas colombianas de DENV-2. Se incluyeron secuencias representativas de cepas circulantes en Colombia y propias del estudio (recuadro rojo) . El alineamiento muestra exclusivamente los sitios variables a lo largo de la proteína con respecto a la secuencia prototipo Jamaica.

La reconstrucción filogenética por los métodos de Inferencia Bayesiana (Figura 11) y NJ (Figura 12) muestra que todas las cepas colombianas analizadas en el presente estudio, pertenecen al genotipo Asiático/Americano. Sin embargo, las mismas no se encuentran agrupadas formando un grupo monofilético. Los resultados evidencian la existencia de cuatro linajes bien soportados (>80%) al interior del genotipo, representados por cepas que han circulado en Colombia y países vecinos entre el 2008 y 2014. Las cepas colombianas caracterizadas en el presente estudio, se ubican en dos de estos linajes. El primer linaje, está conformado por 3 cepas de la región de la Orinoquía y el segundo linaje conformado por 9 cepas ampliamente distribuidas en el país. Con respecto al desenlace clínico, es de resaltar que ambos linajes estuvieron conformados por cepas derivadas de pacientes con dengue y dengue grave. Las secuencias del gen de la envoltura de cepas colombianas de DENV-2 se encuentran estrechamente relacionadas con otras secuencias previamente obtenidas de cepas aisladas en Colombia, Venezuela y Perú.

Al estimar la divergencia evolutiva, se evidenció un promedio de 0,024 sustituciones por sitio entre cada par de secuencias de DENV-2, que incluían secuencias colombianas y secuencias pertenecientes al genotipo Asiático/Americano, con una identidad a nivel nucleotídico de 99,9%.

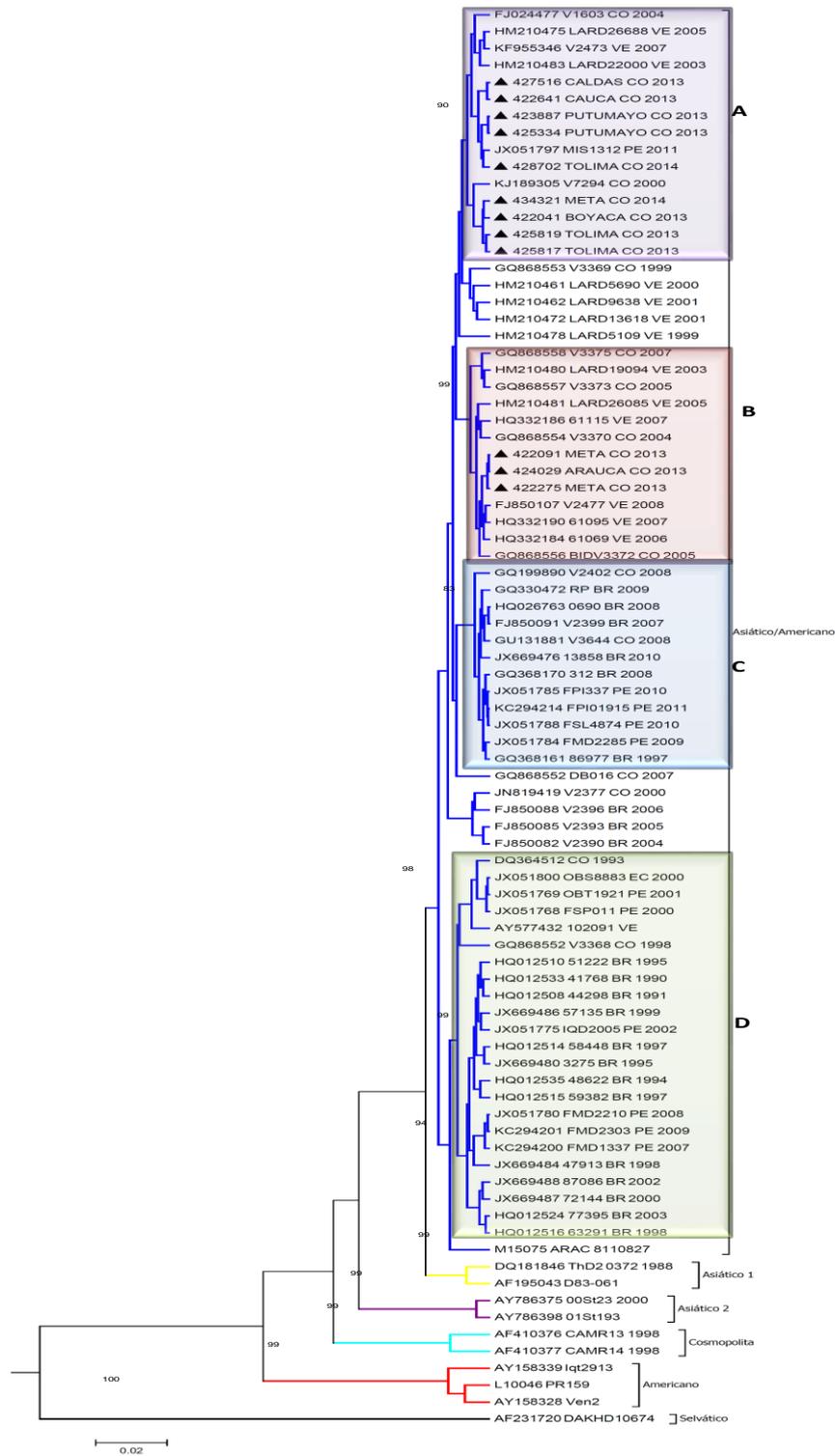


Figura 11. Reconstrucción filogenética del gen *E* de DENV-2, mediante Inferencia Bayesiana. El mejor modelo de sustitución nucleotídica fue GTR + I + G. Las cepas Colombianas secuenciadas en el presente estudio han sido identificadas con triángulos negros. D: Dengue. DG: Dengue grave. Se observan al menos cuatro linajes (A-D) en el genotipo Asiático/Americano. Como grupo externo, se incluyó el genotipo Selvático.

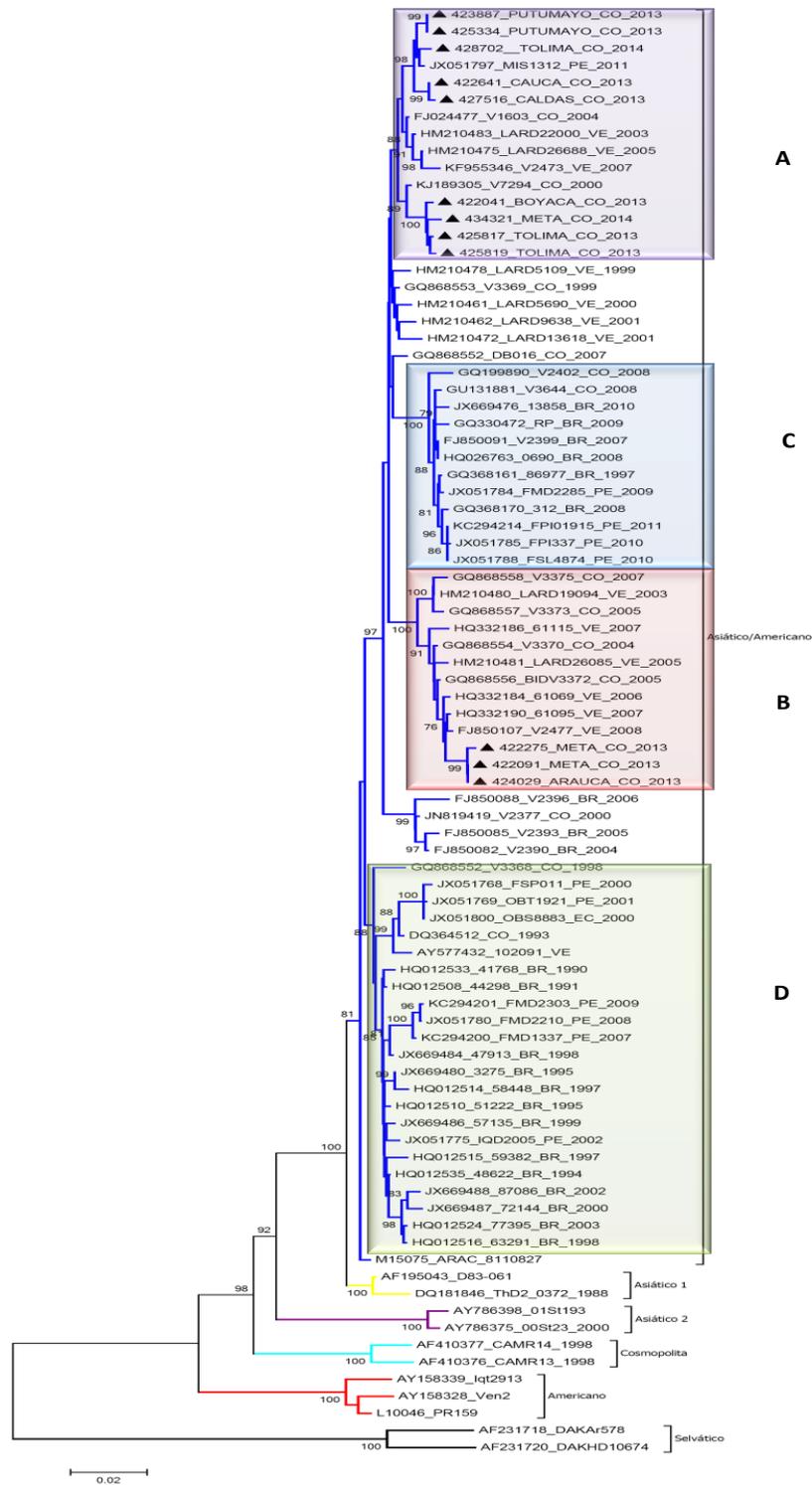


Figura 12. Reconstrucción filogenética del gen *E* de DENV-2, mediante el método de distancia NJ. El modelo de sustitución nucleotídica utilizado fue Tamura-Nei + G. Los soportes se obtuvieron a partir de 1000 réplicas *bootstrap*. Las cepas Colombianas secuenciadas en el presente estudio han sido identificadas con triángulos negros. D: Dengue. DG: Dengue grave. Se observan al menos cuatro linajes (A-D) en el genotipo Asiático/Americano. Como grupo externo, se incluyó el genotipo Selvático.

7.4. Evidencia de selección purificadora a nivel de codones en el gen de la envoltura de DENV-2.

En los análisis de evolución adaptativa los estadísticos de neutralidad presentaron los siguientes estimados: D de Tajima: -1.674 ($P > 0,10$ no significativo), estadístico D^* de Fu y Li: 0,93863 ($P > 0,10$ no significativo) y F^* de Fu Y Li: -0,80598 ($P > 0,1$ no significativo). El valor global dN/dS fue 0,0498692. El resultado del análisis mediante SLAC, FEL e IFEL, sugiere la ausencia de codones sometidos a selección positiva, así como la presencia de un gran número de codones bajo selección negativa (purificadora). En la Tabla 4, se presenta el listado de codones seleccionados negativamente, que fueron identificados de forma simultánea por los tres métodos, con un nivel de significancia de 0,05.

Tabla 4. Listado de codones seleccionados negativamente.

Codón	Valor de p^*						
2	0,0044	144	0,0073	253	0,00396	387	0,00203
3	0,00273	151	0,0001	254	0,00379	388	0,00217
8	0,00249	152	0,00124	257	0,00202	389	0,00104
11	0,0073	154	0,0073	261	0,0006	396	0,0073
12	0,00123	156	0,00386	264	0,00123	397	0,0013
15	0,00123	157	0,0020	267	0,0013	398	0,0024
22	0,0073	158	0,0073	270	0,00316	399	0,00124
23	0,0015	159	0,00005	284	0,0029	402	0,00280
24	0,00370	163	0,0016	285	0,0082	407	0,00297
25	0,00379	168	0,00249	288	0,00297	409	0,00123
29	0,0006	169	0,00370	300	0,0041	410	0,00282
35	0,0013	180	0,00370	302	0,0007	413	0,00370
37	0,0001	181	0,00175	304	0,00387	414	0,0087

42	0,00249	184	0,00322	307	0,00202	416	0,00124
55	0,00370	187	0,00123	309	0,00370	421	0,0073
56	0,00181	191	0,00133	310	0,00118	424	0,00123
58	0,0090	192	0,00249	330	0,0066	429	0,00005
60	0,0082	193	0,00249	333	0,0082	431	0,0014
61	0,00280	200	0,00285	335	0,00334	434	0,0029
63	0,0041	205	0,00370	336	0,00370	435	0,00370
67	0,0073	208	0,00123	338	0,00284	437	0,0073
72	0,0014	209	0,00249	341	0,00249	439	0,00123
73	0,0041	210	0,00363	346	0,00249	440	0,0021
78	0,00370	214	0,00363	347	0,00370	444	0,0086
90	0,00249	217	0,00123	349	0,0013	447	0,00123
94	0,0073	222	0,0041	352	0,0034	449	0,00279
97	0,0041	224	0,0041	354	0,0004	451	0,00370
102	0,00130	230	0,00249	356	0,00370	452	0,00419
107	0,00405	239	0,00123	357	0,00266	454	0,00123
110	0,0021	244	0,00249	358	0,0004	457	0,00334
112	0,00123	245	0,0004	371	0,00370	463	0,00111
117	0,00370	246	0,00288	374	0,00130	471	0,0004
135	0,00330	248	0,00319	376	0,0073	473	0,0041
137	0,00283	249	0,00249	382	0,00452	483	0,00388
139	0,00305	250	0,00123	383	0,00274	487	0,00214
143	0,00370	252	0,00123	384	0,00123	491	0,00196

*Se presenta únicamente el valor de $p < 0,05$ obtenido mediante SLAC.

7.5. Amplificación y secuenciación de la región 5'UTR de DENV-2

Se realizó la amplificación exitosa de la región 5' UTR, utilizando la metodología RACE. La generación de una cola poli(A) en el extremo 5' del cDNA obtenido en el paso de transcripción reversa, permitió la hibridación del PCR Anchor primer y por ende la amplificación de dicho extremo (Figura 13). La secuenciación del producto de PCR permitió la obtención de electroferogramas en los cuales se evidencia la presencia de la cola poli(A) adicionada de forma artificial (Figura 14).

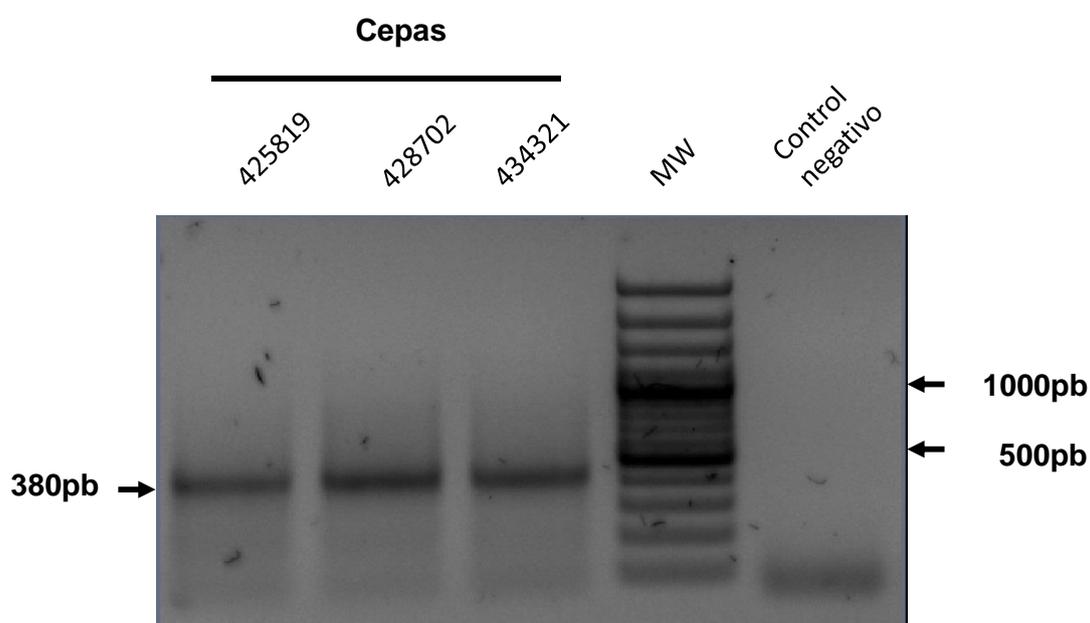


Figura 13. Amplificación de la región 5' UTR de DENV-2. Fragmento de 380 pb obtenido mediante la estrategia RACE, utilizando los oligonucleótidos SP2 y *PCR Anchor primer* y el protocolo descrito en la metodología. MW: Marcador de peso molecular tipo escalera de 100 pb.

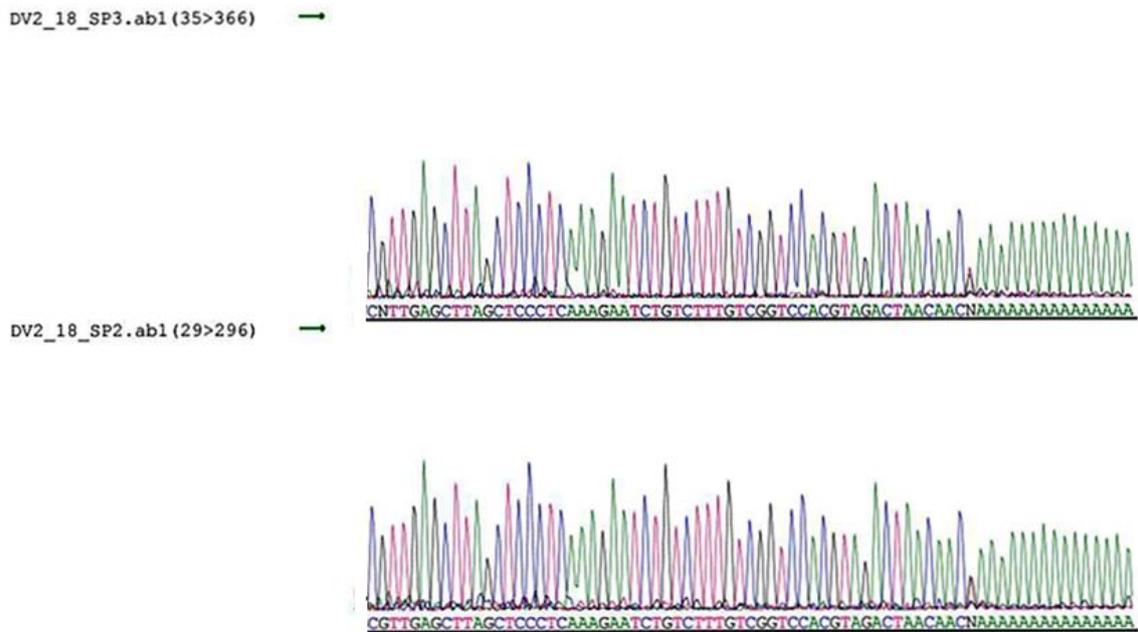


Figura 14. Electroferogramas representativos de la región 5' UTR. Se muestra la secuencia de la cepa 18, incluida la cola poli A utilizando los oligonucleótidos SP2 y SP3.

7.6 Las estructuras secundarias de la región 5'UTR y del gen *E* de DENV-2 no se relacionan con la severidad de la enfermedad.

En la región 5' UTR se identificaron dos estructuras secundarias, conservadas tanto en las cepas asociadas a dengue sin signos de alarma, como en las cepas asociadas a dengue grave. La primera estructura secundaria corresponde al elemento SLA (Figura 15 A y C) y la segunda estructura secundaria predicha corresponde al elemento SLB (Figura 15 B y D). Para los elementos SLA y SLB se determinaron diferentes parámetros, los cuales se encuentran directamente relacionados con su estabilidad termodinámica (Tabla 5).

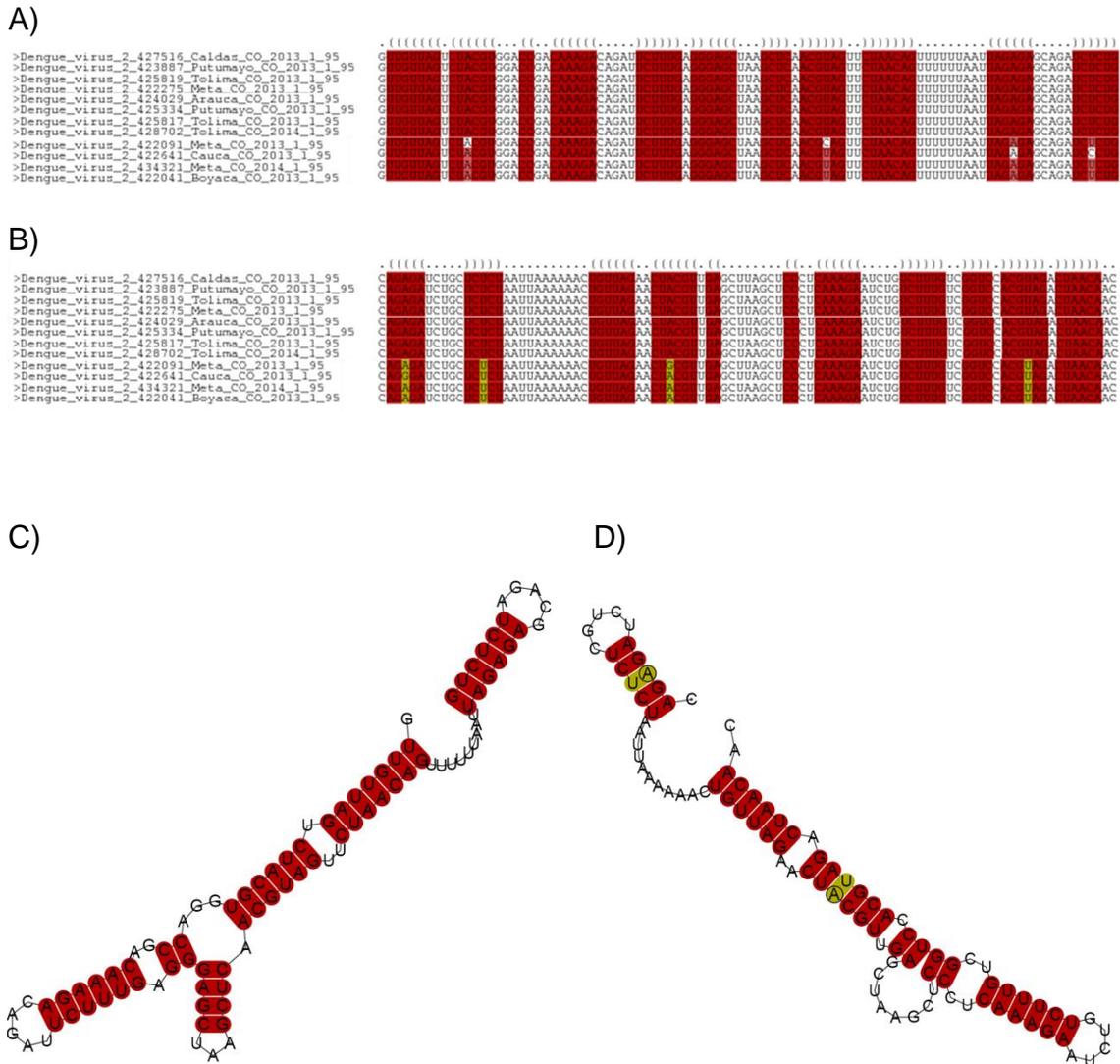


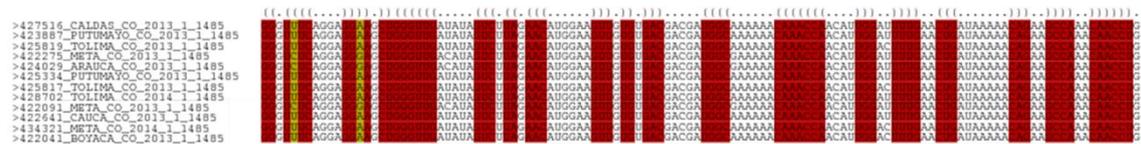
Figura 15. Alineamiento y estructuras secundarias en la región 5' UTR de DENV-2. A) y B) Alineamientos de secuencias de la región 5'UTR de cepas asociadas a dengue sin signos de alarma y dengue grave, respectivamente. En rojo se muestra el consenso de estructuras secundarias de ARN. C) Estructura secundaria consenso correspondiente al elemento SLA. D) estructura secundaria consenso correspondiente al elemento SLB.

Tabla 5. Estabilidad termodinámica de los elementos estructurales presentes en el 5'UTR de DENV-2.

Parámetros	SLA	SLB
Localización	1- 95	1- 95
Promedio z-score	-1,98	-2,83
Contribución Energía	-30,40	-24,68
Contribución covarianza	0,00	-0,37
Índice de conservación de estructura	1,0	1,02
Hebra	Sentido	Anti-sentido
Media de identidad en parejas	99,47	98,25

Para las secuencia del gen *E*, se realizaron los alineamientos, tanto en las cepas asociadas a dengue sin signos de alarma así como en las cepas asociadas a dengue grave (Figura 16 A-D)), se detectaron cuatro estructuras secundarias conservadas (Figura 17 (A-D)), estas se ubicaron a lo largo de la secuencia nucleotídica (Figura 18) y se determinaron los diferentes parámetros de estabilidad termodinámica (Tabla 6).

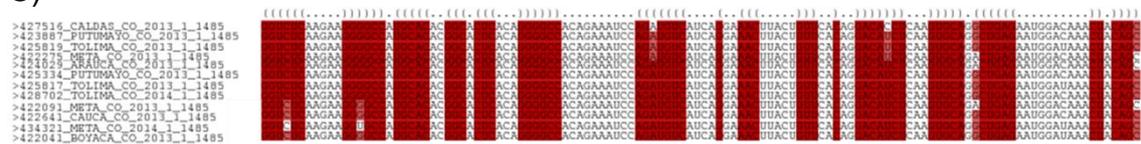
A)



B)



C)

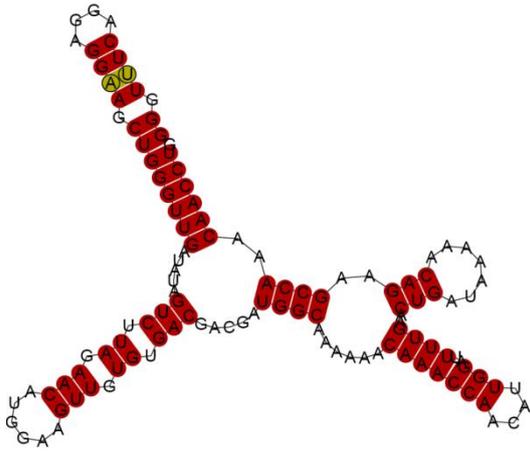


D)

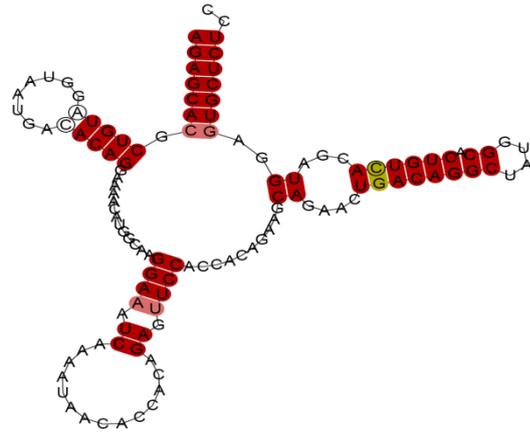


Figura 16. Alineamiento gen *E*. En los alineamientos A-D se evidencia en color rojo y amarillo se muestran los nucleótidos que forman estructuras complementarias.

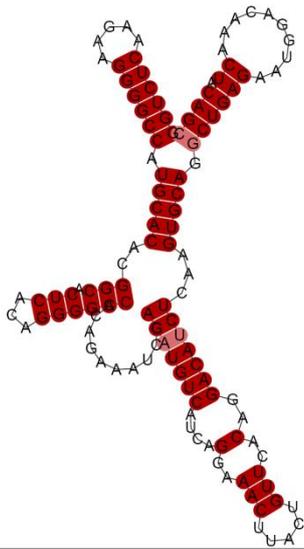
A)



B)



C)



D)

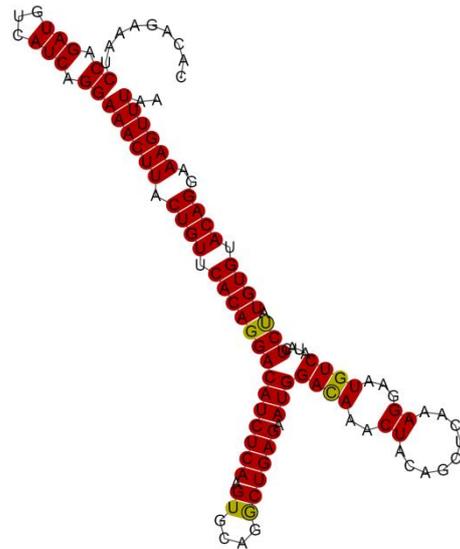


Figura 17. Estructuras secundarias en el gen *E*. A - D) Estructuras secundarias predichas consenso en el gen de la envoltura de cepas asociadas a dengue sin signos de alarma y dengue grave.

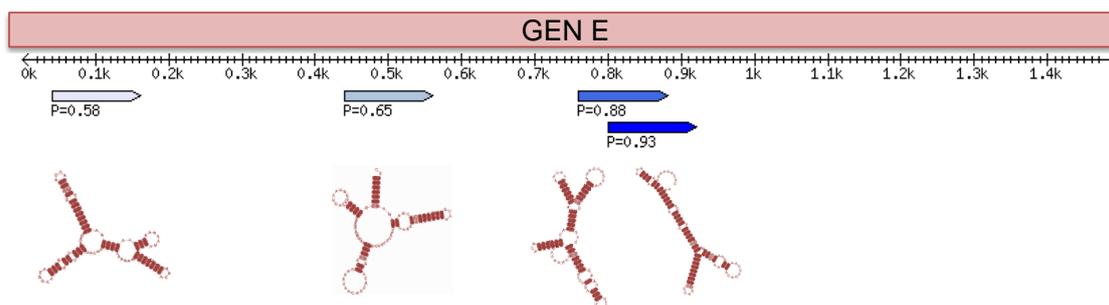


Figura 18. Ubicación de las cuatro estructuras secundarias en el gen de la envoltura. En la parte inferior se esquematizan las posiciones nucleotídicas del gen completo.

Tabla 6. Estabilidad termodinámica de los elementos estructurales presentes en el gen de la envoltura de DENV-2.

Estructura predicha	1	2	3	4
Localización	40-160	440-560	760-880	800-920
Promedio z-score	-1,62	-2,34	-2,00	-2,34
Contribución Energía	-28,30	-31,64	-37,05	-31,64
Contribución covarianza	0,006	-0,75	0,50	-0,75
Índice de conservación de estructura	0,97	0,89	0,98	0,89
Hebra	Sentido	Sentido	Sentido	Sentido
Media de identidad en parejas	97,92	95,00	98,75	95,00

Las estructuras secundarias detectadas mediante RNAz fueron posteriormente validadas mediante la base de datos Rfam, con el fin de asignar clasificaciones funcionales según los modelos de familias taxonómicas. La estructura secundaria de ARN denominada SLA y ubicada en la región 5'UTR fue la única encontrada por múltiples alineamientos de secuencias, (Tabla 7) y anotada a nivel taxonómico en la familia *Flaviviridae*. Las restantes estructuras secundarias evaluadas en la región 5'UTR y en el gen de la envoltura no se encontraron asociadas con las familias existentes en la base de datos Rfam.

Tabla 7. Validación de SLA en Rfam

Id	Acceso Rfam	Posición	Bits score	Valor E	hebra
DENV SLA	RF02340	1-71	78,6	6,2e ⁻¹⁹	Sentido

A partir de los alineamientos del extremo 5' UTR y del gen de la envoltura de DENV-2, fue posible identificar sustituciones compensatorias putativas en diferentes Loci que participan en la formación de estructuras secundarias conservadas; por ello se compararon dichas sustituciones compensatorias putativas o apareamientos no canónicos hallados en la predicción de estructuras secundarias con los codones seleccionados negativamente por los métodos de evolución adaptativa (Tabla 8), con el fin de evaluar la existencia de una doble selección evolutiva, la primera determinada mediante la estructura conformacional del ARN y la segunda desde la evolución purificadora, diversificadora o neutral.

Tabla 8. Correlación entre sustituciones compensatorias putativas o apareamientos no canónicos y codones seleccionados negativamente.

Estructura secundaria de ARN	Posición nucleotídica gen de la envoltura	Codón	Codón seleccionado negativamente
Figura 17 (A)	44 53	15 (2) 18 (2)	No
Figura 17 (D)	854 859	284(3) 286(2)	Si
Figura 17 (D)	871 892	290(2) 297(2)	No
Figura 17 (D)	842 901	280(3) 300(2)	Si

7.7 Las características fenotípicas *in vitro* de las cepas de DENV-2 no indican cambios asociados con la severidad de la enfermedad.

Para cada una de las cepas tituladas se realizó la curva de crecimiento que incluyó 6 hpi (Figura 19), 12 hpi (Figura 20), 24 hpi (Figura 21), 36 hpi (Figura 22) y 48 hpi (Figura 23), posteriormente se realizó la respectiva titulación de cada uno de los puntos experimentales. En común para las cepas se observó un fenotipo de placa heterogéneo y reproducibilidad en el número de placas entre cada una de las réplicas.

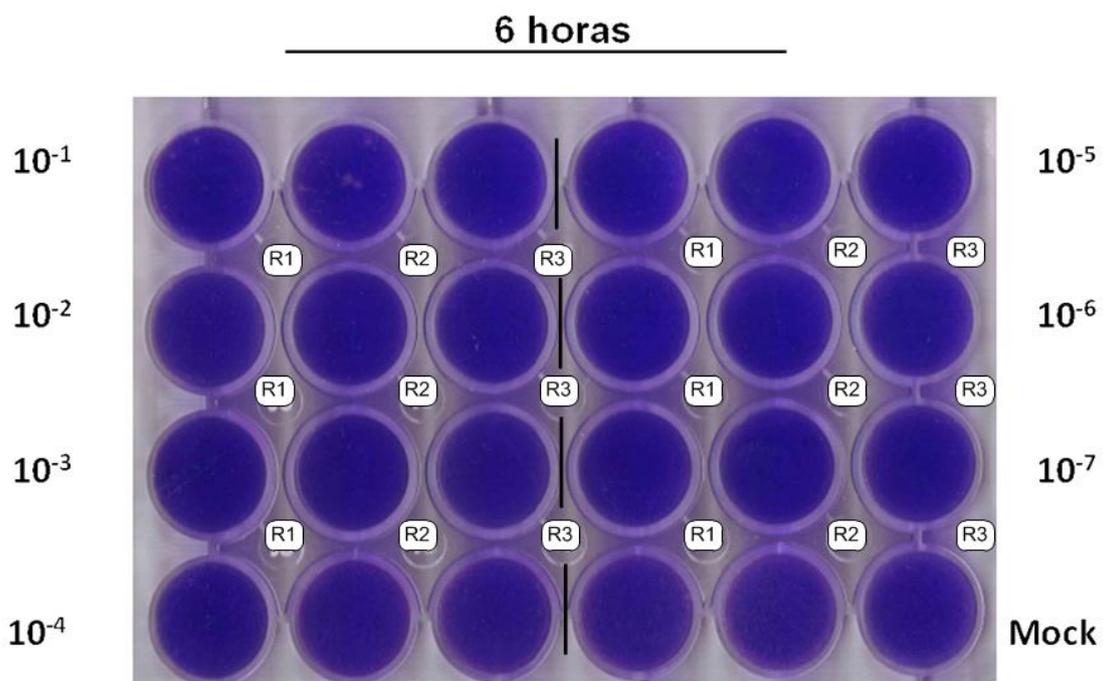


Figura 19. Titulación mediante ensayo de placa a las 6 hpi. Titulación de la cepa 12 (código 423887) por triplicado.

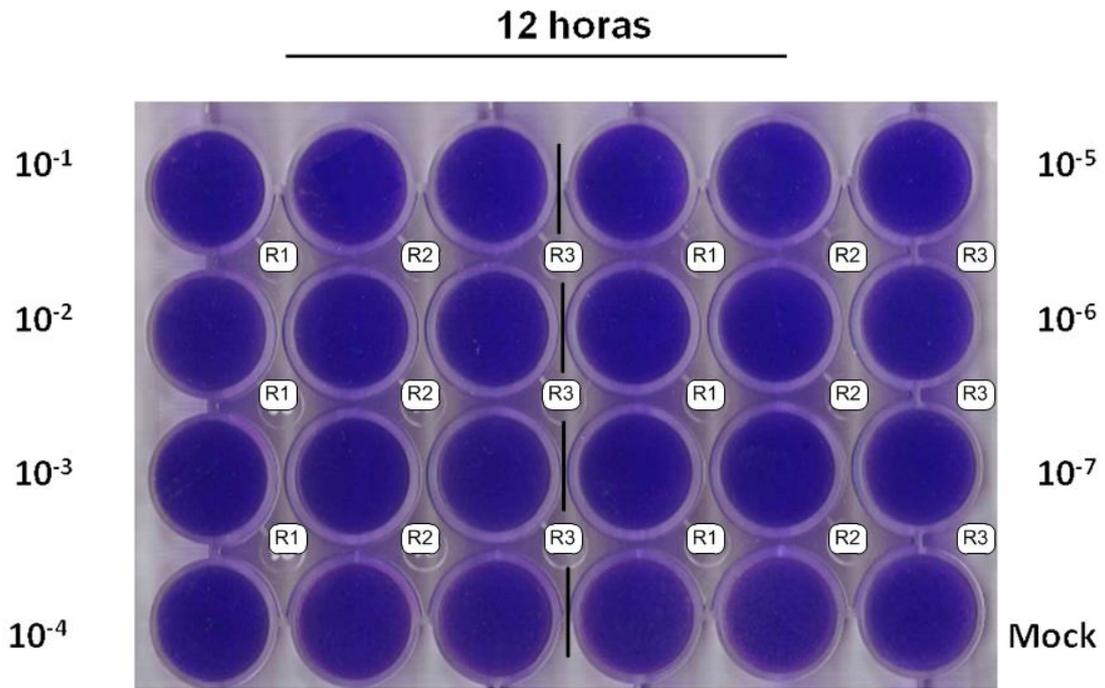


Figura 20. Titulación mediante ensayo de placa a las 12 hpi. Titulación de la cepa 12 (código 423887) por triplicado.

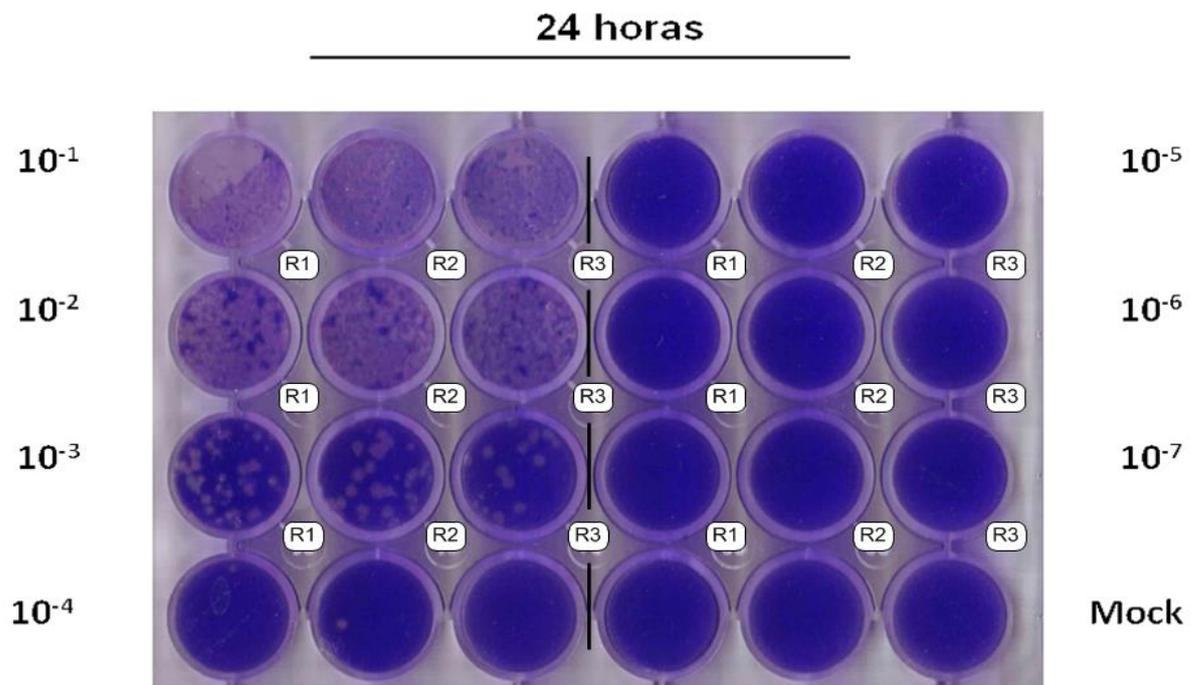


Figura 21. Titulación mediante ensayo de placa a las 24 hpi. Titulación de la cepa 12 (código 423887) por triplicado.

36 horas

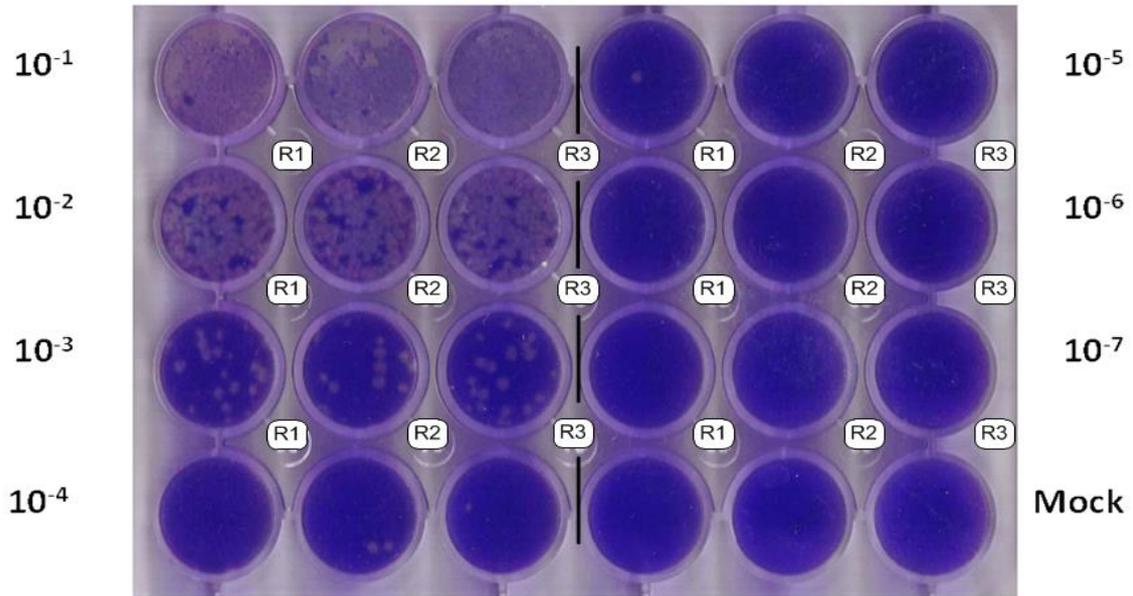


Figura 22. Titulación mediante ensayo de placa a las 24 hpi. Titulación de la cepa 12 (código 423887) por triplicado.

48 horas

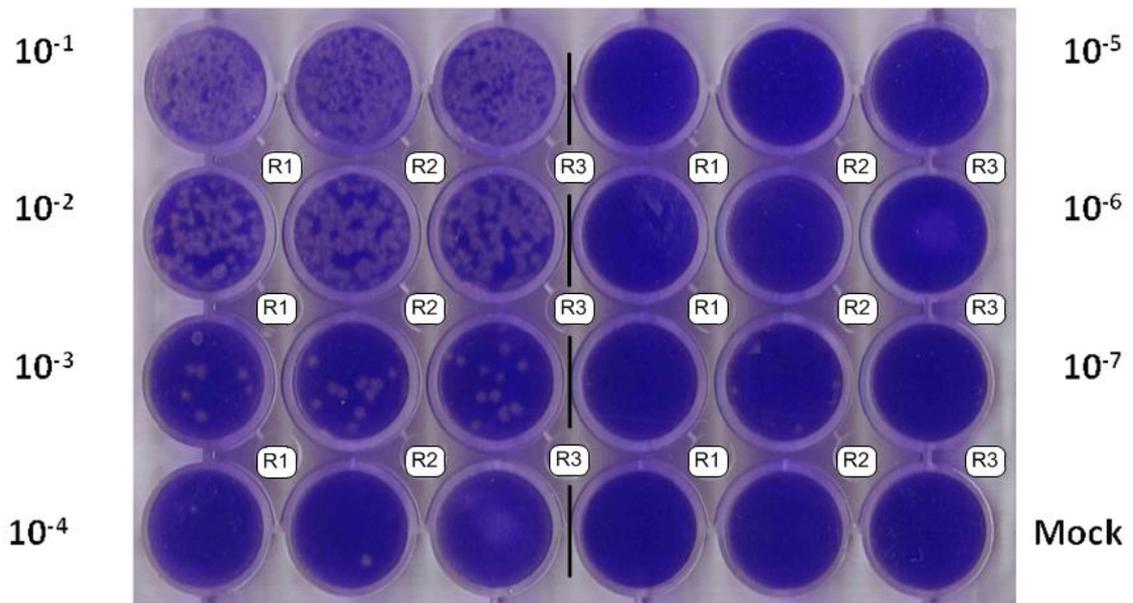


Figura 23. Titulación mediante ensayo de placa a las 24 hpi. Titulación de la cepa 12 (código 423887) por triplicado.

Al realizar la caracterización *in vitro* mediante curvas de crecimiento de un paso de las cepas 156 (código 434321) y cepa 18 (código 422091) aisladas de pacientes que presentaron dengue grave, los títulos virales se evidenciaron después de las 12 horas post –infección (4,28 – 5,21 Log 10 PFU/ml), los títulos virales máximos fueron alcanzados a las 36 horas post infección (4,34 – 5,33 Log 10 PFU/ml) y a partir de las 48 horas los títulos comenzaron a disminuir. Al comparar los títulos de las cepas se evidencio mayores títulos en la cepa 422091 (Figura 24).

La caracterización *in vitro* de las cepas: 12 (código 423887), 46 (código 425819), 44 (código 425817), 41 (código 425334), 56 (código 428702), 8 (código 422275) y 28 (código 422516) aisladas de pacientes que presentaron dengue sin signos de alarma, en general los títulos virales se evidenciaron después de las 12 horas post infección, los títulos virales máximos fueron alcanzados a las 24 horas post infección (4,99 – 6,18 Log 10 PFU/ml) y a partir de las 48 horas los títulos comenzaron a disminuir (4,68 – 5,87 Log 10 PFU/ml). Los títulos virales mayores fueron obtenidos por la cepa 422275 y los títulos menores para la cepa 423887 (Figura 25).

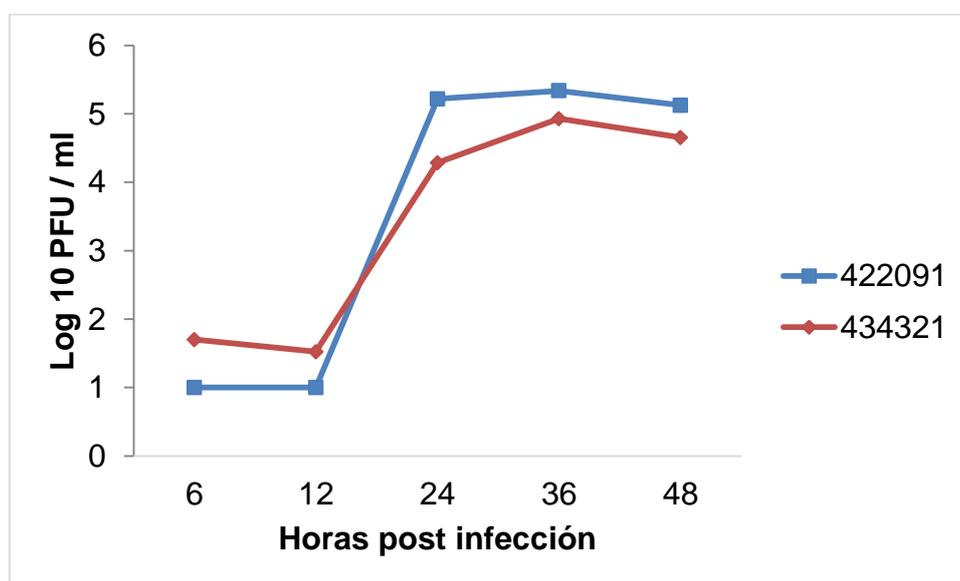


Figura 24. Curvas de crecimiento en cepas asociadas a dengue grave. Log 10 PFU/ml en cinco diferentes horas post- infección

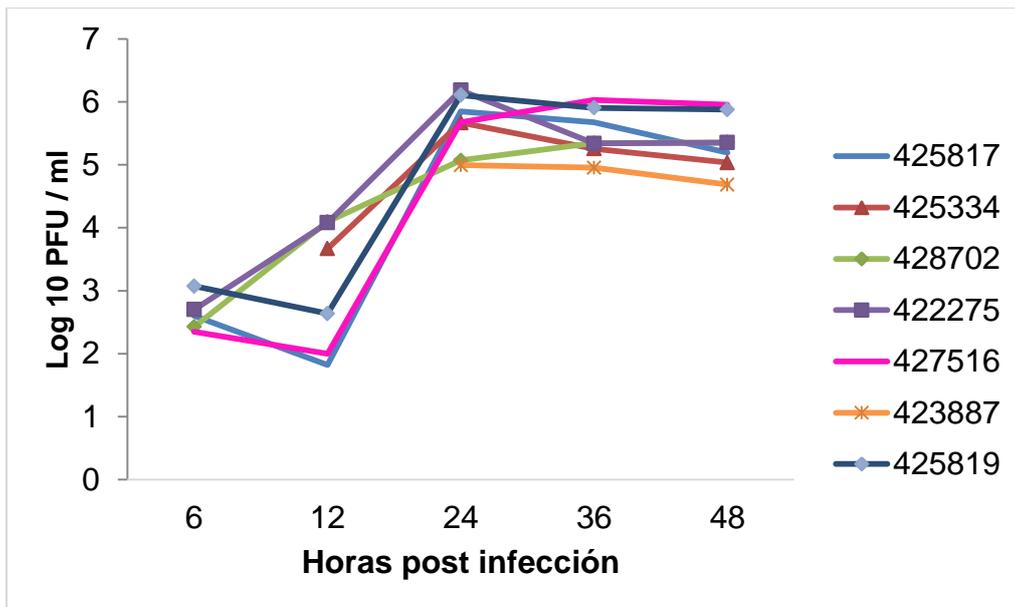


Figura 25. Curvas de crecimiento en cepas asociadas a dengue sin signos de alarma. Log 10 PFU/ ml en cinco diferentes horas post- infección

Al comparar las curvas de crecimiento de las cepas asociadas a dengue grave con respecto a las cepas asociadas a dengue sin signos de alarma no se observan diferencias estadísticamente significativas (variación total = 0,0743 $p=0,8915$), no obstante la tendencia es la presencia de títulos superiores durante las 24 horas en cepas asociadas a dengue sin signos de alarma y en las 36 horas post infección en cepas que ocasionaron dengue grave (Figura 26).

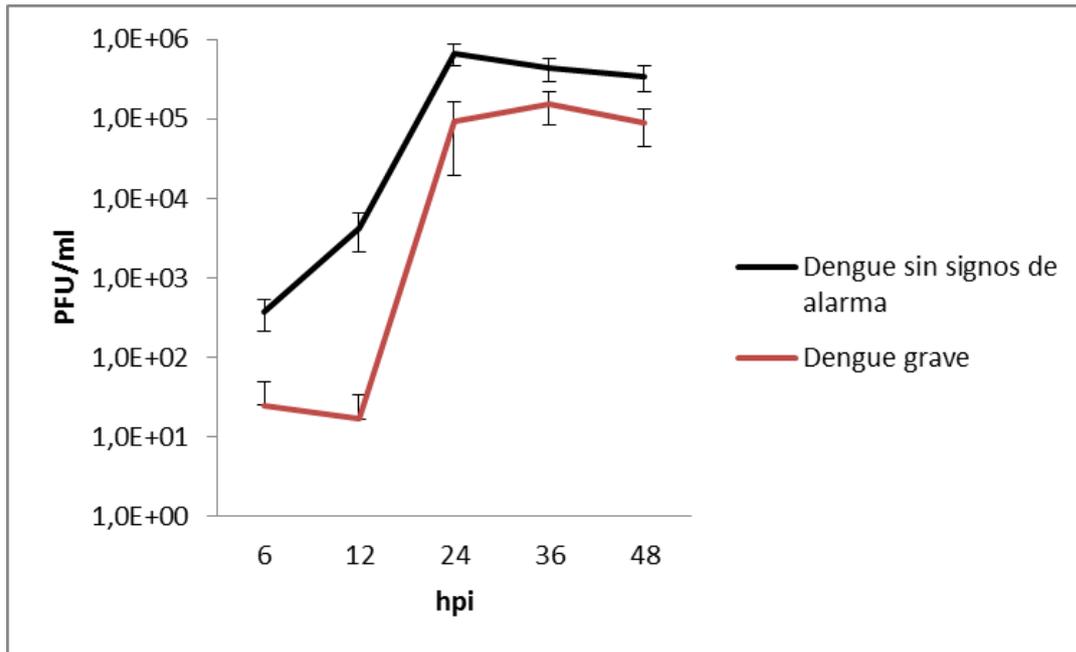


Figura 26. Comparación curvas de crecimiento según clasificación clínica. Títulos obtenidos en cinco diferentes tiempos post-infección entre cepas que ocasionaron dengue sin signos de alarma y cepas que ocasionaron dengue grave.

Se realizó la asociación entre la presencia de una sustitución no sinónima con respecto a los títulos virales obtenidos a las distintas horas post infección (figura 27) mediante el test anova 2 parámetros los resultados no fueron estadísticamente significativos $p < 0.05$, por lo cual no fue posible asociar la presencia de posibles determinantes genéticos de virulencia con las diferencias fenotípicas in vitro, ni con los distintos cuadros clínicos de la enfermedad.

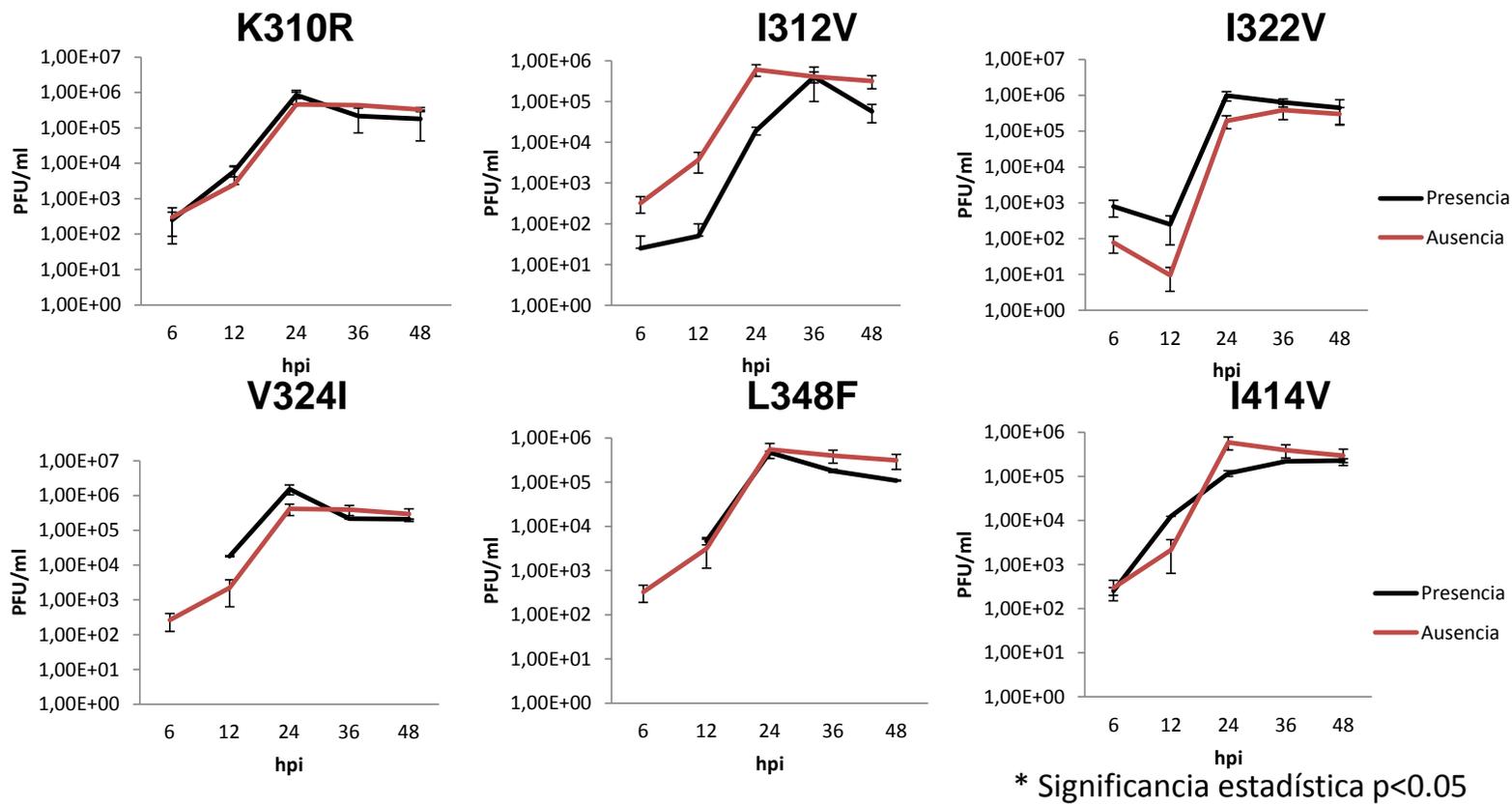


Figura 27. Determinantes genéticos de virulencia y características fenotípicas *in vitro*. Presencia o ausencia de sustituciones no sinónimas respecto a los títulos obtenidos en cinco diferentes tiempos post-infección entre cepas que ocasionaron dengue sin signos de alarma y cepas que ocasionaron dengue grave.

8. DISCUSIÓN

8. 1 Contribución del genotipo viral a la patogénesis

En Colombia, durante los años 50's fue establecido el programa de erradicación del vector *Aedes aegypti*, como estrategia para la eliminación de la fiebre amarilla. Dicha estrategia fue exitosa y permitió de forma indirecta la eliminación del DENV durante aproximadamente 20 años. Sin embargo, la reemergencia del DENV tuvo lugar desde principios de los 70's, con una epidemia causada por DENV-2 en la costa atlántica Colombiana en 1971 (96). Para 1982, los cuatro serotipos de DENV habían sido reportados y se encontraban circulando de forma endémica. En 1988 se reportó el primer caso de dengue grave en Colombia, lo cual coincidió con la expansión del genotipo Asiático/Americano de DENV-2 en la región y el desplazamiento del genotipo Americano que se encontraba circulando desde los años 70's (84). Es probable que este nuevo genotipo haya tenido una importante contribución al incremento de la patogénesis de la enfermedad (39, 97), tal como ha sido demostrado mediante la caracterización *in vitro* e *in vivo* de cepas (64, 71).

Estudios filogenéticos han demostrado que el genotipo Asiático/Americano es el único circulante en la región en los últimos 30 años (84, 98). En el presente estudio se evidenció que todas las cepas de DENV-2 circulantes en el periodo de muestreo, pertenecen al genotipo Asiático/Americano. Así mismo, se pudo determinar la co-circulación reciente de dos linajes al interior de dicho genotipo, lo cual es de interés debido a que las cepas estudiadas provienen de distintas regiones del país. Además, en cada linaje las cepas estudiadas se encuentran estrechamente relacionadas entre sí y a su vez con cepas circulantes en Venezuela y Perú, lo cual sugiere un patrón de dispersión de DENV-2 caracterizado por múltiples introducciones del virus al país y posiblemente la exportación continua a países vecinos.

También se pudo evidenciar que ambos linajes estuvieron conformados por cepas asociadas a dengue sin signos de alarma y cepas asociadas a dengue grave; es decir, la severidad de la enfermedad no se comporta como una característica ancestral que permita su asociación con grupos monofiléticos a nivel de genotipo o linaje. Este hallazgo, supone una dificultad para correlacionar de forma directa el genotipo con la enfermedad en estudios de epidemiología molecular, a la vez que justifica un análisis genético más profundo, con el fin de determinar si existen mutaciones puntuales compartidas entre cepas provenientes de diferentes linajes, que conlleven sustituciones aminoacídicas o en la estructura del ARN, con un efecto directo en el ciclo de vida del virus o en su virulencia en el hospedero humano.

La introducción de un nuevo genotipo o incluso de un linaje genético de DENV, puede ocasionar la co-circulación de dos genotipos o linajes y que uno de ellos sea desplazado. Numerosos estudios han encontrado ese patrón de desplazamiento ante la llegada de un nuevo genotipo (99, 100), por ejemplo, en Perú tras la llegada de un linaje de DENV-2 que no había circulado en la región, hubo un aumento considerable en los casos de dengue grave (101).

8.2 Evidencia de selección purificadora y de sustituciones compensatorias putativas en regiones genómicas codificantes y no codificantes.

Se ha reportado previamente una alta variabilidad genética en la secuencia del gen de la envoltura, que codifica para una proteína involucrada en la interacción con el receptor celular y que posee los principales epítopes antigénicos responsables de desencadenar la respuesta inmune (54), las cepas analizadas no son genéticamente divergentes entre sí y en el análisis de evolución adaptativa, las pruebas de neutralidad indican la ausencia de selección positiva, no obstante los análisis a nivel de codones soportan la existencia de selección purificadora. Durante su ciclo natural de transmisión, DENV-2 debe interactuar con elementos celulares de especies tan distantes

filogenéticamente como son sus vectores y hospedero. A pesar de que surge una alta variabilidad genética como producto de la replicación mediada por una RdRP carente de actividad correctora, y que dicha variabilidad pueda ser utilizada de manera favorable en uno de sus hospederos, el virus debe garantizar su replicación en la otra especie de hospedero, situación que constituye un *trade-off* en la evolución viral y que resulta en una variabilidad genética limitada, evidente en el bajo número de sustituciones no sinónimas encontradas en el gen de la envoltura (102, 103).

En la región 5' UTR se encontró una identidad de ~98,9% a nivel de nucleótidos y la predicción de estructuras secundarias *in silico* evidenció dos estructuras de ARN previamente caracterizadas denominadas SLA y SLB (14), sin embargo, no se demostraron cambios conformacionales en las estructuras secundarias predichas, ni otras estructuras adicionales que permitieran establecer diferencias entre las cepas asociadas a los diferentes cuadros clínicos de la enfermedad. En la estructura secundaria SLB, se evidenció la presencia de dos sustituciones compensatorias putativas, que preservan la estructura del ARN viral. Teniendo en cuenta su participación en la formación de la estructura tallo-bucle de un elemento reconocido por su importancia a nivel funcional, la presencia de una mutación que elimine la complementariedad de bases tendría un efecto negativo en el fenotipo, por lo tanto, la ocurrencia de una segunda mutación en la base complementaria ubicada en otro locus del genoma, permitiría la preservación de su función y garantizaría el mantenimiento de dicha variante genética (104-106). Otros estudios han demostrado que algunas sustituciones compensatorias introducidas de forma artificial en regiones no codificantes permiten reestablecer los elementos del ARN indispensables durante la replicación viral (107, 108). Este tipo de sustituciones también se observó en la región 3'UTR en un linaje genético con mayor producción de ARN subgenómico que se une al dominio tripartito TRIM25 interfiriendo en la producción celular de interferón tipo I (109).

El análisis realizado para el gen *E* permitió identificar cuatro estructuras secundarias tanto en cepas asociadas a dengue sin signos de alarma como en cepas asociadas a dengue grave, las estructuras secundarias no difieren entre las cepas ya que las secuencias comparten una identidad a nivel de nucleótidos (~99,9%) y aunque las estructuras secundarias evidenciadas en el gen *E* son termodinámicamente estables, no existen estudios que demuestren su existencia y sugieran algún tipo de función. En dos de las estructuras secundarias también se evidenciaron sustituciones compensatorias putativas; la mayoría de estudios han descrito mutaciones no sinónimas, cuya interpretación ha sido enfocada en describir cambios conformacionales y alteraciones en las propiedades fisicoquímicas de distintas proteínas (*E*, NS3, NS4B y NS5) (107, 110-112).

En un análisis reciente del dominio III de la proteína de envoltura en DENV-2 se encontraron sustituciones compensatorias que antigénicamente son importantes en la unión de anticuerpos neutralizantes, y en otros agentes virales han existido hallazgos similares, por ejemplo, en el virus de la hepatitis B (HVB) se han correlacionado sustituciones compensatorias y no sinónimas con resistencia a antivirales (113), en el virus de la inmunodeficiencia en simios (SIV) se encontró que una serie de mutaciones compensatorias inducidas permiten la evasión viral de la acción de los linfocitos T citotóxicos (114). Sin embargo, ningún estudio en DENV ha realizado un análisis detallado de estructuras conservadas del ARN en regiones codificantes diferentes a la región 5' del gen de la cápside. La hipótesis del presente estudio, es que la existencia de sustituciones compensatorias en DENV-2 podrían ser marcadores específicos de evolución concertada, es decir que el genoma de DENV podría tener la existencia de dos niveles de selección evolutiva, tanto al nivel de estructura del ARN como a nivel de proteína.

Para un estudio más detallado de las estructuras secundarias, sería interesante realizar una validación experimental con ensayos de mutagénesis sitio-dirigida en un clon infeccioso y evaluar la relación entre las sustituciones inducidas y el

proceso de evolución concertada que se plantea. Además a pesar de que se analizaron dos regiones genómicas variables a nivel genético, se propone que para identificar un subconjunto de nuevas regiones candidatas, es necesario mediante técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS, del inglés Next Generation Sequencing) evaluar genomas completos o subregiones genómicas de interés conocido, como la región 3'UTR cuyos primeros 300 nucleótidos se encuentran asociados regiones que regulan la replicación viral (58) y con ello lograr una mayor profundidad y resolución en la búsqueda de los determinantes genéticos de virulencia.

8.3 Caracterización fenotípica *in vitro* y su relación con los determinantes genéticos de virulencia

La mejor estrategia para caracterizar la cinética replicativa de las cepas virales es mediante ensayos de placa, porque permiten comprobar la presencia de partículas virales infecciosas en el cultivo celular, siendo estos más efectivos con respecto a técnicas moleculares como qRT-PCR que tienen el sesgo de cuantificar partículas defectivas, las cuales se originan cuando genomas que no son viables se ensamblan en viriones y se encuentran implicadas en el proceso de interferencia viral (115). Adicionalmente, se debe tener en cuenta que la interpretación de los ensayos fenotípicos *in vitro*, está sujeta al proceso de adaptación que sufre la población virus en cada ambiente celular. Así mismo es indispensable en el diseño experimental determinar la MOI (multiplicidad de la infección) o la cantidad de partículas virales infecciosas que infectan una célula en cultivo; si se realiza un experimento a una MOI alta, es con el fin de infectar una alta proporción de la monocapa e ideal para la evaluación de curvas de crecimiento de un solo paso, mientras que una MOI baja es usada para evaluar varios ciclos de replicación del virus en la monocapa (116).

Con respecto a la caracterización *in vitro* del estudio, se vio limitado por las pocas cepas asociadas a dengue grave que se lograron caracterizar, sin embargo hay que tener en cuenta que la proporción de casos anuales de

dengue grave es de solo el 2,5% (7) y que el porcentaje de recuperación durante los aislamientos virales fue muy bajo. Es importante mencionar que solo se pudieron realizar curvas de crecimiento en dos de las cuatro cepas que ocasionaron dengue grave, debido a que dos de ellas no alcanzaron los títulos suficientes para realizar curvas de crecimiento con la MOI establecida.

Aunque se ha evidenciado que mayores títulos virales se correlacionan con la gravedad de la enfermedad (74, 117), en el presente estudio se encontró menor eficiencia replicativa en cepas asociadas a dengue grave en el modelo *in vitro*; este hallazgo es compartido con un estudio donde se observó que cepas asociadas a dengue grave presentan títulos virales más bajos con respecto a cepas asociadas a dengue sin signos de alarma después de tres pases en células Vero (116). También, se debe tener en cuenta que los altos niveles de ARN viral han sido descritos en infecciones secundarias debido al fenómeno ADE; en el estudio no se evaluó la relación IgM/IgG para determinar si los pacientes presentaban infección primaria o secundaria por DENV, y así realizar una mejor correlación entre la cinética replicativa de las cepas y los factores dependientes del hospedero en el desenlace de la enfermedad.

Las células BHK-21 fueron más susceptibles a la infección por las cepas asociadas a dengue grave, en las curvas de crecimiento estas cepas alcanzaron los títulos máximos a las 24 horas post infección, frente a las cepas aisladas de pacientes que presentaron dengue sin signos de alarma que alcanzaron títulos máximos a las 36 horas post infección. Sin embargo, se debe evaluar la cinética de replicación en otra línea celular como lo es Vero o en cultivos primarios de células humanas, donde el virus estará sometido a un ambiente celular distinto y las cepas de DENV pueden presentar otro tipo de adaptación durante la infección viral. Además en las curvas de crecimiento de un paso, en 48 horas post infección ya se había infectado el total de la monocapa celular, en consecuencia, sería importante realizar las curvas de crecimiento a una MOI baja para comparar los resultados de ambas estrategias.

8. CONCLUSIONES

En las regiones genómicas analizadas de DENV-2, no se identificaron potenciales determinantes genéticos que se correlacionaran con los distintos cuadros clínicos de la enfermedad.

La caracterización fenotípica revela la tendencia de menores títulos virales en las cepas asociadas a dengue grave, con respecto a las cepas que ocasionaron dengue sin signos de alarma.

No fue posible establecer alguna asociación entre las variantes genéticas de las diferentes cepas de DENV-2 y las características fenotípicas *in vitro* de las mismas, ni con los distintos cuadros clínicos de la enfermedad.

El genoma de DENV-2 se caracteriza por la presencia de mutaciones compensatorias en regiones codificantes y no codificantes, que garantizan la preservación de estructuras secundarias de ARN conservadas.

9. PERSPECTIVAS

En las cepas caracterizadas se hace necesario evaluar el genoma completo para la búsqueda de determinantes genéticos de virulencia; siendo una estrategia más efectiva para el esclarecimiento de la patogénesis de la enfermedad. Mediante la identificación de determinantes genéticos de virulencia en el genoma de DENV a nivel nacional se podría realizar vigilancia y monitoreo rutinario a nivel genético de DENV, incluyendo un número de cepas representativas de todo el país, que puede ser de impacto en la predicción o generación de alertas ante posibles brotes de acuerdo a la dinámica epidemiológica del momento.

El desarrollo de dengue grave no se encuentra exclusivamente asociado a DENV-2, por ello es pertinente extender la búsqueda de determinantes genéticos de virulencia a los cuatro serotipos de DENV.

Para comprender la patogénesis en dengue, es necesario realizar un abordaje que involucre el hospedero y el virus, para ello se hace necesario realizar el monitoreo de los individuos infectados en la fase aguda y de convalecencia, con un análisis detallado de la relación IgM/IgG, detección de citoquinas (IL2, IL-10, IFN- γ), complemento, NS1, ST2, carga viral, entre otros marcadores presuntivos de gravedad; así como también un análisis de las propiedades biológicas y genéticas de las cepas de DENV que ocasionaron el desarrollo de la enfermedad.

La presencia de mutaciones compensatorias putativas que permiten preservar la estructura secundaria del ARN viral en regiones codificantes del genoma de DENV, sugiere un nuevo nivel de selección y por lo tanto un papel importante en la evolución de estos virus. Un análisis profundo utilizando genomas completos de cepas circulantes a nivel mundial y de los diferentes serotipos, permitirá determinar la magnitud de este hallazgo.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization (WHO). Global Strategy for Dengue Prevention and Control, 2012–2020. 2012. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75303/1/9789241504034_eng.pdf.
2. Murray MN, Quam MB, Wilder-Smith A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clinical Epidemiology*. 2013;5:299 - 309.
3. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504-7.
4. World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. 1997.
5. Bello Pérez SL. Comportamiento epidemiológico del dengue en Colombia año 2011. 2011.
6. Ministerio de salud y protección social. Situación actual de dengue a semana 12 de 2013. Periodo de análisis: 2008-2013. 2013 [Available from: <http://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/INFORME%20SITUACION%20DE%20DENGUE.pdf>].
7. Instituto Nacional de Salud. SIVIGILA. Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica número 53 de 2014 (28 de diciembre de 2014 al 03 de enero de 2015). 2014. p. 20.
8. Instituto Nacional de Salud. SIVIGILA. Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica número 46 de 2015 (15 de noviembre de 2015 al 21 de noviembre de 2015). 2015. p. 27.
9. Organización Mundial de la Salud (OMS). Dengue guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. 2009 [Available from: <http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2011/ndeng31570.pdf>].
10. Biedrzycka A, Cauchi MR, Bartholomeusz A, Gorman JJ, Wright PJ. Characterization of protease cleavage sites involved in the formation of the envelope glycoprotein and three non-structural proteins of dengue virus type 2, New Guinea C strain. *J Gen Virol*. 1987;68 (Pt 5):1317-26.
11. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(12 Suppl):S7-16.
12. Simmons CP, Farrar JJ, van Vinh Chau N, Wills B. Dengue. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(15):1423-32.
13. Paranjape SM, Harris E. Control of dengue virus translation and replication. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;338:15-34.
14. Gebhard LG, Filomatori CV, Gamarnik AV. Functional RNA elements in the dengue virus genome. *Viruses*. 2011;3(9):1739-56.
15. Bidet K, Garcia-Blanco MA. Flaviviral RNAs: weapons and targets in the war between virus and host. *Biochem J*. 2014;462(2):215-30.
16. Holden KL, Stein DA, Pierson TC, Ahmed AA, Clyde K, Iversen PL, et al. Inhibition of dengue virus translation and RNA synthesis by a morpholino oligomer targeted to the top of the terminal 3' stem-loop structure. *Virology*. 2006;344(2):439-52.
17. Filomatori CV, Lodeiro MF, Alvarez DE, Samsa MM, Pietrasanta L, Gamarnik AV. A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes Dev*. 2006;20(16):2238-49.
18. Cahour A, Pletnev A, Vazielle-Falcoz M, Rosen L, Lai CJ. Growth-restricted dengue virus mutants containing deletions in the 5' noncoding region of the RNA genome. *Virology*. 1995;207(1):68-76.
19. Alvarez DE, Lodeiro MF, Ludueña SJ, Pietrasanta LI, Gamarnik AV. Long-Range RNA-RNA Interactions Circularize the Dengue Virus Genome. *J Virol*. 79:2005. p. 6631-43.

20. Friebe P, Harris E. Interplay of RNA elements in the dengue virus 5' and 3' ends required for viral RNA replication. *J Virol.* 2010;84(12):6103-18.
21. Zeng L, Falgout B, Markoff L. Identification of specific nucleotide sequences within the conserved 3'-SL in the dengue type 2 virus genome required for replication. *J Virol.* 1998;72(9):7510-22.
22. Holden KL, Harris E. Enhancement of dengue virus translation: role of the 3' untranslated region and the terminal 3' stem-loop domain. *Virology.* 2004;329(1):119-33.
23. Groat-Carmona AM, Orozco S, Friebe P, Payne A, Kramer L, Harris E. A novel coding-region RNA element modulates infectious dengue virus particle production in both mammalian and mosquito cells and regulates viral replication in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Virology.* 2012;432(2):511-26.
24. Clyde K, Harris E. RNA secondary structure in the coding region of dengue virus type 2 directs translation start codon selection and is required for viral replication. *J Virol.* 2006;80(5):2170-82.
25. Velandia ML, Castellanos JE. Dengue virus: structure and viral cycle. *Infectio.* 2011;15(1):33-43.
26. Hidari KI, Suzuki T. Dengue virus receptor. *Trop Med Health.* 392011. p. 37-43.
27. Smit JM, Moesker B, Rodenhuis-Zybert I, Wilschut J. Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. *Viruses.* 32011. p. 160-71.
28. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(1):13-22.
29. Bartenschlager R, Miller S. Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future Microbiol.* 2008;3(2):155-65.
30. Knipe D, Howley P. Flaviviruses. In: Wilkins LW, editor. *Fields virology.* 1. 6th Edition ed2013. p. 747-94.
31. Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol.* 2003;3(1):19-28.
32. Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res.* 2003;59:315-41.
33. Usme-Ciro JA, Mendez JA, Laiton KD, Paez A. The relevance of dengue virus genotypes surveillance at country level before vaccine approval. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(9):2674-8.
34. Goncalvez AP, Escalante AA, Pujol FH, Ludert JE, Tovar D, Salas RA, et al. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology.* 2002;303(1):110-9.
35. Twiddy SS, Farrar JJ, Vinh Chau N, Wills B, Gould EA, Gritsun T, et al. Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. *Virology.* 2002;298(1):63-72.
36. Lewis JA, Chang GJ, Lanciotti RS, Kinney RM, Mayer LW, Trent DW. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. *Virology.* 1993;197(1):216-24.
37. Uzcategui NY, Comach G, Camacho D, Salcedo M, Cabello de Quintana M, Jimenez M, et al. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. *J Gen Virol.* 2003;84(Pt 6):1569-75.
38. Klungthong C, Zhang C, Mammen MP, Jr., Ubol S, Holmes EC. The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. *Virology.* 2004;329(1):168-79.
39. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology.* 1997;230(2):244-51.
40. Halstead SB, Chow JS, Marchette NJ. Immunological enhancement of dengue virus replication. *Nat New Biol.* 1973;243(122):24-6.

41. Gamble J, Bethell D, Day NP, Loc PP, Phu NH, Gartside IB, et al. Age-related changes in microvascular permeability: a significant factor in the susceptibility of children to shock? *Clin Sci (Lond)*. 2000;98(2):211-6.
42. de la CSB, Kouri G, Guzman MG. Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Arch Virol*. 2007;152(3):533-42.
43. Stephens HA. HLA and other gene associations with dengue disease severity. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;338:99-114.
44. Whitehorn J, Simmons C. The pathogenesis of dengue. 2011;29(42):7221-8.
45. Casadevall A, Pirofski LA. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun*. 1999;67(8):3703-13.
46. Rico-Hesse R. Dengue virus evolution and virulence models. *Clin Infect Dis*. 2007;44(11):1462-6.
47. Rico-Hesse R. Dengue virus markers of virulence and pathogenicity. *Future Virol*. 2009;4(6):581.
48. Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol*. 1997;51:151-78.
49. Twiddy SS, Holmes EC, Rambaut A. Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. *Mol Biol Evol*. 2003;20(1):122-9.
50. Imrie A, Roche C, Zhao Z, Bennett S, Laille M, Effler P, et al. Homology of complete genome sequences for dengue virus type-1, from dengue-fever- and dengue-haemorrhagic-fever-associated epidemics in Hawaii and French Polynesia. *Ann Trop Med Parasitol*. 2010;104(3):225-35.
51. Romano CM, Lauck M, Salvador FS, Lima CR, Villas-Boas LS, Araujo ES, et al. Inter- and Intra-Host Viral Diversity in a Large Seasonal DENV2 Outbreak. *PLoS One*. 2013;8(8):e70318.
52. Zhang Y, Zhang W, Ogata S, Clements D, Strauss JH, Baker TS, et al. Conformational Changes of the Flavivirus E Glycoprotein. *Structure*. 2004;12(9):1607-18.
53. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*. 2004;427(6972):313-9.
54. Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol*. 2008;11(4):369-77.
55. Parameswaran P, Charlebois P, Tellez Y, Nunez A, Ryan EM, Malboeuf CM, et al. Genome-wide patterns of intrahuman dengue virus diversity reveal associations with viral phylogenetic clade and interhost diversity. *J Virol*. 2012;86(16):8546-58.
56. Lin HE, Tsai WY, Liu IJ, Li PC, Liao MY, Tsai JJ, et al. Analysis of epitopes on dengue virus envelope protein recognized by monoclonal antibodies and polyclonal human sera by a high throughput assay. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(1):e1447.
57. Raekiansyah M, Sudiro M. Genetic variation among dengue virus that possibly correlate with pathogenesis. *Med J Indones*. 2004;13(3):190-4.
58. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de C, et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol*. 1999;73(6):4738-47.
59. Bray M, Men R, Tokimatsu I, Lai CJ. Genetic determinants responsible for acquisition of dengue type 2 virus mouse neurovirulence. *J Virol*. 1998;72(2):1647-51.
60. Sanchez IJ, Ruiz BH. A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. *J Gen Virol*. 1996;77:2541-5.
61. Shresta S, Sharar KL, Prigozhin DM, Beatty PR, Harris E. Murine Model for Dengue Virus-Induced Lethal Disease with Increased Vascular Permeability. *J Virol*. 2006;80(20):10208-17.
62. Rico-Hesse R. Dengue virus virulence and transmission determinants. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;338:45-55.

63. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis.* 2000;181(1):2-9.
64. Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol.* 2005;79(2):853-9.
65. Mota J, Rico-Hesse R. Humanized Mice Show Clinical Signs of Dengue Fever according to Infecting Virus Genotype ∇ †. *J Virol.* 2009;83(17):8638-45.
66. Fried JR, Gibbons RV, Kalayanarooj S, Thomas SJ, Srikiatkachorn A, Yoon IK, et al. Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(3):e617.
67. Chaudhary S, Swaminathan S, Khanna N. Viral Genetics as a Basis of Dengue Pathogenesis. 2006.
68. Barnes WJ, Rosen L. Fatal hemorrhagic disease and shock associated with primary dengue infection on a. *Am J Trop Med Hyg.* 1974;23(3):495-506.
69. Anantapreecha S, Chanama S, A A-n, Naemkhunthot S, Sa-NGasang A, Sawanpanyalert P, et al. Serological and virological features of dengue fever and dengue haemorrhagic fever in Thailand from 1999 to 2002. *Epidemiol Infect.* 2005;133(3):503-7.
70. Pryor MJ, Carr JM, Hocking H, Davidson AD, Li P, Wright PJ. Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65(5):427-34.
71. Cologna R, Rico-Hesse R. American Genotype Structures Decrease Dengue Virus Output from Human Monocytes and Dendritic Cells. *Journal of Virology.* 2003;77(7):3929-38.
72. Salazar MI, Loroño-Pino MA, Farfán-Ale JA, Olson KE, Beaty BJ. American And American Asian Genotypes Of Dengue Virus Differ In Mosquito Infection Efficiency Candidate Molecular Determinants Of Productive Vector Infection. *Rev Biomed.* 2010;21:121- 35.
73. Lok SM, Ng ML, Aaskov J. Amino acid and phenotypic changes in dengue 2 virus associated with escape from neutralisation by IgM antibody. *J Med Virol.* 2001;65(2):315-23.
74. Srikiatkachorn A, Wichit S, Gibbons RV, Green S, Libraty DH, Endy TP, et al. Dengue Viral RNA Levels in Peripheral Blood Mononuclear Cells Are Associated with Disease Severity and Preexisting Dengue Immune Status. *PLOS ONE.* 2012;7(12):1-6.
75. Wang WK, Chao DY, Kao CL, Wu HC, Liu YC, Li CM, et al. High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *Virology.* 2003;305(2):330-8.
76. Wang WK, Chen HL, Yang CF, Hsieh SC, Juan CC, Chang SM, et al. Slower rates of clearance of viral load and virus-containing immune complexes in patients with dengue hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis.* 2006;43(8):1023-30.
77. Camacho García DE, Bracho-Labadie M, Rodríguez Henríquez F, Morier Díaz L, Guzmán Tirado MG, Comach Pérez GA. Propiedades biológicas de cepas venezolanas de DENV-2 aisladas de pacientes con fiebre de dengue y fiebre hemorrágica del dengue. *Revista Cubana de Medicina Tropical.* 2009;61(3):259-68.
78. Gómez Rangel SY. Estudio de la virulencia del virus del dengue serotipo 3: Universidad Industrial de Santander; 2010.
79. Dengue: PAHO/WHO Data, Maps and Statistics. Dengue:Annual cases report of Dengue. [Available from: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=6290&Itemid=40734\(=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=6290&Itemid=40734(=en)

80. Instituto Nacional de Salud. SIVIGILA. Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica número 46 de 2013 (10 al 16 de Noviembre de 2013). 2013. p. 16 - 7.
81. Kurane I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2007;30(5-6):329-40.
82. Fox A, Le NM, Simmons CP, Wolbers M, Wertheim HF, Pham TK, et al. Immunological and viral determinants of dengue severity in hospitalized adults in Ha Noi, Viet Nam. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(3):e967.
83. Ocazonez RE, Gomez SY, Cortes FM. Dengue hemorrhagic fever serotype and infection pattern in a Colombian endemic area. *Rev Salud Pública*. 2007;9(2):262-74.
84. Méndez JA, Usme-Ciro JA, Domingo C, Rey GJ, Sánchez JA, Tenorio A, et al. Phylogenetic reconstruction of dengue virus type 2 in Colombia. *Virology Journal*. 2012;99(11):64.
85. Cologna R, Rico-Hesse R. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J Virol*. 2003;77(7):3929-38.
86. Usme-Ciro JA, Mendez JA, Tenorio A, Rey GJ, Domingo C, Gallego-Gomez JC. Simultaneous circulation of genotypes I and III of dengue virus 3 in Colombia. *Virology J*. 2008;5:101.
87. Domingo C, Niedrig M, Teichmann A, Kaiser M, Rumer L, Jarman RG, et al. 2nd International external quality control assessment for the molecular diagnosis of dengue infections. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(10).
88. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23(21):2947-8.
89. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods*. 9. United States 2012. p. 772.
90. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol*. 30 2013. p. 2725-9.
91. Efron B, Halloran E, Holmes S. Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(23):13429.
92. Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 2001;17(8):754-5.
93. Pond SL, Frost SD, Muse SV. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics*. 2005;21(5):676-9.
94. Gruber AR, Neuböck R, Hofacker IL, Washietl S. The RNAz web server: prediction of thermodynamically stable and evolutionarily conserved RNA structures. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Web Server issue):W335-8.
95. Griffiths-Jones S, Moxon S, Marshall M, Khanna A, Eddy SR, Bateman A. Rfam: annotating non-coding RNAs in complete genomes. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(Database issue):D121-4.
96. Boshell J, Groot H, Gacharna MG, Márquez G, González M, Gaitán MO, et al. Dengue en Colombia. *Biomédica*. 1986;6:101-6.
97. Guzman MG, Deubel V, Pelegrino JL, Rosario D, Marrero M, Sariol C, et al. Partial nucleotide and amino acid sequences of the envelope and the envelope/nonstructural protein-1 gene junction of four dengue-2 virus strains isolated during the 1981 Cuban epidemic. *Am J Trop Med Hyg*. 1995;52(3):241-6.
98. Usme-Ciro JA. Patrón Evolutivo y Filogeográfico del Virus Dengue Tipo 1 y 2 en Colombia: Universidad de Antioquia; 2008.
99. Runge-Ranzinger S, Horstick O, Marx M, Kroeger A. What does dengue disease surveillance contribute to predicting and detecting outbreaks and describing trends? *Trop Med Int Health*. 2008;13(8):1022-41.
100. Bennett SN, Holmes EC, Chirivella M, Rodriguez DM, Beltran M, Vorndam V, et al. Molecular evolution of dengue 2 virus in Puerto Rico: positive selection in the viral envelope accompanies clade reintroduction. *J Gen Virol*. 2006;87(Pt 4):885-93.

101. Williams M, Mayer SV, Johnson WL, Chen R, Volkova E, Vilcarrromero S, et al. Lineage II of Southeast Asian/American DENV-2 is associated with a severe dengue outbreak in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;91(3):611-20.
102. Weaver SC, Brault AC, Kang W, Holland JJ. Genetic and fitness changes accompanying adaptation of an arbovirus to vertebrate and invertebrate cells. *J Virol.* 1999;73(5):4316-26.
103. Weaver SC, Rico-Hesse R, Scott TW. Genetic diversity and slow rates of evolution in New World alphaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1992;176:99-117.
104. Kimura M. Recent development of the neutral theory viewed from the Wrightian tradition of theoretical population genetics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(14):5969-73.
105. Khoo CC, Doty JB, Held NL, Olson KE, Franz AW. Isolation of midgut escape mutants of two American genotype dengue 2 viruses from *Aedes aegypti*. *Virol J.* 2013;10:257.
106. Naik NG, Wu HN. Mutation of Putative N-Glycosylation Sites on Dengue Virus NS4B Decreases RNA Replication. *J Virol.* 2015;89(13):6746-60.
107. Sztuba-Solinska J, Teramoto T, Rausch JW, Shapiro BA, Padmanabhan R, Le Grice SF. Structural complexity of Dengue virus untranslated regions: cis-acting RNA motifs and pseudoknot interactions modulating functionality of the viral genome. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(9):5075-89.
108. Alvarez DE, Filomatori CV, Gamarnik AV. Functional analysis of dengue virus cyclization sequences located at the 5' and 3'UTRs. *Virology.* 2008;375(1):223-35.
109. Manokaran G, Finol E, Wang C, Gunaratne J, Bahl J, Ong EZ, et al. Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. *Science.* 2015;350(6257):217-21.
110. Pitcher TJ, Sarathy VV, Matsui K, Gromowski GD, Huang CY, Barrett AD. Functional analysis of dengue virus (DENV) type 2 envelope protein domain 3 type-specific and DENV complex-reactive critical epitope residues. *J Gen Virol.* 2015;96(Pt 2):288-93.
111. Roehrig JT, Butrapet S, Liss NM, Bennett SL, Luy BE, Childers T, et al. Mutation of the dengue virus type 2 envelope protein heparan sulfate binding sites or the domain III lateral ridge blocks replication in Vero cells prior to membrane fusion. *Virology.* 2013;441(2):114-25.
112. Teramoto T, Boonyasuppayakorn S, Handley M, Choi KH, Padmanabhan R. Substitution of NS5 N-terminal domain of dengue virus type 2 RNA with type 4 domain caused impaired replication and emergence of adaptive mutants with enhanced fitness. *J Biol Chem.* 2014;289(32):22385-400.
113. Ahn SH, Kim DH, Lee AR, Kim BK, Park YK, Park ES, et al. Substitution at rt269 in Hepatitis B Virus Polymerase Is a Compensatory Mutation Associated with Multi-Drug Resistance. *PLoS One.* 2015;10(8):e0136728.
114. Yeh WW, Cale EM, Jaru-Ampornpan P, Lord CI, Peyerl FW, Letvin NL. Compensatory substitutions restore normal core assembly in simian immunodeficiency virus isolates with Gag epitope cytotoxic T-lymphocyte escape mutations. *J Virol.* 2006;80(16):8168-77.
115. van der Schaar HM, Rust MJ, Waarts BL, van der Ende-Metselaar H, Kuhn RJ, Wilschut J, et al. Characterization of the Early Events in Dengue Virus Cell Entry by Biochemical Assays and Single-Virus Tracking. *J Virol.* 812007. p. 12019-28.
116. Flint J, Enquist L, Racaniello V, Skalka AM. *Principles of Virology.* 2008.
117. Tricou V, Minh NN, Farrar J, Tran HT, Simmons CP. Kinetics of viremia and NS1 antigenemia are shaped by immune status and virus serotype in adults with dengue. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(9):e1309.